

## ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ

УДК 579.67:[641:613.26]

Ю.В. Голубцова

### ПОДБОР ЗАТРАВОЧНЫХ МОЛЕКУЛ ПРИ СОЗДАНИИ ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ

Подбор затравочных молекул (праймеров) – ключевое звено ПЦР (полимеразной цепной реакции), поскольку именно ими определяется возможность амплификации и выявления нужной последовательности, а также чрезвычайная гибкость метода. В связи с этим произведен выбор нуклеотидных последовательностей, которые будут многократно воспроизводиться в процессе ПЦР. Осуществлен поиск гомологичных последовательностей и их анализ. Подобраны универсальные праймеры для тест-системы.

**Ключевые слова:** праймеры, тест-система, полимеразная цепная реакция, идентификация, пищевые продукты.

Yu.V. Golubtsova

### SELECTION OF SEEDING MOLECULES IN THE PROCESS OF PCR-TEST-SYSTEM CREATION FOR EPYIDENTIFICATION OF VEGETABLE RAW MATERIALS IN FOODSTUFFS

*The selection of seeding molecules (primers) is one of the key factors in the (PCR) as these primers determine the possibility of amplification, detection of the needed sequence and extreme flexibility of the method. Thereby the selection of the nucleotide sequences that will be reproduced repeatedly in the PCR process are made. The search of homologous sequences and their analysis are performed. The universal primers for test-system are selected.*

**Key words:** primers, test-system, polymerase chain reaction, identification, foodstuffs.

---

**Введение.** Продукты питания во все времена были важнейшей составляющей жизни людей. Они являются исходным материалом для построения и обновления человеческого организма, гармонического развития и работоспособности.

В эпоху научно-технического прогресса, в связи с изменившимися условиями труда и быта, возникла проблема роста числа заболеваний у людей, обусловленных нехваткой биологически активных нутриентов в рационе питания [1].

Одним из наиболее эффективных путей ликвидации дефицита эссенциальных нутриентов в питании человека является обогащение продуктов питания массового потребления биологически активными компонентами природного происхождения. Вследствие чего сегодня все большее внимание уделяется применению растительного сырья (плодов и ягод) в производстве продуктов питания, о чем свидетельствует рост объемов российского рынка продуктов с использованием данного вида сырья.

Интерес к съедобным растениям оправдан. Пищевые растения представляют большую ценность, прежде всего благодаря специфичным сочетаниям биологически и фармакологически активных компонентов. Такие вещества трудно создать искусственно, они хорошо усваиваются человеческим организмом, обладают лечебным и/или профилактическим действием. Благодаря природной гармонии и многообразию входящих в их состав макро- и микронутриентов (углеводы, витамины, минеральные вещества и др.), использование данного вида сырья позволит повысить пищевую и биологическую ценность пищевых продуктов [7].

При производстве пищевой продукции, обогащенной растительным сырьем, необходимо осуществлять жесткий контроль качества и достоверности видовой принадлежности вводимых природных компонентов вследствие распространяющейся фальсификации продуктов питания. По экономическим соображениям наиболее распространенный метод фальсификации – использование более дешевых заменителей ингреди-

ентов, входящих в рецептуру продукта питания, имеющих, как правило, пониженную пищевую ценность. Так, например, вместо земляники садовой предлагают клубнику, а вместо персиков – абрикосы.

Решение проблемы обнаружения фальсификаций растительного сырья в продуктах требует соответствующих методов идентификации и имеет первоочередное значение в списке мероприятий, направленных на достижение безопасности и качества реализуемой пищевой продукции. В целях установления фальсификации пищевой продукции идентификация осуществляется путем совокупной оценки физико-химических, органолептических и других показателей [8]. Для этого на практике наиболее широко применяются следующие методы исследования.

*Спектральные методы исследования* – совокупность методов качественного и количественного определения состава объекта, основанная на изучении спектров взаимодействия материи с излучением. Спектральный анализ используется для определения пектиновых веществ, фенольных соединений, макро- и микроэлементов, содержания тяжелых металлов, степени окисления жиров и др.

