



Горожанина Елена Сергеевна

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА ИДЕНТИФИКАЦИИ
СЫРЬЯ И ПРОДУКТОВ ЖИВОТНОГО И РАСТИТЕЛЬНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ОСНОВЕ SDS-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА**

16.00.06 - Ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и
ветеринарно-санитарная экспертиза

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2007

Работа выполнена в отделе технического регулирования, стандартизации и сертификации Государственного научного учреждения Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Россельхозакадемии (ГНУ ВНИИВСГЭ РАСХН), производственной химико-бактериологической лаборатории ОАО «Черкизовский мясоперерабатывающий завод» и в Главном экспертно-аналитическом центре «СОЭКС» Автономной некоммерческой организации «Союзэкспертиза» Торгово-промышленной палаты Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор Вячеслав Владимирович Светличкин
(ГНУ ВНИИВСГЭ РАСХН)

Научный консультант:

доктор ветеринарных наук Чолпонкул Кыдырмышевич Авылов
ОАО «Черкизовский мясоперерабатывающий завод»

Официальные оппоненты:

- доктор ветеринарных наук, профессор Владимир Ильич Родин
(МГУПБ)
- кандидат биологических наук Анна Борисовна Кононенко
(ГНУ ВНИИВСГЭ РАСХН)

Ведущая организация: Государственное научное учреждение Всероссийский государственный научно-исследовательский институт животноводства Россельхозакадемии.

Защита состоится « 23 » мая 2007 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 006.008.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Россельхозакадемии.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Е.С. Майстренко

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

В последние годы широко применяются белковые добавки животного и растительного происхождения. Введение соевых белков позволяет стабилизировать функционально-технологические свойства и качество мясного сырья, обогащает продукт полноценным белком и улучшает органолептические показатели (консистенция, внешний вид, сочность). Уменьшение потерь при термообработке и хранении, увеличение выхода готовой продукции при использовании соевого белка значительно снижает ее себестоимость, а низкая себестоимость может являться причиной фальсификации продукции.

Увеличение поступления на потребительский рынок различной по составу мясной продукции требует всестороннего комплексного контроля её качества, соответствия её потребительским требованиям и представленной технической документации.

Все продукты, поступающие на потребительский рынок, проходят проверку на безопасность и подтверждение соответствия. Идентификация продукции в свете закона «О техническом регулировании» является одним из главных и основных элементов сертификации, которая не должна «вводить в заблуждение потребителя».

Поэтому в практике при оценке качества мясного продукта возникает необходимость проведения идентификации его реального состава в соответствии с декларированными нормативными документами.

Целью подобной идентификации является определение и подтверждение подлинности конкретного вида и наименования товара, а также соответствие определенным требованиям или информации, указанной на этикетке или в товарно-сопроводительных документах.

Применение химических, физико-химических и биохимических методов позволяет получить только часть необходимой информации о качестве мясопродуктов.

В мировой практике для выяснения состава пищевых продуктов опробованы различные методы: иммуноферментного анализа, обладающего высокой специфичностью и чувствительностью, хроматографического анализа, обладающего большой чувствительностью и быстротой исполнения. Однако они не позволяют выявить замену мышечной ткани другими животными компонентами – легкими, печенью, выменем.

Ценную информацию о качестве продукта позволяет получить гистологический метод – метод прямого определения состава сырья. Микроскопические исследования позволяют судить как о составе продукта в целом, так и дифференцировать особенности тканевых и клеточных структур. Работа с биологическими объектами в пищевых продуктах имеет определенную специфику, поскольку исследованию подвергаются материалы после различных технологических воздействий. Гистологический метод трудоемок и требует специального оборудования, что вызывает определенные трудности его использования.

Проблема видовой идентификации может быть решена с использованием современных электрофретических методов. Эти методы давно используются в научных исследованиях. Однако, для применения их с целью экспертизы пищевых продуктов и внедрения в практику экспертных лабораторий необходима разработка и стандартизация оптимальных условий экстракции белков из нативных и термообработанных продуктов, использование определенных видов гелей и разработка условий проведения процесса электрофореза.

Это направление весьма перспективно в практике ветеринарной санитарии и дает возможность наиболее качественного анализа продуктов питания. Решение этой проблемы имеет научное и практическое значение.

Цель настоящей работы – разработка метода идентификации сырья и продуктов животного и растительного происхождения на основе SDS-электрофореза.

Задачи исследования:

1. Разработка оптимальных способов экстракции белков из нативных и термообработанных пищевых продуктов для последующего анализа их электрофоретическим методом.

2. Разработка метода видовой идентификации по выявлению видоспецифических маркерных белковых зон на электрофоретических спектрах.

3. Разработка методики количественной оценки компонентов смешанных фаршей.

4. Разработка метода качественного и количественного определения сои в смешанных фаршах.

5. Идентификация сои в составе колбасных изделий.

6. Идентификация сои в составе стерилизованных мясорастительных консервов на основе ДНК-диагностики.

7. Разработка схемы анализа видовой принадлежности продуктов животного и растительного происхождения.

8. Проведение лабораторных мониторинговых исследований пищевой продукции с использованием разработанных методов.

Научная новизна:

На основе использования электрофореза в присутствии ионного детергента додецилсульфата натрия (SDS) разработан способ анализа мясных продуктов, позволяющий проводить определение видовой принадлежности белка, количественно оценивать составляющие многокомпонентного фарша, в том числе белковые добавки растительного происхождения.

