

экономия электроэнергии – 48 %, что составляет 47,54 тыс. руб. в год; сокращение производственных площадей – на 10,41 м²; объем выпуска продукции увеличился на 150 %; годовой экономический эффект от внедрения ресурсосберегающей технологии составляет 775,22 тыс. руб.

На супы-пюре, приготовленные по ресурсосберегающей технологии, разработана необходимая нормативно-технологическая документация – технико-технологические карты, утвержденные руководителем предприятия. Данная группа кулинарной продукции рекомендована для широкого контингента потребителей и внедрена в супошной «Лаврушка» г. Красноярска.

Литература

1. Общественное питание в России. Современное состояние. Гигиенические проблемы. – URL: http://www.fcqsen.ru/14/documents/041104_Obshestv_Pitanie.html.
2. ГОСТ 30390-2013. Услуги общественного питания. Продукция общественного питания, реализуемая населению. Общие технические условия. – М.: Стандартинформ,

2014. – 13 с.

3. Андросова В.Д., Захарова Т.И. Супы. – М.: Экономика, 1986.
4. Гиль О.Б. Обоснование, разработка технологии, оценка качества первых и вторых блюд на основе крупяных бинарных композиций: дис. ... канд. техн. наук. – Владивосток, 2005.

Literatura

1. Obshhestvennoe pitanie v Rossii. Sovremennoe sostojanie. Gigenicheskie problemy. URL: http://www.fcqsen.ru/14/documents/041104_Obshestv_Pitanie.html.
2. GOST 30390-2013. Uslugi obshhestvennogo pitaniya. Produkcija obshhestvennogo pitaniya, realizuemaja naseleniju. Obshhie tehicheskie uslovija. – М.: Standartinform, 2014. – 13 s.
3. Androsova V.D., Zaharova T.I. Supy. – М.: Jekonomika, 1986.
4. Gil' O.B. Obosnovanie, razrabotka tehnologij, ocenka kachestva pervyh i vtoryh bljud na osnove krupjanyh binarnyh kompozicij. – Dissertacija, 2005. – 227 s.

УДК 664.857.3; 577.212.2

*Е.Ю. Колпаков, С.В. Глазков,
Д.В. Журавская-Скалова, А.В. Самойлов*

РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ФАЛЬСИФИКАЦИИ ГРАНАТОВОГО СОКА

*E.J. Kolpakov, S.V. Glazkov,
D.V. Juravskaya-Skalova, A.V. Samoylov*

THE DEVELOPMENT OF MOLECULAR-GENETIC METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF POMEGRANATE JUICE ADULTERATION

Колпаков Е.Ю. – асп., ст. науч. сотр. лаб. качества и безопасности пищевой продукции Всероссийского НИИ технологии консервирования, Московская область, Ленинский район, г. Видное. E-mail: kolpakov-e@yandex.ru

Глазков С.В. – вед. науч. сотр. лаб. качества и безопасности пищевой продукции Всероссийского НИИ технологии консервирования, Московская область, Ленинский район, г. Видное. E-mail: s.glazkov@outlook.com

Kolpakov E.Yu. – Post-Graduate Student, Senior Staff Scientist, Lab. of Quality and Safety of Food Products, All-Russian Research Institute of Technology of Conservation, Moscow Region, Leninsky District. Vidnoye. E-mail: kolpakov-e@yandex.ru

Glazkov S.V. – Leading Staff Scientist, Lab. of Quality and Safety of Food Products, All-Russian Research Institute of Technology of Conservation, Moscow Region, Leninsky District. Vidnoye. E-mail: s.glazkov@outlook.com

Журавская-Скалова Д.В. – вед. науч. сотр. лаб. качества и безопасности пищевой продукции Всероссийского НИИ технологии консервирования, Московская область, Ленинский район, г. Видное. E-mail: qdep@mail.ru

Самойлов А.В. – канд. биол. наук, зам. директора по инновациям Всероссийского НИИ технологии консервирования, Московская область, Ленинский район, г. Видное. E-mail: molgen@vniitek.ru