*Хроматографические методы исследования* незаменимы при оценке качества и безопасности пищевых продуктов, имеющих очень сложный химический состав. Например, газожидкостная хроматография (ГЖХ) является наиболее важным методом для изучения состава жирных кислот природных масел и жиров, а также липидов, выделенных из различных продуктов питания. Кроме того, ГЖХ используется при определении содержания жирорастворимых витаминов, синтетических красителей, консервантов, аминокислот, углеводов, ароматических веществ пищевых продуктов, пестицидов и др. [4, 5].

*Методы капиллярного электрофореза анализа сложных смесей* основаны на использовании электрохимических явлений (электромиграции ионов и других заряженных частиц и электроосмоса) для разделения и определения компонентов. Данный метод позволяет определять аминокислотный состав белков пищевых продуктов, состав органических кислот, содержание фруктозы, глюкозы, сахарозы.

Разработаны и внедрены *ферментативные методы анализа*. Их применяют при определении лимонной и яблочной кислот для соков; состава моно- и дисахаридов в молочных продуктах питания и плодово-ягодных полуфабрикатах.

Однако используемые в настоящее время методы анализа далеко не всегда позволяют исследовать пищевые продукты достаточно глубоко. Необходимость создания и постоянного усовершенствования специфичных и чувствительных методов, не требующих большого количества материала для анализа и пригодных для рутинной диагностики, неоспорима [5].

Освоение в последние годы методов ДНК-диагностики послужило стимулом для разработки и внедрения в практику высокочувствительных методик оценки качества и экспертизы продуктов питания, основанных на методе полимеразной цепной реакции (ПЦР) [3]. Полимеразная цепная реакция – это метод амплификации (многократное воспроизведение) *in vitro*, с помощью которого в течение нескольких часов можно выделить и размножить определенную последовательность ДНК в количестве, превышающем исходное в 10 раз. В основе метода лежит многократное копирование с помощью фермента ДНК-полимеразы определенного фрагмента ДНК по принципу комплементарности [6].

ПЦР-анализ состоит из трех основных процедур: подготовка пробы исследуемого материала, которая в большинстве случаев сводится к изоляции ДНК и ее очистке; амплификация (само ПЦР) и детекция продуктов амплификации. Ключевым этапом ПЦР является амплификация – направленная репликация фрагмента ДНК. Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов: денатурация ДНК; отжиг праймеров (их присоединение к м-ДНК); элонгация праймеров (синтез). Многократное (циклическое) повторение этих трех стадий приводит к обогащению реакционной смеси молекулами ДНК-мишени, поскольку в каждом новом цикле в качестве матрицы выступает не только исходная, но и вновь синтезированная ДНК.

При создании ПЦР-тест-системы одной из основных задач является правильный подбор затравочных молекул или праймеров. Праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 п.н., идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации. Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы [2].

**Цель исследования.** Подбор затравочных молекул для ПЦР-тест-системы, позволяющей идентифицировать растительное сырье в продуктах питания.

**Объекты и методы исследования.** В качестве объектов исследования были выбраны клубника и вишня. Для поиска последовательностей генов, к которым необходимо подобрать праймеры, удобно исполь-

зователь биоинформационную базу данных NCBI. NCBI (National Center for Biotechnological Information, USA) – национальный центр биотехнологической информации, в числе прочего предоставляет сведения о структуре генома живых организмов – о нуклеотидных и аминокислотных последовательностях. Результаты анализа представлены в таблице 1.