Определены характерные видоспецифические маркерные белковые зоны, по которым может быть проведена идентификация видовой принадлежности белка в составе пищевого продукта. Создана коллекция электрофореграмм белков животного и растительного происхождения.

Проведена адаптация метода полимеразно-цепной реакции с детекцией гибридизационно-иммуноферментным анализом (ПЦР-ГИФА)

для анализа мясных и мясорастительных консервов с целью идентификации в них сои.

Практическая ценность.

Разработанные методы расширяют возможности ветеринарных и сертификационных лабораторий и позволяют определять видовую принадлежность сырья, выявлять наличие белковых добавок животного и растительного происхождения в многокомпонентных нативных и термообработанных пищевых продуктах и оценивать их количество.

Результаты работы используются при проведении исследований пищевых продуктов в Главном экспертно-аналитическом центре «СОЭКС» Автономной некоммерческой организации «Союзэкспертиза» Торгово-промышленной палаты РФ.

На основании результатов исследований разработаны:

- методические рекомендации «Определение видового состава продуктов методом SDS-электрофореза» (утверждены отделением ветеринарной медицины РАСХН 19.01.2007 г.),

- методические рекомендации «Определение видового состава продуктов методом SDS-электрофореза» (утверждены Торгово-промышленной палатой РФ 10.04.2007 г.)

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

- Международной конференции «Актуальные проблемы ветеринарной патологии и морфологии животных», посвященной 100-летию со дня рождения профессора Авророва А.А. (Воронеж, 2006 г.)

- заседании Ученого совета ГНУ ВНИИВСГЭ (2007 г.)

Публикации. Результаты исследований отражены в 8 научных статьях.

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических

предложений, списка использованной литературы и приложений.

Диссертация изложена на 107 страницах машинописного текста, содержит 7 таблиц и 16 рисунков. Список литературы включает 114 источников отечественных и зарубежных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

2.1. Материалы и методы исследований.

Работа проводилась в период с 2000 г. по 2006 г.

Работа выполнена в отделе технического регулирования, стандартизации и сертификации Государственного научного учреждения Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Россельхозакадемии, производственной химико-бактериологической лаборатории ОАО «Черкизовский мясоперерабатывающий завод и в Главном экспертно-аналитическом центре «СОЭКС» Автономной некоммерческой организации «Союзэкспертиза» Торгово-промышленной палаты Российской Федерации.

Для анализа в настоящей работе были использованы нативные образцы говядины, свинины, мяса курицы и мяса индейки, термообработанные мясные продукты (колбасы, колбасные изделия), стерилизованные мясные и мясорастительные консервы. С целью количественной оценки составляющих белковых компонентов использовали модельные смеси из различных образцов мяса, которые готовили на Черкизовском мясоперерабатывающем заводе.

Для идентификации соевых добавок, используемых в производстве колбас, а также в составе полуфабрикатов рубленых мясных изделий, использовали образцы промышленных партий соевых изолятов и концентратов, соевой муки и текстурированного соевого белка.

Анализ белкового состава проводился методами SDS-электрофореза с использованием автоматизированной системы «PhastSystem» (Pharmacia) на различных видах полиакриламидных гелей.

Для определения доли каждого компонента в многокомпонентном

фарше проводили денситометрию электрофореграмм с использованием лазерного сканирующего денситометра «EPSON PERFECTION3200» (Epson). По соотношению пиков маркерных видоспецифических белков можно вычислить долю каждого компонента (в процентах) по формуле:

$$C = B/A \times 100\%, \text{ где:}$$

A – величина маркерного пика в индивидуальном образце,

B – величина того же маркерного пика в смешанном фарше,

C – процентная доля анализируемого компонента в смешанном фарше.

Денситометрию использовали также для количественной оценки содержания соевого белка в колбасных изделиях.

Для исследований стерилизованных продуктов использовали наборы серии SureFood на основе ПЦР с детекцией по методу ГИФА («Elise») (Германия). Исследования проводили с использованием амплификатора «Mastercycler personal» (Eppendorf), планшетного фотометра «Sunrise» (Tecan).

2.2. Результаты исследований.

2.2.1. Разработка оптимальных способов экстракции белков из нативных и термообработанных пищевых продуктов для последующего анализа их электрофоретическим методом.

Электрофорез в присутствии ионного детергента додецилсульфата натрия (SDS) характеризуется тем, что в системе суммарный заряд белка «маскируется», т.е. SDS окутывает белки облаком отрицательных зарядов.

Комплексы SDS-белок имеют одинаковый заряд, поэтому процесс разделения происходит только по одному параметру – размеру молекул.

Строгое соблюдение условий проведения электрофореза и предфорезной обработки образцов является обязательным для возможности сравнения электрофореграмм, полученных в разное время. С этой целью в работе был проведен подбор оптимальных условий экстракции из нативных образцов мяса и выбор диапазона градиента плотности в гелях,

который обеспечивал бы чёткое и воспроизводимое разделение белковых зон мясных экстрактов.

Буферный раствор.

Опытным путём было установлено, что для экстракции белков оптимально использование солюбилизирующего буфера pH 8, содержащего 0,01 М трис HCl, 0,001 М ЭДТА, 1% SDS и 5% β-меркаптоэтанола и последующее прогревание гомогенатов при 96°C.