Zhuravskaya-Skalova D.V. – Leading Staff Scientist, Lab. of Quality and Safety of Food Products, All-Russian Research Institute of Technology of Conservation, Moscow Region, Leninsky District. Vidnoye. E-mail: qdep@mail.ru

Samoylov A.V. – Cand. Biol. Sci., Deputy-in-Chief Director on Innovations, All-Russian Research Institute of Technology of Conservation, the Moscow region, Leninsky District. Vidnoye. E-mail: molgen@vniitek.ru

Гранатовый сок пользуется большим спросом из-за своих антиоксидантных свойств. Высокая себестоимость гранатового сока по сравнению с соками винограда и яблока вводит в соблазн недобросовестного производителя, мотивируя его к фальсифицированию сока путем его разбавления более дешевыми соками. Наиболее распространенным методом обнаружения добавления яблочного или виноградного соков является исследование содержания яблочной и виноградной кислот при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии. Несмотря на популярность и распространенность метода, он имеет ряд недостатков. Разработка метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанная на видовой идентификации ДНК представителей растений видов яблоня домашняя и виноград культурный, позволит выявлять добавление соков этих видов растений в гранатовый сок, а также значительно снизить себестоимость анализа и разработать систему молекулярно-генетического контроля происхождения соковой продукции. Объекты исследования: гранатовый, яблочный и виноградный соки, а также их смеси с замещением основного компонента в объеме 5 %. Образцы соков получали из свежих плодов с последующей термической обработкой при 118 °С 5 минут. Выделение ДНК проводили методом осаждения ДНК на сорбенте. Путем анализа генных карт были выбраны и синтезированы видоспецифичные праймеры для *Vitis vinifera* и *Malus domestica*, подобраны и оптимизированы условия амплификации. По подобранным условиям, используя подобранные праймеры, было проведено исследование по выявлению нехарактерных ДНК в гранатовом соке. Доказана возможность применения ПЦР с целью выявления фальсификации

гранатового сока, связанной с его разбавлением яблочным или виноградным соками. Нижний предел обнаружения искомого компонента составляет до 5 % от общего объема.

Ключевые слова: молекулярно-генетические методы, ПЦР, амплификация, фальсификация, соки.

*Pomegranate juice is in high demand due to its well antioxidant activity. Due to high cost price of pomegranate juice among ones made from grape and apple, there is a great reason for its industrial adulteration. To find addition of the apple or grape juice there is most common method based on quantification the malic and tartaric acids by high-performance liquid chromatography (HPLS). But this method has some drawbacks. For identifying the presence of grape and apple juices in pomegranate one, development the polymerase chain-reaction method (PCR) based on selective DNA identification for plant species *Vitis vinifera* and *Malus domestica* is an effective way to decrease the analysis cost. As the research objects the pomegranate, apple and grape juices, as well as the mixes thereof with the main component substitution up to 5 %, were taken. The samples have been made from fresh fruit and then been heated 5 minutes at 118 °C. DNA extraction was carried out by precipitation on sorbent. Due to genome maps analysis the primers specific for *Vitis vinifera* and *Malus domestica* have been defined and synthesized. In accordance with them, the amplification conditions have been optimized. By selected conditions and with defined primers the investigation of indistinctive DNA presence in the pomegranate juice has been done. Moreover, the possibility of PCR applying for identification the adulteration of pomegranate juice by apple and grape ones has*

been proved. Lower limit of detection was less than 5 %.

Keywords: *molecular-genetic methods, PCR, amplification, adulteration, juice.*

Введение. Гранатовый сок пользуется большим спросом из-за своих полезных свойств. Исследования гранатового сока показали его высокие антиоксидантные свойства по сравнению с такими соками, как виноградный, апельсиновый или яблочный, и доказали положительное влияние на здоровье человека [1]. Высокая себестоимость гранатового сока по сравнению с соками винограда и яблока подталкивает недобросовестных производителей к его фальсифицированию. В связи с высоким спросом и ограниченными запасами сырья производитель прибегает к разбавлению сока с целью поддержания объемов производства. Фальсификация гранатового сока связана с замещением фруктового компонента и проводится путем добавления яблочного или виноградного сока [2].