Таблица 1  
Анализ нуклеотидных последовательностей генома клубники и вишни

Наименование сырья	Количество выбранных нуклеотидных последовательностей, присутствующих во всех геномах	Степень сродства по скору, %
Клубника ( <i>Fragaria</i> )	69	95
Вишня ( <i>Prunus subg. Cerasus</i> )	25	95

Для исследования были использованы следующие сорта клубники: *Fragaria moschata*; *Fragaria orientalis*; *Fragaria vesca*; *Fragaria ananassa*; *Fragaria virginiana subsp. *Glauca**; *Fragaria nubicola*; *Fragaria adaltoniana*; *Fragaria sp.*; *Fragaria chiloensis*; *Fragaria nipponica*; *Fragaria pentaphylla*; *Fragaria oupinensis*; *Fragaria nilgerrensis*; *Fragaria inumae*; *Fragaria tibetica*; *Fragaria corymbosa*. При анализе геномов *Fragaria* выбраны небольшие последовательности, присутствующие во всех геномах. В ходе анализа было выявлено, что общее количество нуклеотидных последовательностей в системе, представленных в Gene Bank, для клубники составило 69, наибольшее сродство по скору – 95 %.

Также проведен анализ геномов *Prunus subg. Cerasus*, в ходе которого выбраны небольшие последовательности, присутствующие во всех геномах. Анализируя данные, выявили 25 последовательностей для вишни, которые имеют наибольшее сродство по скору (95 %).

На следующем этапе исследований в программе Bio Edit было проведено выравнивание и сравнение гомологии нуклеотидных последовательностей клубники и вишни. Результаты представлены на рисунках 1–2.

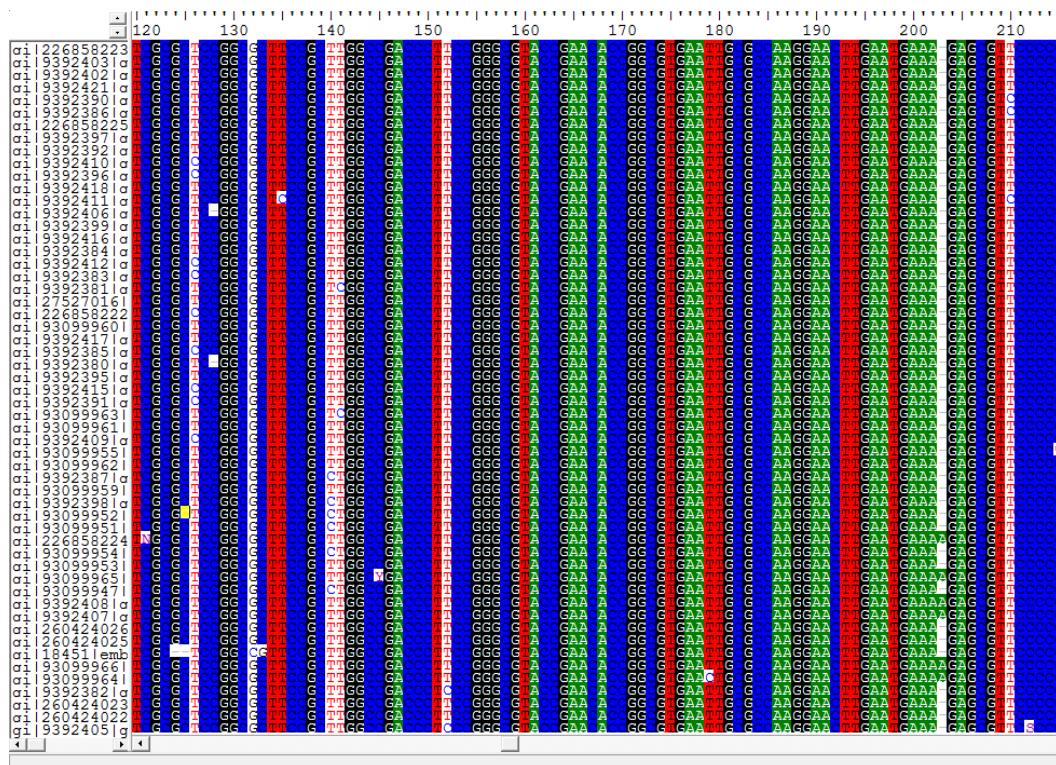


Рис. 1. Равнение и гомология нуклеотидных последовательностей клубники в программе Bio Edit



Рис. 2. Равнение и гомология нуклеотидных последовательностей вишни в программе Bio Edit

Как показал анализ, все нуклеотидные последовательности клубники и вишни обладают высоким сродством и степенью гомологии 98 %. Выбрали участки последовательностей, идентичные друг к другу, для подбора универсальных праймеров (рис. 3–4).