Для экстракции белков использовали различные соотношения образца и солюбилизирующего буфера. Оказалось, что наилучшее разделение белковых зон происходит в тех случаях, когда схожие по молекулярной массе белки на электрофореграммах представлены отдельными зонами. Это достигается при соотношении образца и солюбилизирующего буфера 1:2.

Градиент плотности в геле.

SDS-электрофорез первоначально проводили в гелях с градиентом 10-15% и Homogeneous 7,5%; 12,5%; 20%. Как те, так и другие гели были приемлемы для электрофоретического разделения белков. Однако в дальнейшем предпочтение было отдано гелям с градиентом 10-15% (концентрация акриламида в разделяющем геле). Использование градиента плотности геля позволило четко и воспроизводимо провести электрофорез денатурированных белков. Наилучшие результаты были получены при аппликации образцов вблизи катода.

2.2.2. Разработка метода видовой идентификации по выявлению видоспецифических маркерных белковых зон на электрофоретических спектрах.

Экстракты различных видов пищевых продуктов после их электрофоретического разделения имеют различные белковые спектры. На этих спектрах присутствуют белковые зоны, общие для различных видов, а также белковые зоны, характерные только для определенных видов животных или растений – видоспецифические белки. Именно по этим

белковым зонам можно проводить идентификацию видов мяса и каких-либо белковых добавок. Поэтому им условно дано название - маркерные зоны.

Для идентификации свинины и говядины, сравнивая электрофореграммы исследуемых образцов (рис.1), выявляли видоспецифические маркерные зоны свинины и говядины.

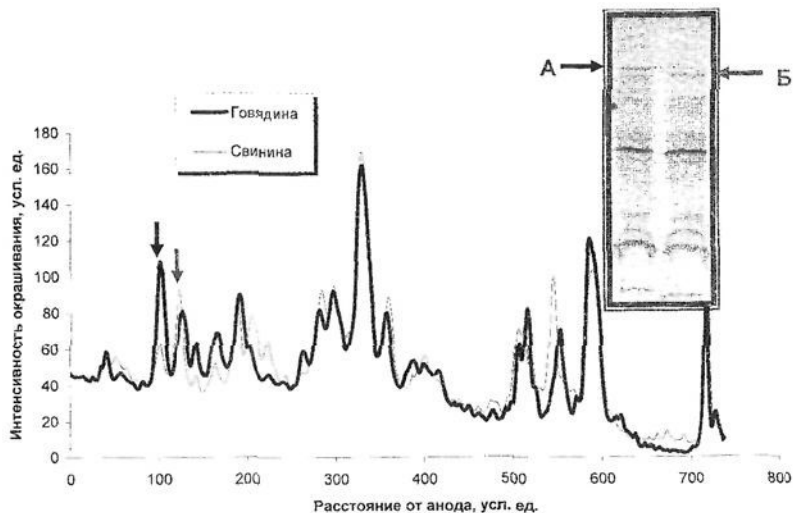


Рис. 1 Видоспецифические маркерные зоны говядины и свинины на геле и денситограмме.

Можно увидеть, что наряду с белками, общими для свинины и говядины, имеются белковые зоны, преобладающие в определенном виде мяса. В частности видно, что зона А преобладает в говядине, а зона Б в свинине.

2.2.3. Разработка методики количественной оценки компонентов смешанных фаршей.

Были изготовлены модельные системы - смешанные фарши, содержащие в своем составе говядину и свинину в различных соотношениях.

Электрофоретическое разделение белков и денситометрия полученных гелей показывает, что с уменьшением количества говядины наблюдается уменьшение площади пика А и увеличение площади пика Б.

Денситометрия электрофореграмм белков показала, что отношение площадей пиков А и Б имеет прямую зависимость от концентрации составляющих компонентов фарша (рис. 2).

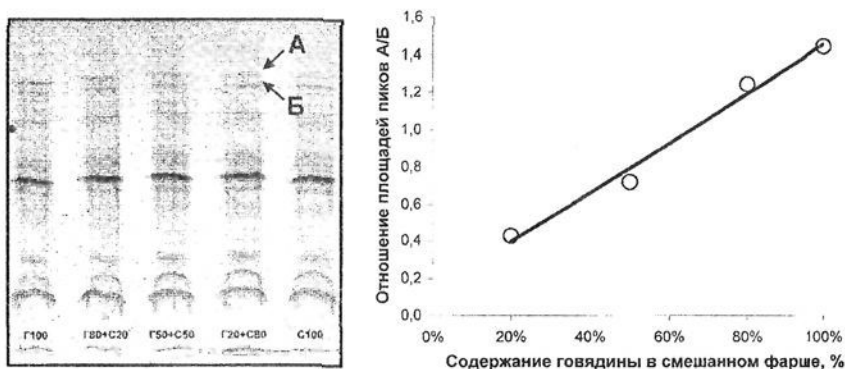


Рис. 2. Отношение площадей маркерных пиков говядины и свинины.

Аналогично, сравнивая электрофореграммы белков мяса курицы и мяса индейки, выявляли видоспецифические маркерные зоны и проводили количественную оценку компонентов в смешанных фаршах.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что метод SDS – электрофореза может быть успешно использован для видовой идентификации различных составляющих многокомпонентных мясных смесей, а в сочетании с денситометрией – для их количественной оценки.