Наиболее распространенным и эффективным методом обнаружения присутствия в гранатовом соке яблочного является исследование содержания яблочной кислоты. Помимо яблочного распространено добавление в него сока из красных сортов винограда, в качестве подсластителя и красящего вещества, идентичного природному цвету спелого граната. В обоих случаях исследования проводят при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с обращенной фазой (или ионно-обменным методом) с УФ-детектированием или детектированием на масс-спектрометре [3, 4]. Выявление внесения виноградного сока возможно также при помощи анализа аминокислот. В качестве маркера в данном методе выступает аминокислота пролин – нетипичная для плодов граната [5].

При всех достоинствах система ВЭЖХ имеет высокую стоимость, требует высоко квалифицированного персонала, тщательной пробоподготовки, наличие большого количества стандартных и калибровочных образцов. При этом количественная оценка не всегда может дать однозначный результат присутствия фальсификации соков, если объем замещения фруктового компонента не превышает 5 %. В свою очередь,

современные возможности молекулярно-генетического анализа позволяют выявлять присутствие посторонних соков благодаря высокой чувствительности.

Цель исследования: разработка метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выявления ДНК винограда и яблока в составе гранатового сока и в дальнейшем системы молекулярно-генетического контроля происхождения соковой продукции. Кроме этого, предполагается значительно снизить себестоимость анализов.

Для решения поставленной цели было необходимо решить следующие **задачи:**

- 1) подобрать видоспецифичные олигонуклеотидные праймеры;
- 2) подобрать и оптимизировать условия амплификации;
- 3) провести оценку метода путем испытаний подготовленных для исследования соков.

Объекты и методы исследования. В качестве объектов исследования использовали соки, полученные из зрелых плодов граната, яблока и винограда, смешивая их в различных пропорциях: сок гранатовый – 100 %; сок яблочный 100 %, сок виноградный – 100 %; сок гранатовый – 95 % плюс сок яблочный – 5 %; сок гранатовый – 95 % плюс сок виноградный – 5 %. Полученные образцы соков подвергали термической обработке при температуре 118 °С в течение 5 мин. Выделение ДНК проводили методом осаждения на сорбенте при помощи коммерческого набора «Универсальная пробоподготовка» (ООО «Лаборатория Изоген» Россия, Москва). Объем пробы для выделения ДНК составлял 150 мкл.

Анализ геномов проводили, используя базу данных NCBI – National Center for Biotechnology Information (Национальный центр биотехнологической информации) и программы BLAST – Basic Local Alignment Search Tool. Синтез праймеров осуществлялся ООО «Компания “Синтол”» (Россия, Москва).

Реакционную смесь для проведения ПЦР готовили с использованием набора реагентов «GenPak PCR Core» (ООО «Лаборатория Изоген», Россия, Москва). Амплификацию проводили при помощи программируемого амплификатора «ТерцикТМ» (ООО «ДНК-Технология», Россия, Москва).

Разделение продуктов амплификации проводили электрофоретически в 2 % агарозном

геле (ООО «Компания Хеликон», Россия, Москва) в ТВЕ-буфере (Fermentas, США) с добавлением бромистого этидия (ООО «Лаборатория Изоген», Россия, Москва). Ампликоны визуализировали при помощи трансиллюминатора УВТ-1 (ООО «Биоком», Россия, Москва) в ультрафиолетовом свете с длиной волны 360 нм и фотографировали.

Результаты исследования и их обсуждение. При разработке метода идентификации яблочного сока использовали олигонуклеотидные праймеры Mal_f и Mal_r, Mal_for и Mal_rew, подобранные нами путем изучения генома яблони домашней (*Malus domestica*). Нуклеотидные последовательности праймеров приведены в таблице 1.

