

СУЧАСНІ МЕТОДИ ВИЯВЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ БІЛКІВ СОЇ У М'ЯСНИХ ВИРОБАХ

О. М. Щербентовська

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок

У статті описана методика конкурентного непрямого імуноензимного аналізу, за допомогою якої можна виявляти білки сої у м'ясних напівфабрикатах і готових м'ясних виробів. В основі визначення білків сої у м'ясних фаршах або напівфабрикатах конкурентним дот-блот імуноензимним аналізом (ІЕА) покладена конкуренція у зв'язуванні попередньо мічених кролячих антитіл, моноспецифічних до білків сої з антигенами (білками сої), які знаходяться в м'ясному фарші із антигенами (цими ж білками), що у відомій кількості попередньо сорбовані на поверхні нітроцелюлозної мембрани. У випадку, коли досліджувані зразки не містять білків сої, відбувається зв'язування антитіл (утворення імунних комплексів), які знаходяться в інкубаційному розчині з білками сої (антигенами), сорбованими на мембрані.

Вступ України до СОТ зобов'язує державну ветеринарну та санітарну служби удосконалювати контроль м'ясних виробів та напівфабрикатів на стадіях виробництва, переробки, зберігання, транспортування та реалізації. Стандарти країн ЄС передбачають проведення досліджень м'ясних виробів на предмет установаження фальсифікації [11, 14]. Тому фахівцям лабораторій контролю за якістю та безпечністю продуктів харчування, слід впроваджувати нові, високочутливі методи контролю, а також розробляти критерії, які б підтверджували відповідність м'ясної продукції міжнародним стандартам [2, 9, 15]. До таких критеріїв якраз відносять виявлення білків рослинного походження, зокрема сої, у м'ясних виробів (виготовлених з дрібно змеленого м'яса), а також їх ідентифікацію як за фізичними, так і за морфологічними показниками [5–7].

На сьогоднішній день додавання рослинних компонентів до м'ясних виробів є звичайною практикою, що, в основному, пов'язано із технологічною та економічною доцільністю. Вміст білка в насінні сої, із якого отримують, наприклад, соєве борошно, в середньому коливається від 30 до 45 %, що робить привабливим його використання як білкової добавки при виробництві м'ясних виробів різних сортів [3, 8]. Використання соєвих високобілкових продуктів у якості функціональних інгредієнтів дозволяє утворювати стабільну м'ясну емульсію, яка здатна утримувати слабо зв'язану воду і жир при нагріванні і, як наслідок, отримувати готову продукцію щільної та пружної консистенції. Використання соєвих білків при виготовленні ковбас, сосисок, сардельок та іншої м'ясної продукції не потребує додаткових складних процесів і не призводить до зміни традиційних технологічних схем виробництва [1, 2]. Негативною стороною цієї добавки є те, що білки сої часто слугують причиною алергій (ідіосинкразій) у людей і, головним чином, у дітей [10, 12, 15]. Крім того, продукти переробки сої часто використовують для фальсифікації м'ясних виробів і напівфабрикатів, що вимагає ретельного контролю за їх якістю [7].

При технологічній обробці соєвого борошна отримують продукти з високим вмістом повноцінних білків, проте і в цьому випадку трапляються фальсифікації не тільки складників кінцевого м'ясного продукту, а й складників — порошкоподібних соєвих продуктів. Так, ізольований соєвий білок і текстурований соєвий білковий продукт часто «забруднені» дешевшим і нижчим за якістю соєвим борошном або концентратом.

Отже, для ефективної роботи ветеринарно-санітарних експертів необхідно мати широкий спектр методів контролю, за допомогою яких можна було б виявляти не тільки фальсифікації напівфабрикатів і готових м'ясних виробів, а й самих білкових інгредієнтів, які вводять із метою покращення їх фізичних та органолептичних характеристик.

Метою нашої роботи було апробувати розроблений непрямий конкурентний метод імуноензимного аналізу (ІЕА) для моніторингу наявності білків сої у м'ясних виробках та напівфабрикатах, а також, застосувавши гістологічний метод виявлення рослинних компонентів у м'ясних напівфабрикатах, ідентифікувати вид соєвих інгредієнтів.