Из 27 проанализированных образцов мяса и фаршей в 8 образцах, декларируемых как говядина, подтвержден состав в 6 образцах и выявлено наличие говядины и мяса птицы механической обвалки в 2. В 5 образцах, декларируемых как говядина и свинина, подтвержден состав. В 9 образцах, декларируемых как мясо курицы, выявлено наличие мяса курицы и

индейки в 2 и подтвержден состав в 7. В 5 образцах, декларируемых как мясо индейки, подтвержден состав.

2.2.4. Разработка метода качественного и количественного определения сои в смешанных фаршах.

С каждым годом растет ассортимент добавок, используемых в качестве замены дорогостоящего сырья в пищевых продуктах при их производстве. Относительно низкая стоимость этих добавок и стала причиной встречающихся случаев фальсификации пищевых продуктов, в частности фаршевых изделий и полуфабрикатов. Идентификация белковых добавок, в частности сои, в мясных изделиях на примере рубленых полуфабрикатов и фаршевых изделий стала целью нашего следующего исследования.

Рекомендуемое количество гидратированной соевой муки в рецептурах рубленых полуфабрикатов и фарша 20-50% (1-5% соевого белка от состава продукта). При гидратации соевая мука, содержащая 50-54% белка, связывает 3,5-4,5 части воды, поэтому в гидратированном состоянии добавка содержит около 10-15% белка.

При производстве фаршевых изделий (пельменей, фаршей, рубленых полуфабрикатов) в зависимости от технологических особенностей используются различные виды соевых белковых препаратов: изоляты, концентраты, текстураты и мука.

В рамках поставленной задачи, прежде всего, необходимо было получить и сравнить белковые спектры перечисленных выше белковых препаратов. Для этого проведен SDS-электрофорез различных образцов сои. Были проанализированы: соевый изолят, соевый концентрат, белок соевый текстурированный, мясо соевое текстурированное и соевая мука. Показано, что различные образцы соевого наполнителя сходны по своим электрофоретическим спектрам. Сравнение с белковыми спектрами животных белков (говядины, свинины) показало, что доминантные

белковые зоны различных образцов сои отсутствуют в мясных экстрактах, следовательно, являются специфичными для сои растительными белками и могут быть использованы в качестве маркерных зон при выявлении их в мясных экстрактах полуфабрикатов (рис. 3).

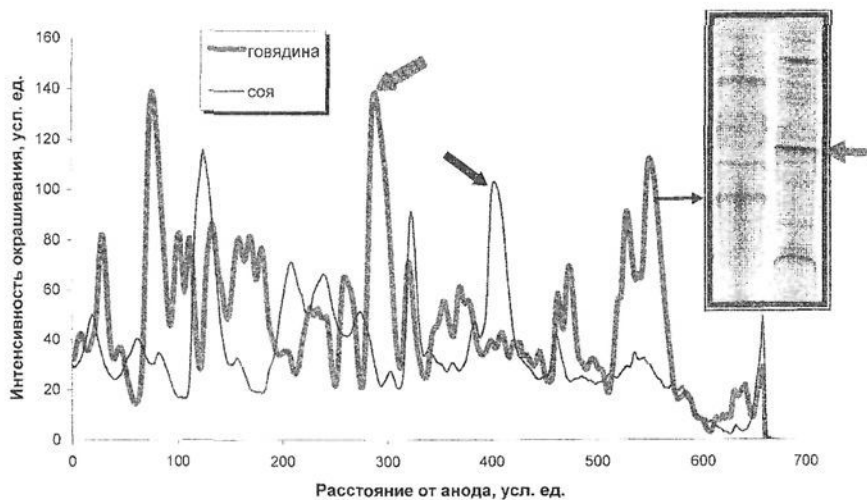


Рис. 3 Видоспецифические маркерные белковые зоны говядины и сои.

Проведение анализа мясных экстрактов полуфабрикатов требовало специфической обработки образца. Пробоподготовка перед электрофорезом в данном случае имела большое значение, так как составляющие компоненты продукта (жир, соли) будут мешать и искажать процесс разделения белков. Она заключалась в обработке пробы органическими растворителями и доведении до воздушно-сухого состояния. Аликвоту образца трижды обрабатывали охлажденным до -20°C ацетоном, затем серным эфиром.

Для солюбилизации белков также использовали трис-НСI буфер рН 8,0, содержащий додецилсульфат и β -меркаптоэтанол. Для четкого разделения на геле, подобрана оптимальная концентрация образца в солюбилизирующем буфере 2,5-3,0 мг/мл.

Чёткая идентификация маркерной зоны сои в мясных изделиях

позволила нам разработать метод количественной оценки этой добавки в составе фаршей. С этой целью были приготовлены модельные системы в виде сырого говяжьего фарша с добавками различного количества соевой муки. Добавки сои в составе фаршевых изделий (полуфабрикатов) составляют от 1 до 5 % (замена по белку от 10 до 50 %), исходя из этого, были приготовлены модельные системы: говядина 80%, соя 20%; говядина 70%, соя 30%; говядина 60%, соя 40%; говядина 50%, соя 50%. Для количественной оценки сои в смешанном фарше выбраны маркерные пики А, Б, В. Пик А принадлежит говядине, пики Б и В – только сое. Отношение площадей пиков в смешанных модельных фаршах, принадлежащих говядине и сое зависит от концентрации компонентов фарша (рис. 4).