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров для идентификации ДНК *Malus domestica*

Праймер	Нуклеотидная последовательность
Mal_f	TCT-TAC-CGA-ATA-GGT-CCA-AAA-C
Mal_r	GGC-TCT-ACC-CAT-TTA-TTC-ACT-C
Mal_for	GTA-CCG-TAA-GGT-TCA-ATA-GAT-G
Mal_rew	CAG-GTT-ACA-GTA-AAT-CCG-ATA-C

Разработку и оптимизацию условий реакции проводили с использованием ДНК, извлеченной из мякоти плода яблони. Параметры амплификации, общие для обеих пар праймеров, приведены в таблице 2, результаты представлены на рисунке 1.

Для разработки метода идентификации сока винограда мы использовали праймеры V1 и V2, Vv_f и Vv_r, подобранные нами путем изучения генома винограда культурного (*Vitis vinifera*). Нуклеотидные последовательности праймеров представлены в таблице 3.

Таблица 2

Параметры амплификации праймеров Mal_f и Mal_r, Mal_for и Mal_rew

Показатель	Md1	Md2	Md3
Перв. денатур.	94 °C – 4 мин	94 °C – 4 мин	94 °C – 4 мин
Амплификация (35 циклов):			
денатурация	94 °C – 30сек	94 °C – 30сек	94 °C – 30сек
отжиг праймеров	64 °C – 30 сек	60 °C – 30 сек	56 °C – 30 сек
элонгация	72 °C – 1 мин	72 °C – 1 мин	72 °C – 1 мин
Заключительная элонгация	72 °C – 5 мин	72 °C – 5 мин	72 °C – 5 мин

Таблица 3

Нуклеотидные последовательности праймеров для идентификации ДНК *Vitis vinifera*

Праймер	Нуклеотидная последовательность
V1	AAC-TCG-ATA-AAG-GAT-GAA-GGA-TAA
V2	CTG-AGA-CGG-ACA-CTA-TTT-CAC-AC
Vv_f	TTG-GAT-CCA-TCA-CTC-TTG-TTT-C
Vv_r	TTG-GTT-GAG-GGA-AAA-AGG-AAA-G

Подбор и оптимизацию условий реакции проводили с использованием образцов ДНК, извлеченных из соков, полученных из зрелых плодов винограда белого и красного сортов.

Параметры амплификации, общие для обеих пар праймеров, приведены в таблице 4, результаты амплификации представлены на рисунках 2 и 3.

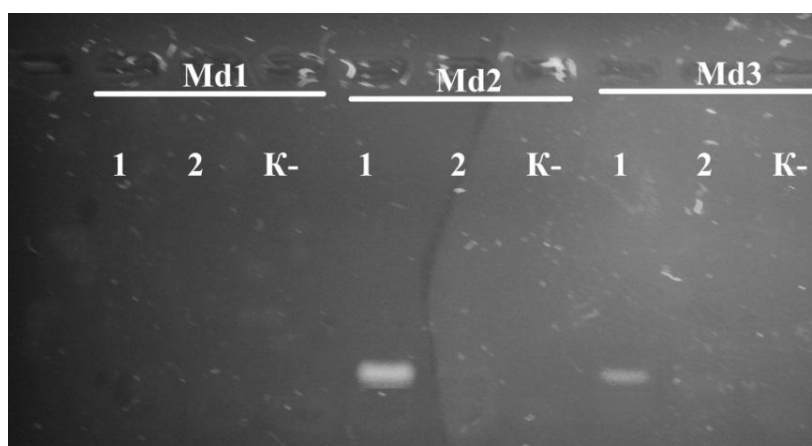


Рис. 1. Результаты амплификации с использованием праймеров *Mal_f* и *Mal_r*, *Mal_for* и *Mal_rew*: Md1, Md2, Md3 – программы амплификации; 1 – праймеры *Mal_f* и *Mal_r*; 2 – праймеры *Mal_for* и *Mal_rew*; (K-) – отрицательный контроль реакции

Подобранные условия позволяют идентифицировать ДНК яблока с использованием праймеров *Mal_f* и *Mal_r*. Результат реакции с использованием пары праймеров *Mal_for* и

Mal_rew оказался отрицательным. В дальнейших исследованиях мы применяли праймеры *Mal_f* и *Mal_r* и проводили амплификацию по программе Md2.