Матеріали і методи. Принцип конкурентного імуноензимного дот-блот аналізу ґрунтується на утворенні імунних комплексів попередньо біотинільованих антитіл із білковими антигенами сої, які у відомій концентрації сорбовані на нітроцелюлозній мембрані. Кількість антитіл, зв'язуваних із антигенами сої, сорбованими на мембрані, залежить від присутності в інкубаційному розчині, який містить певну кількість антитіл (стадія імунокон'югації), білкових антигенів сої. Якщо в інкубаційній суміші (екстракт із м'ясних виробів чи напівфабрикатів) білків сої не міститься, тоді відбувається зв'язування антитіл із білковими антигенами на нітроцелюлозній мембрані (негативний тест). Утворення комплексів антиген-антитіло виявляється інкубацією мембрани із кон'югатом авідин-пероксидази (реагент, що володіє високою спорідненістю до біотинільованих антитіл), як жовто-коричневі плями на білому або світло-жовтому фоні після фарбування мембрани у розчині 2,3-діамінобензидин/ H_2O_2 . За умов, коли інкубаційна суміш крім білків м'яса також містить білки сої, на стадії імунокон'югації відбувається конкуренція у зв'язуванні із антитілами антигенів сої розчину із антигенами сої, сорбованими на нітроцелюлозній мембрані, що виявляється у вигляді суттєвого зниження (або відсутності) зафарбованих плям на мембрані після її обробки реагентом авідин-пероксидази і наступного фарбування (позитивний тест).

Для апробації методу конкурентного непрямого ІЕА виявлення білків сої у м'ясному фарші моделювали зразки у таких співвідношеннях: соя/м'ясний фарш: (-) – контроль (забуферений фізіологічний розчин (ЗФР)), фарш – (м'ясний фарш без білків сої), 9:1 – (9 частин фаршу + 1 частина соєвого борошна), 7:3 – (7 частин фаршу + 3 частини соєвого борошна), 5:5 – (5 частин фаршу + 5 частин соєвого борошна), 3:7 – (3 частини фаршу + 7 частин соєвого борошна).

Для гістологічного дослідження відповідні взірці м'ясних фаршів фіксували у 10 % нейтральному розчині формаліну. Після цього фіксований матеріал зневоднювали у ряді розчинів спирту з висхідними концентраціями (70, 80, 90, 96°), ущільнювали у двох порціях хлороформу та заливали в парафін. На санному мікротомі виготовляли зрізи, завтовшки від 5 мкм до 15 мкм, які фарбували гематоксиліном та еозином [4]. Світлову мікроскопію і мікрофотографування гістопрепаратів здійснювали за допомогою мікроскопа OLYMPUS CX 41 та фотокамери OLYMPUS C-5050.

Результати й обговорення. Для отримання антигенів проводили імунізацію кролів білками соєвого борошна. Білки екстрагували із 3 г борошна сої (Shanpong sinoglory, Китай) 10 мл забуференого фізіологічного розчину впродовж 3 год. за температури 23 °С, постійно перемішуючи. Екстракт відділяли від осаду центрифугуванням при 5000 об/хв. протягом 10 хв. і білки осаджували додаванням сухого сульфату амонію до виникнення мутного розчину. Розчин центрифугували при 15000 об/хв. упродовж 10 хв. і осад білків сої (антигенів) діалізували впродовж 18 год. проти ЗФР. Діалізат повторно центрифугували при 15000 об/хв. упродовж 10 хв. і концентрацію білка визначали на спектрофотометрі при довжині хвилі 280 нм. Аналіз екстрагованих білків проводили за допомогою електрофорезу в 12 % поліакриламідному гелі в присутності 0,1 % натрію додецилсульфату (ДДС-Na) (рис. 1).

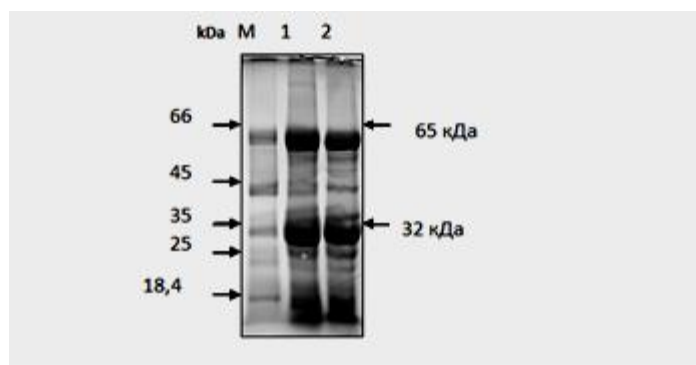


Рис 1. Електрофорез у 12 % поліакриламідному гелі в присутності 0,1 % ДДС-На білків сої, екстрагованих із соєвого борошна в ЗФР (М – маркери молекулярних мас білків, 1, 2 – білки, екстраговані в ЗФР із 2-х зразків борошна сої)