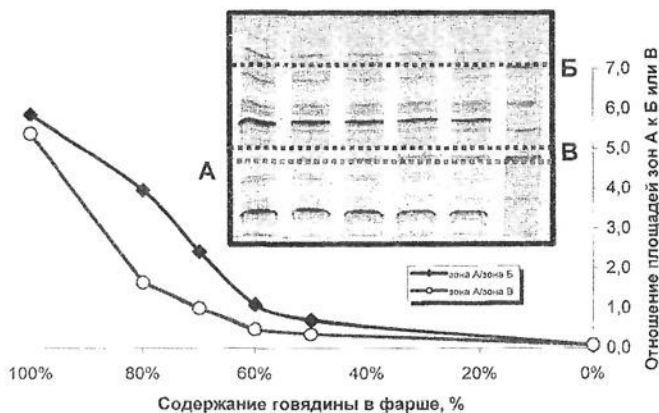


Рис. 4 Отношение площадей маркерных зон говядины и сои в смешанных фаршах при различном содержании компонентов.

Другим способом оценки количества сои в фаршевых изделиях является построение калибровочной кривой. С этой целью готовили несколько образцов с концентрацией соевого белка 0,1-0,4 мг/мл (что соответствует 10 - 40 % замене мясного белка соевым).

При одновременном нанесении на гель исследуемого фарша или полуфабриката и соевого белка в нескольких известных концентрациях

можно оценить соотношение составных компонентов продукта.

Из полученных результатов видно, что если оценку содержания сои в составе продукта проводить по методу определения коэффициента отношения площадей пиков А/В, то нанесение на гель калибровочных смесей одновременно с определяемыми образцами не требуется. В случае определения содержания сои по калибровочной кривой необходимо одновременное нанесение на гель не менее трех точек калибровочной смеси и исследуемых экстрактов.

Из 51 проанализированного образца смешанных фаршей и полуфабрикатов (котлет, пельменей и др.) в составе 20 идентифицировано только мясное сырьё, в 7 – добавка соевого белка до 1,0 % от общего состава продукта (до 10 % замены белка), в 24 содержание соевого белка 1-5% (это составляет 10-50% замены мясного белка). В 17 образцах из 31 информация о наличии соевого белка не вынесена на этикетку.

2.2.5. Идентификация сои в составе колбасных изделий.

Для солюбилизации белков термообработанных продуктов использование ранее описанного буфера является обязательным. Наличие ионного детергента додецилсульфата и β-меркаптоэтанола способствует диссоциации дисульфидных мостиков в денатурированных белках, обеспечивая их солюбилизацию.

Предварительная пробоподготовка состояла в обезжиривании и обессоливании образцов, необходимых для качественного разделения белков в геле.

Предфорезная обработка солюбилизаторов заключается в прогревании гомогенатов при 96°C в течение трёх минут и последующем центрифугировании. Отработано соотношение буфера и образца, которое составило 3,5-4,0 мг/мл.

Объектами исследования являлись колбаса докторская оригинальная, изготовленная в соответствии с ТУ 9213-283-17471666-01, содержащая в составе сою и сардельки говяжьи, изготовленные по ГОСТ Р 521596-2003,

не содержащие в своем составе сою. Основным мясным компонентом в обоих объектах являлась говядина. Поэтому на гель были нанесены пробы исследуемых образцов колбас, говядины и соевого белка.

Сравнение белковых спектров подтвердило состав, вынесенный на этикетку. Показано наличие соевого белка в колбасе «докторской оригинальной» и отсутствие его в сардельках говяжьих. Промышленная термическая обработка не оказывает влияния на качественный состав белковых фракций (рис.5).

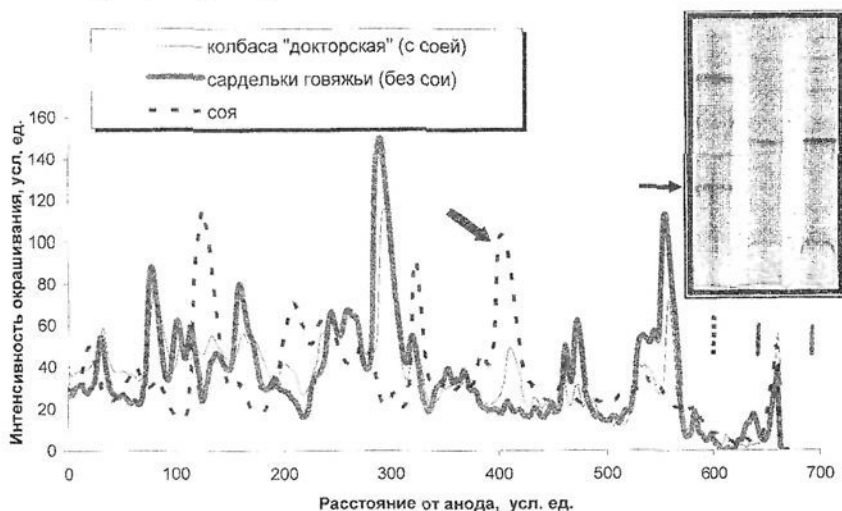


Рис. 5 Разделение белков колбасных изделий и сои на денситограмме и геле.