Таблица 4

Параметры амплификации праймеров V1 и V2, Vv_f и Vv_r

Показатель	V1	V2	V3
Первичная денатурация	95 °C – 4 мин	95 °C – 4 мин	95 °C – 4 мин
Амплификация (35 циклов):			
денатурация	94 °C – 30 с	94 °C – 30 с	94 °C – 30 с
отжиг праймеров	64 °C – 45 с	60 °C – 45 с	56 °C – 45 с
элонгация	72 °C – 45 с	72 °C – 45 с	72 °C – 45 с
Заключительная элонгация	72 °C – 5 мин	72 °C – 5 мин	72 °C – 5 мин

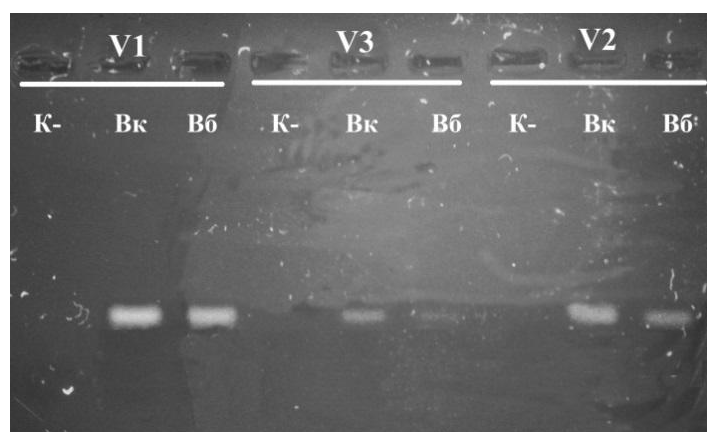
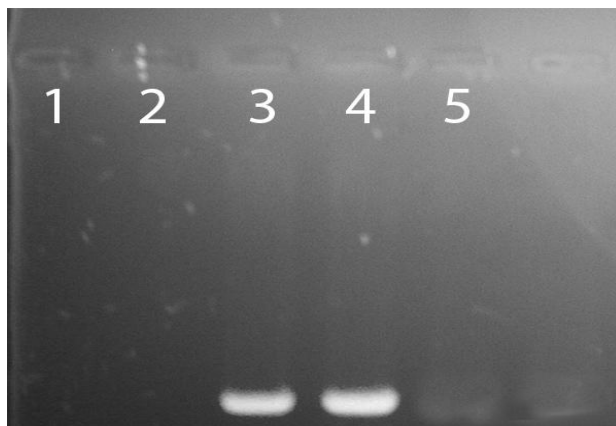


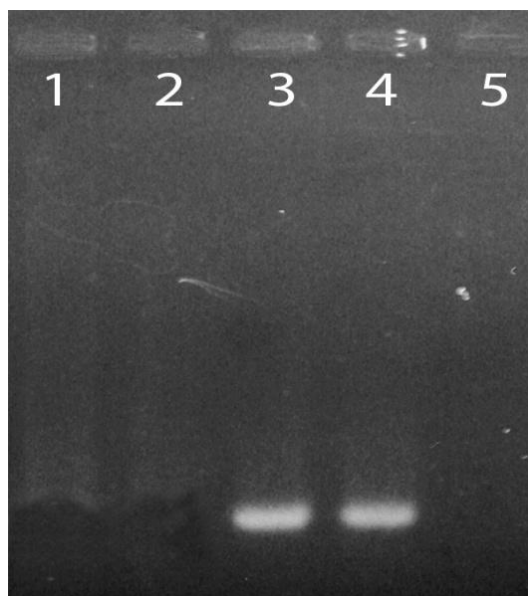
Рис. 2. Амплификация с применением праймеров *Vv_f* и *Vv_r*: V1, V2, V3 – наименования программ; (K-) – отрицательный контроль реакции; Vk – виноград красный, Bб – виноград белый

Пара праймеров V1 и V2 не вступили в реакцию с ДНК-матрицей и не образовали фрагментов; в то же время праймеры Vv_f и Vv_r оказались комплементарны ДНК как красного, так и белого винограда. Наилучшая визуализация ампликонов достигается при применении программы V1.