CGGCTCCTCGCCCCCTCCCTCCGGAGGGCGGACGTCTCGCGCGCTCCGGCGCTTCCGCCTGGCGA  
 CCCCTCCGGCGTACCGAACACCCGGCGTGAATTGCGCCAAGGAACCTGAATGAAAGAGCGTCCCCCGCCGT  
 CCCGGAGACGGAGACCGCGCGGGTGGTCGTCGTCAGTATGTCTAAACGACTCTGGCAACGGATATCTC  
 GGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCGAGAATCCCGTGAACCATCGA  
 GTCTTGAAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCGTTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGCGTCACACGTCGTTGC  
 CCCCCCGACCCCTTCGGGAGCCGGACGGGACGGATGATGGCCTCCCGTGTGCCCCGTACGGGTTGGCA  
 TAAATACCGAGTCCTYGGCGACCGCGTCCGGCAATCGTGGTTGTCAAACCTCGGTGCCTTGTGCGTGC  
 GTGAGTCGATCGCGGGAC

Рис. 3. Последовательности клубники

AACCTGCCTAGCAGAACGACCCGAGAACTAGTTCAAAGCGGGGGATGAGGGTCTTGCCTGCCTTGTCCCT  
 TTATCTGGGGGGTTGCATTGCGTTCGCGAACCGACCCCTCCTGCGTACAAACGAACACCCGGCGCGAATTG  
 CGCCAAGGAACCTGAATGAGAGAGCGCGTCCCCGTTGCACCGGAAACGGTGCCTGGCGGGCGTCAT  
 CTTCAAATATGCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAAGCGAAATGC  
 GATACTTGGTGTGAATTGCGAGAACCATCGAGTCTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGG  
 CCGAGGGCACGCCTGCCTGGCGTCACACGTCGTTGCACCCCCACTACTCCCTCGGGATTGCGGGGTGCGGA  
 TGATGGCCTCCCGTACGCTCCGCGCGTTGGCATAAATACCAAGTCTCGGCGACGCCACGACAAT  
 CGGTGGTTGCAGAACCTCGGTTGCCCGTGTGCGGTGCGCATCGGGGCTGAAAAAATGCTTGGC  
 TCCGGCTTGGC

Рис. 4. Последовательности вишни

Разработка праймеров является самым ответственным звеном в ПЦР. Требуется подобрать такой фрагмент молекулы ДНК, который бы отличался генетической консервативностью и присутствовал бы только в исследуемом гене. При этом длина такого фрагмента должна составлять 15–30 нуклеотидов.

К выбранным участкам нуклеотидных последовательностей индивидуально подобрали праймеры, которые исключали бы перекрест при идентификации гена. Первыми выбрали праймеры с параметрами ПЦР для клубники, которые представлены на рисунке 5. Далее выбрали праймеры для идентификации вишни (рис. 6).

Нуклеотидный код (IUPAC)

5'- СТС СТС ССГ ГГА ГГС ГГА С -3'

**Перевёрнутая комплементарная цепь (5' → 3'): GTC CGC CTC CCG GGA GGA G**

5' модификация (если есть)      3' модификация (если есть)      Выберите тип олигонуклеотида  
            оДНК

50 нМ Праймер      Величина поглощения при 260 нм:

50 мМ Соли (Na<sup>+</sup>)      ОП расчитывается только для одноцепочечной ДНК или РНК

**Физические константы**

Длина:

Молекулярный вес:  (?)

Содержание GC:

1 мл раствора с ОП равной  при 260 нм является  микромолярным (?) и содержит  микрограмм(а) олигонуклеотида.