Электрофоретический анализ белков колбасных изделий показал, что этот метод приемлем для видовой идентификации белков животного и растительного происхождения в составе многокомпонентного продукта.

Из 86 проанализированных образцов колбасных изделий в составе 48 идентифицировано только мясное сырьё, в 24 – добавка соевого белка до 1,0% от общего состава продукта (до 8 % замены белка), в 14 содержание соевого белка - 1-5% (это составляет 20-30% замены мясного белка). В 14 образцах из 38 информация о наличии соевого белка не вынесена на этикетку.

На этикетках колбасных изделий, в состав которых введены комплексные добавки животного происхождения, часто не указываются их составляющие. В силу указанных причин для идентификации состава исследуемых продуктов (колбасных изделий, комплексных пищевых добавок) одновременно проводили электрофоретическое разделение экстрактов исследуемых образцов и наиболее часто употребляемых добавок животного происхождения. Таковыми являются: сухое обезжиренное молоко, сублимированная кровь крупного рогатого скота, яичный и бычий альбумин.

Специфичные для сои растительные белки были с успехом использованы в качестве маркерных зон при исследовании состава сублимированных продуктов (яичный порошок, сухое молоко и др.).

2.2.6. Идентификация сои в составе стерилизованных консервов.

В качестве белкового наполнителя в мясных стерилизованных консервах часто используется соевый белок. Рекомендуемое количество гидратированной соевой муки в рецептурах консервов - до 35% (до 5% соевого белка от состава продукта).

Стерилизованные консервы – это продукты, подвергнутые наиболее жесткой термической обработке. Температурные воздействия составляют 110-120°C в течение 40-60 минут. При этом в макромолекулах белков происходят необратимые изменения пространственной конфигурации, в результате чего пептидные цепочки формируют случайные агрегационные состояния.

Для солюбилизации таких молекул в качестве детергента используют тритон 100, додецилсульфат с β -меркаптоэтанолом и растворы мочевины высокой концентрации (7-8 М). Использование 3% раствора тритона не дало четко выраженных белковых зон на электрофореграмме. Такие же результаты были получены с использованием буфера, содержащего додецилсульфат и β -меркаптоэтанол. Использование в качестве солюбилизата 7,7 М раствора мочевины приводило к получению белкового

раствора нужной концентрации. Однако, использование этого солюбилизатора не было возможным из-за условий проведения электрофореза в системе PhastSystem, так как концентрирование образца на старте и разделение его в геле идет при температуре 12-15°C. При такой температуре раствор мочевины кристаллизовался на старте.

В силу указанных обстоятельств и необходимости отработки метода определения сои в стерилизованных консервах, мы применили метод ПЦР-ГИФА. Он основан на ферментативной амплификации интересующего участка ДНК. Молекула ДНК представляет собой наиболее удобный объект для анализа. Основное её преимущество перед другими биологическими макромолекулами – стабильность. ДНК не разрушается при автоклавировании и переносит длительное хранение.

Выделение ДНК и амплификацию проводили с использованием тест-комплектов под общей маркой SureFood, предназначенных для быстрого и эффективного выделения, идентификации и определения ДНК различного происхождения в продовольственном сырье и готовых пищевых продуктах. Благодаря короткому размеру ПЦР-продукта (lec-ген имеет 118 пар оснований), определение видоспецифичной ДНК может выполняться и на образцах, подвергнутых термической обработке.

Проведение анализа включало следующие стадии: изоляция и очистка ДНК в исследуемой пробе с использованием набора SureFood PREP Plant/PlantX; ПЦР-амплификация и детекция lec-гена с помощью специфических биотинилированных праймеров.

Результат исследования на наличие сои в образце интерпретируется как положительный, если величина оптической плотности (ОП) в лунках с ампликонами пробы, гибридизованными на детектируемый lec-ген, включая лунку контроля ингибирования, больше 0,2 (таблица 1).

Исходя из выше изложенного, можем заключить, что образцы 2 и 3 содержат соевый белок, а в образце 1 – соевый белок отсутствует.

Высокая специфичность и чувствительность метода ГИФА

позволила выявить низкие концентрации растительного белка (от 0,5%) сои среди большого количества других веществ.

Таблица 1

Оптическая плотность в лунках ИФА-планшета при исследовании образцов на наличие сои.

	Контроль	Образец №1	Образец №2	Образец №3
Контроль эффективности, ДНКконтр.	1,439	-	-	-
Контроль контаминации, раствор без ДНК	0,065	-	-	-
Контроль ингибирования, ДНКОбр.+ ДНКконтр.	-	1,229	1,298	1,306
ДНКОбр.	-	0,013	0,643	0,679
Hyb (-)	0,017	-	-	-
Hyb (+)	1,121	-	-	-

Из 117 проанализированных образцов стерилизованных консервов (фарш сосисочный, любительский, консервы мясорастительные) в составе 65 идентифицировано только мясное сырьё, в 52 выявлено наличие соевого белка. В 16 образцах из 52 информация о наличии соевого белка не вынесена на этикетку.

2.2.7. Схема анализа видовой принадлежности продуктов животного и растительного происхождения.

В результате анализа состава пищевых продуктов нами была предложена схема проведения идентификации видовой принадлежности белков животного и растительного происхождения (рис. 6), которая учитывает разрешающую способность тех или иных методов для анализа нативных, термобработанных и стерилизованных образцов.