Используя подобранные и оптимизированные условия реакции, провели оценку возможности выявления фальсификации гранатового сока. Результаты амплификации представлены на рисунках 3 и 4.



*Рис. 3. Выявление добавления яблочного сока (5 % от общего объема):
1 – отрицательный контроль; 2 – сок гранатовый 100 %; 3 – сок яблочный 100 %;
4 – сок гранатовый 95 %; сок яблочный – 5 %; 5 – сок виноградный 100 %*



*Рис. 4. Выявление добавления виноградного сока (5 % от общего объема):
1 – отрицательный контроль; 2 – сок гранатовый 100 %; 3 – сок виноградный 100 %;
4 – сок гранатовый 95 %; сок виноградный – 5 %; 5 – сок яблочный 100 %*

Качественная реакция на присутствие ДНК яблока дала положительный результат только в пробах, содержащих яблочный сок. В образце, содержащем 100 % сока граната, продукты реакции не образуются. Качественная реакция на присутствие ДНК винограда также дала положи-

тельный результат только в пробах, содержащих виноградный сок. Таким образом, применение ПЦР с использованием подобранных праймеров и программ амплификации позволяет выявлять замену доли гранатового сока яблочным или виноградным в объеме до 5 %.

Выводы

1. Доказана возможность применения ПЦР с целью выявления фальсификации гранатового сока, связанной с его разбавлением яблочным или виноградным соками.

2. Нижний предел обнаружения искомого компонента составляет до 5 % от общего объема образца.

3. Путем анализа генных карт были выбраны и синтезированы видоспецифичные праймеры для *Vitisviniifera* и *Malusdomestica*.

4. Подобраны и оптимизированы условия амплификации.

Литература

1. Pomegranate juice is potentially better than apple juice in improving antioxidant function in elderly subjects / C. Guo, J. Wei, J. Yang [et al.] // Nutr. Res. – 2008. – Vol. 28. – P. 72–77.
2. A new method for standardization of health promoting pomegranate fruit (*punicagranatum*) extract / D.M. Jimenez, A. Ramazanov, S. Sikorski [et al.] // Georgian Med. News. – 2006 – P. 70–77.
3. Krueger D.A. Composition of Pomegranate Juice // J. AOAC Int. – 2012. – Vol. 95 – P. 63–68.

4. Erk T., Bergmann H., Richling H. A novel method for quantitation of quinic acid in food using stable isotope dilution analysis // J. AOAC Int. – 2009. – Vol. 57. – P. 1119–1126.
5. Velioglu S., Unal C., Cemeroglu B. Chemical characterization of pomegranate juice // Fruit Process. – 1997. – Vol. 7. – P. 307–310.

Literatura

1. Pomegranate juice is potentially better than apple juice in improving antioxidant function in elderly subjects / C. Guo, J. Wei, J. Yang [et al.] // Nutr. Res. – 2008. – Vol. 28. – P. 72–77.
2. A new method for standardization of health promoting pomegranate fruit (*punicagranatum*) extract / D.M. Jimenez, A. Ramazanov, S. Sikorski [et al.] // Georgian Med. News. – 2006 – P. 70–77.
3. Krueger D.A. Composition of Pomegranate Juice // J. AOAC Int. – 2012. –Vol. 95 – P. 63–68.
4. Erk T., Bergmann H., Richling H. A novel method for quantitation of quinic acid in food using stable isotope dilution analysis // J. AOAC Int. – 2009. – Vol. 57. – P. 1119–1126.
5. Velioglu S., Unal C., Cemeroglu B. Chemical characterization of pomegranate juice // Fruit Process. – 1997. – Vol. 7. – P. 307–310.