**Расчёт температуры плавления (T<sub>m</sub>)**

62 °C  
Простой метод (?)

68 °C  
С корректировкой по концентрации солей (?)

59 °C  
По алгоритму ближайших соседей (?)

**А**

Нуклеотидный код (IUPAC)

5'- ТСА СГС АСГ СГА САА ГГС -3'

**Перевёрнутая комплементарная цепь (5' → 3'): GCC TTG TCG CGT GCG TGA**

5' модификация (если есть)      3' модификация (если есть)      Выберите тип олигонуклеотида  
            оДНК

50 нМ Праймер      Величина поглощения при 260 нм:

50 мМ Соли (Na<sup>+</sup>)      ОП расчитывается только для одноцепочечной ДНК или РНК

**Физические константы**

Длина:

Молекулярный вес:  (?)

Содержание GC:

1 мл раствора с ОП равной  при 260 нм является  микромолярным (?) и содержит  микрограмм(а) олигонуклеотида.

**Расчёт температуры плавления (T<sub>m</sub>)**

55 °C  
Простой метод (?)

61 °C  
С корректировкой по концентрации солей (?)

58 °C  
По алгоритму ближайших соседей (?)

**Б**

Рис. 5. Универсальные праймеры для идентификации клубники: А – левый праймер; Б – правый праймер

Нуклеотидный код (IUPAC)

5'- CTC GGG GGG GTT GCA TTG CGT TCG CGC A -3'

Перевёрнутая комплементарная цепь (5' → 3'): TGC GCG AAC GCA ATG CAA CCC CCC CGA G

5' модификация (если есть) 3' модификация (если есть) Выберите тип олигонуклеотида  
оДНК

50 нМ Праймер Величина поглощения при 260 нм: 1

50 мМ Соли (Na<sup>+</sup>) ОП расчитывается только для одноцепочечной ДНК или РНК

**ПОСЧИТАТЬ!** **Поменять цепи** **BLAST2** **mfold**

**Физические константы**

Длина: 28  
Молекулярный вес: 8668.6 (?)  
Содержание GC: 68 %  
1 мл раствора с ОП равной 1 при 260 нм является 3.538 микромолярным (?) и содержит 30.7 микрограмм(а) олигонуклеотида.

**Расчёт температуры плавления (T<sub>M</sub>)**

69 °C  
Простой метод (?)  
77 °C  
С корректировкой по концентрации солей (?)  
70 °C  
По алгоритму ближайших соседей (?)

**A**

Нуклеотидный код (IUPAC)

5'- TGC GCG ACG ACC GCA CAC GAC GGG CA -3'

Перевёрнутая комплементарная цепь (5' → 3'): TGC CCG TCG TGT GCG GTC GTC GCG CA

5' модификация (если есть) 3' модификация (если есть) Выберите тип олигонуклеотида  
оДНК

50 нМ Праймер Величина поглощения при 260 нм: 1

50 мМ Соли (Na<sup>+</sup>) ОП расчитывается только для одноцепочечной ДНК или РНК

**ПОСЧИТАТЬ!** **Поменять цепи** **BLAST2** **mfold**

**Физические константы**

Длина: 26  
Молекулярный вес: 7976.2 (?)  
Содержание GC: 73 %  
1 мл раствора с ОП равной 1 при 260 нм является 3.595 микромолярным (?) и содержит 28.7 микрограмм(а) олигонуклеотида.

**Расчёт температуры плавления (T<sub>M</sub>)**

69 °C  
Простой метод (?)  
77 °C  
С корректировкой по концентрации солей (?)  
71 °C  
По алгоритму ближайших соседей (?)

**Б**

Рис. 6. Универсальные праймеры для идентификации вишни: А – левый праймер; Б – правый праймер

Выбранные универсальные непересекающиеся праймеры для определения методом ПЦР растительного сырья (клубники, вишни) представлены в таблице 2.