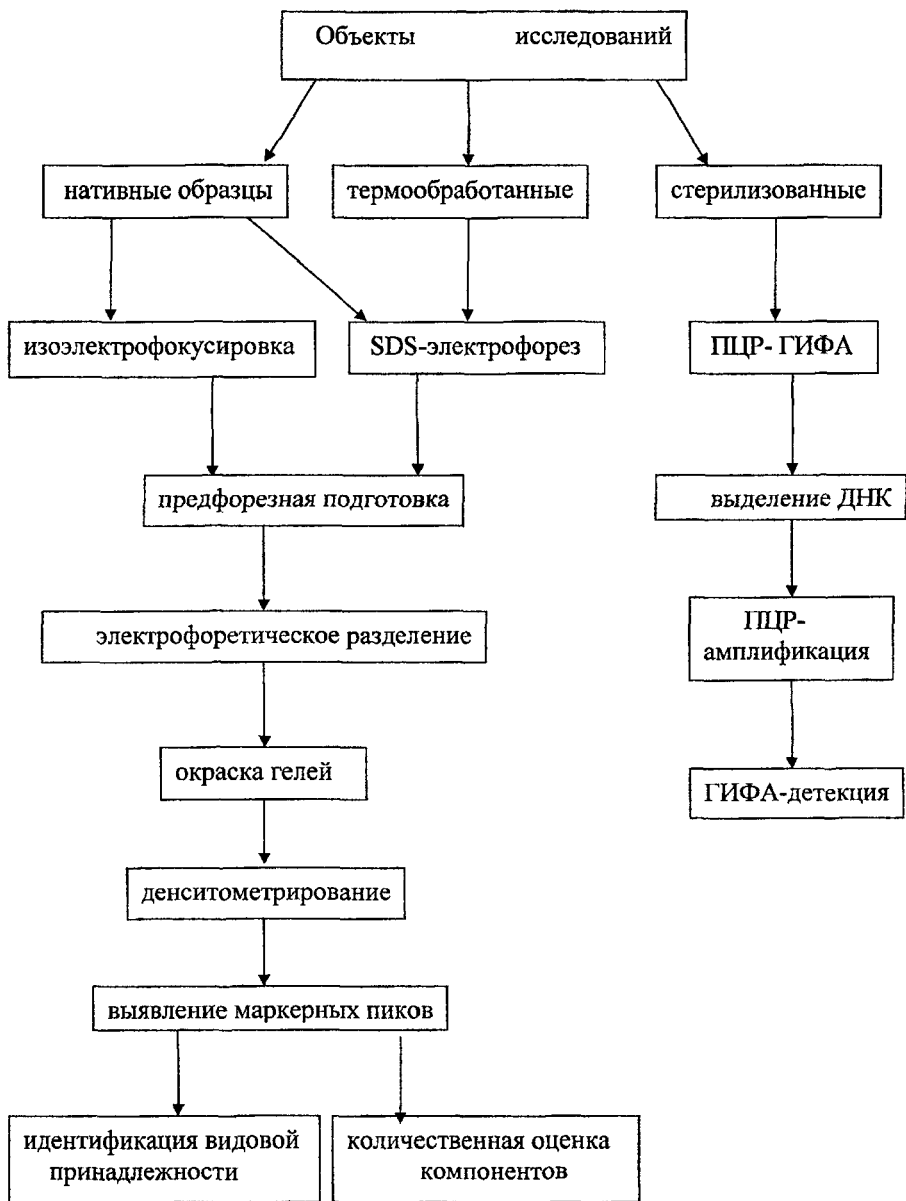


Рис. 6 Схема проведения идентификации видовой принадлежности белковых продуктов животного и растительного происхождения.

2.2.8. Лабораторные мониторинговые исследования продукции с использованием разработанных методов.

За время выполнения работы были проведены мониторинговые исследования 281 образца различных пищевых продуктов и пищевого сырья.

Из 27 проанализированных образцов мяса и фаршей в 8 образцах, декларируемых как говядина, подтвержден состав в 6 образцах и выявлено наличие говядины и мяса птицы механической обвалки в 2. В 5 образцах, декларируемых как говядина и свинина, подтвержден состав. В 9 образцах, декларируемых как мясо курицы, выявлено наличие мяса курицы и индейки в 2 и подтвержден состав в 7. В 5 образцах, декларируемых как мясо индейки, подтвержден состав.

Из 51 проанализированного образца смешанных фаршей и полуфабрикатов (котлет, пельменей и др.) в составе 20 идентифицировано только мясное сырьё, в 7 – добавка соевого белка до 1,0 % от общего состава продукта (до 10 % замены белка), в 24 содержание соевого белка 1-5% (это составляет 10-50% замены мясного белка). В 17 образцах из 31 информация о наличии соевого белка не вынесена на этикетку.

Из 86 проанализированных образцов колбасных изделий в составе 48 идентифицировано только мясное сырьё, в 24 – добавка соевого белка до 1,0% от общего состава продукта (до 8 % замены белка), в 14 содержание соевого белка - 1-5% (это составляет 20-30% замены мясного белка). В 14 образцах из 38 информация о наличии соевого белка не вынесена на этикетку.

Из 117 проанализированных образцов стерилизованных консервов (фарш сосисочный, любительский, консервы мясорастительные) в составе 65 идентифицировано только мясное сырьё, в 52 выявлено наличие соевого белка. В 16 образцах из 52 информация о наличии соевого белка не вынесена на этикетку.

Результаты исследований пищевых продуктов.

Образцы	Общее количество образцов	В составе только мясное сырьё	Добавка соевого белка до 1,0% от состава продукта	Добавка соевого белка 1-5% от состава продукта	Соевый белок не декларирован
Фарши и полуфабрикаты	51	20	7	24	17
Колбасные изделия	86	48	24	14	14
Консервы (фарш сосисочный, любительский, консервы мясорастительные)	117	65	52		16

Мониторинговые исследования пищевой продукции в ассортименте показали возможность эффективного применения разработанных методов видовой идентификации белков животного и растительного происхождения.

Выводы:

1. Использование метода SDS-электрофореза позволяет с высокой точностью идентифицировать видовую принадлежность белков животного и растительного происхождения в сырье и термообработанных колбасных изделиях.

2. Подобранные оптимальные способы экстракции белков из нативных и термообработанных пищевых продуктов (трис-НСI буфер рН 8,0, содержащий 1% додецилсульфата и 5% β-меркаптоэтанола) обеспечивают оптимальную экстракцию белков, необходимую для анализа в системе PhastSystem. Наилучшее разделение достигается с использованием гелей с градиентом 10-15% при аппликации образцов вблизи катода.

3. На основании метода SDS-электрофореза в сочетании с

денситометрией разработан способ качественной оценки различных составляющих в многокомпонентных пищевых продуктах (фаршевые изделия и термообработанные пищевые продукты) по выявлению на электрофореграмме видоспецифических маркерных белковых зон, по которым может быть проведена идентификация видовой принадлежности белка в составе пищевого продукта.

4. Разработанные модифицированные методики качественного и количественного анализа белков позволяют определять сою в многокомпонентных пищевых системах.

5. Для определения наличия соевых добавок в стерилизованных мясных и мясорастительных консервах целесообразно использовать ПЦР.

6. На основании полученных результатов предложена последовательная система методов идентификации видовой принадлежности продуктов животного и растительного происхождения на основе SDS-электрофореза, изоэлектрофокусировки и ПЦР.

7. Мониторинговые исследования пищевой продукции с применением разработанных методов исследования видовой идентификации показали возможность выявления недеklarированных компонентов растительного и животного происхождения.

8. Разработанные методы могут быть использованы для скрининговых тестов и количественного определения отдельных составляющих в многокомпонентных смесях животного и растительного происхождения.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Горожанина Е.С. / Идентификация белковых добавок в составе колбасных изделий // Практик: научно-практический информационный журн. / Учредитель и издатель НПО «Петролазер»/ двухмес., 2005, № 7-8, с. 4-7, 5000 экз.

2. Горожанина Е.С., Тихомирова Т.А., Светличкин В.В., Писарева В.М. / Идентификация белковых добавок в составе рубленых

полуфабрикатов и фаршевых изделий // Практик: научно-практический информационный журн. / Учредитель и издатель НПО «Петролазер»/ двухмес., 2005, № 9-10, с. 26-29, 5000 экз.

3. Горожанина Е.С. / Идентификация видовой принадлежности белка с использованием SDS-электрофореза // Материалы международной научно-производственной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора Авророва А.А. 22-23 июня 2006 года г. Воронеж / Воронеж, «Научная книга», ISBN 5-98222-1260, 2006, с. 1041-1044, 200 экз.

4. Каверин А.В., Рощупкина Л.В., Горожанина Е.С., Бутко М.П. / Тестирование сои в стерилизованных консервах на основе ПЦР, ДНК-гибридизации и ИФА. // Материалы 5-ой международной научной конференции «Живые системы и биологическая безопасность населения», МГУПБ, Москва, 2006, с. 42-47, 800 экз.

5. Каверин А.В., Рощупкина Л.В., Горожанина Е.С., Галкин А.В./ Использование метода ПЦР в экспертизе пищевых продуктов для видовой идентификации сырья животного происхождения. // Материалы 5-ой международной научной конференции «Живые системы и биологическая безопасность населения», МГУПБ, Москва, 2006, с. 48-52, 800 экз.

6. Тихомирова Т.А., Горожанина Е.С. / Проблемы мониторинга ГМО: практика лаборатории // Методы оценки соответствия: научно-практический журн./ Учредитель и издатель ООО «РИА «Стандарты и качество»/ ежемес. ISSN 1990-7850, 2006, №10(4), с. 17-19, 1500 экз.

7. Горожанина Е.С., Нохрина Н.В., Крючкова Ю.Г. / Экспериментальные подходы к оценке безопасности и качества мясной продукции // Мясные технологии: журн./ Издатель: ЗАО «Отраслевые ведомости», 2006, №11, с. 4-6, 4000 экз.

8. Тихомирова Т.А., Горожанина Е.С., Ефремова А.С., Авылов Ч.К. / Идентификация сырья и продуктов животного и растительного происхождения методом SDS-электрофореза. // Все о мясе: журн./ Учредитель и издатель «Мясной союз России», 2007, №3, с. 15-17, 900 экз.

ВНИИВСГЭ, 2007, г. Москва, Звенигородское ш., 5, Заказ 235/3, тираж 80 экз.