Таблица 2

**Универсальные праймеры для тест-системы ПЦР**

Наименование сырья	Длина, п.н.	Праймеры
Клубника	19	CTCCTCCGGGGAGGCAGGAC
	18	TCACGCACGCGACAAGGC
Вишня	28	CTCGGGGGGGTTGCATTGCGTTCGCGCA
	26	TGCGCGACGACCGCACACGACGGGCA

Таким образом, проанализированы нуклеотидные последовательности генов растительного сырья (клубники, вишни). С помощью компьютерного моделирования и анализа выбраны универсальные праймеры для идентификации методом ПЦР клубники и вишни.

### Литература

1. Голубев В.Н., Жиганов И.Н. Пищевая биотехнология. – М., 2001. – 124 с.
2. Лысенко Е.А. Современные методы молекулярной биологии: полимеразная цепная реакция. Стратегия подбора праймеров для анализа экспрессии генов. – М., 2011. – С. 75–96.
3. Методы ДНК-технологии для идентификации растительного сырья в молочных продуктах / А.Ю. Просеков, О.В. Мудрикова, А.В. Булавина [и др.] // Молочная промышленность. – 2011. – № 12. – С. 62–63.
4. Подлегаева Т.В., Просеков А.Ю. Методы исследования свойств сырья и продуктов питания: учеб. пособие. – Кемерово, 2004. – 101 с.
5. Просеков А.Ю., Бабич О.О., Сухих С.А. Современные методы исследования сырья и биотехнологической продукции. – Кемерово, 2013. – 183 с.
6. Просеков А.Ю., Бабич О.О. Генная инженерия: учеб. пособие. – М., 2010. – 216 с.
7. Рязанова О.А., Кириличева О.Д. Использование местного растительного сырья в производстве обогащенных продуктов // Пищевая промышленность. – 2005. – № 6 . – С. 72–73
8. Чепурна И.П. Идентификация и фальсификация продовольственных товаров. – М., 2007. – 448 с.



УДК 664.68

И.В. Мацейчик, И.О. Ломовский, А.В. Таюрова

### ПРИМЕНЕНИЕ ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ ОВСА И ПОРОШКОВ ИЗ МЕСТНОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ В ПРОИЗВОДСТВЕ МУЧНЫХ КОНДИТЕРСКИХ ИЗДЕЛИЙ

В статье рассматривается роль пищевых волокон в питании, возможность использования продуктов переработки овса и ягодных порошков инфракрасной сушки в качестве функциональных добавок, обоснованы функциональные свойства разработанных бисквитов и кексов.

**Ключевые слова:** пищевые волокна, овёс, облепиха, рябина, порошок, бисквит, кекс, функциональные свойства.

I.V. Matseychik, I.O. Lomovsky, A.V. Tayurova

### THE APPLICATION OF THE OAT PROCESSING PRODUCTS AND THE POWDER FROM THE LOCAL VEGETABLE RAW MATERIALS IN THE FLOUR CONFECTIONERY GOODS PRODUCTION

*The role of dietary fiber in the diet, the application possibility of the oat processing products and berry powders of the infrared drying as functional additives are considered, the functional properties of the developed sponge cakes and cupcakes are substantiated in the article.*

**Key words:** dietary fiber, oats, buckthorn, mountain ash, powder, sponge cake, cupcake, functional properties.

---

Развитие производства продуктов функционального назначения – одна из основных задач, определённых документом «Основы государственной политики Российской Федерации в области здорового питания на период до 2020 года» [1]. Мучные кондитерские изделия – перспективная основа для конструирования пищевых продуктов функционального назначения, так как являются излюбленным компонентом пищевого рациона россиян и отличаются низким содержанием витаминов, минеральных веществ, пищевых волокон, дефицит которых является серьёзной проблемой [2, 3]. В России проводятся исследования по совершенствованию их рецептур и технологий, обогащению незаменимыми микронутриентами, снижению калорийности за счёт использования новых природных источников сырья. Среди инновационных ингредиентов всё большее значение приобретают пищевые волокна [4]. Устойчивый недостаток их в суточном рационе чело-