Для імунізації використовували 2 кролів-самців вагою 2–3 кг, яким вводили препарати екстрагованих білків сої в присутності 50 % ад’юванту Фрейнда (Difco. Lab., США). Тварин імунізували шляхом шести підшкірних ін’єкцій вздовж хребта по 0,1 мл розчину, який містив 20 мкг антигену в повному ад’юванті Фрейнда. Через 2 та 4 тижні робили повторні імунізації такою ж кількістю антигену в неповному ад’юванті. Вчетверте кролів імунізували ще через 2 тижні цією ж кількістю антигену, розчиненому в ЗФР за відсутності ад’юванту. Через 10 діб після останньої імунізації із вухної вени забирали кров, отримували сироватку і аналізували її на наявність антитіл до білків сої методом дот-блот імуноензимного аналізу.

Наступним етапом дослідження була очистка моноспецифічних антитіл (мАТ) із сироватки крові імунізованих кролів афінною хроматографією на колонці із кон’югованими на сефарозі білками сої. Для отримання афінного сорбенту використовували BrCN-активовану сефарозу (Sigma-Aldrich, США). Кон’югацію білків до носія проводили згідно з рекомендаціями фірми-виробника. Для очистки мАТ, 2 мл сироватки крові кролів інкубували з 1 мл афінного сорбенту впродовж 1 год. за температури 23 °С при постійному перемішуванні. Після цього сорбент вносили в колонку (0,5x5 см) і промивали ЗФР. Білки з колонки елюювали 0,1 М гліцин-НСІ буфером, рН 2,6, нейтралізували 1,5 М трис-НСІ, рН 8,8 і діалізували 18 год. проти ЗФР (рис. 2). Титр мАТ до білків сої визначали методом ІЕА.

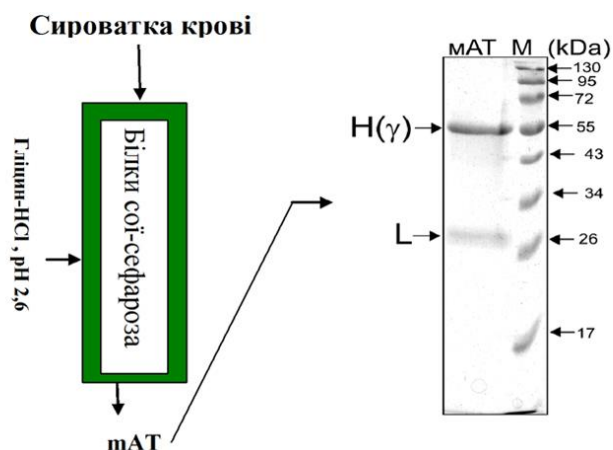


Рис. 2. Афінна очистка моноспецифічних антитіл класу IgG (мАТ) із сироватки крові кролів на колонці сефарози, кон’югованій білками сої (М – маркери молекулярних мас білків. Стрілками зліва вказано положення важких (H (γ)) і легких (L) ланцюгів антитіл на гелі)

Після цього проводили біотинілювання моноспецифічних АТ за реакцією ацетитилювання із використанням гідрокси-сукцинімідного ефіру біотину (Sigma-Aldrich, США) за методикою, запропонованою фірмою-виробником. Гідрокси-сукцинімідний ефір

біотину (NHS-D-Біотин) розчиняли в диметилформаїді (50 мг/мл) або диметилсульфоксиді (30 мг/мл) і зберігали при мінус 20 °С. Для кон'югації, моноспецифічні антитіла сироватки крові імунізованих кролів діалізували проти 0,1 М карбонатного буферу, рН 9,5. До розчину білка (20 мг/мл) додавали NHS-D-Біотин (22 мг/мл) та інкубували впродовж 4 год. при кімнатній температурі. Біотинільовані антитіла діалізували протягом 18 год. проти ЗФР при кімнатній температурі.

Титр антитіл визначали методом дот-блот імуноензимного аналізу. Нітроцелюлозну мембрану Sinrog № 9 (Chemarol, Чехія) розрізали на смужки довжиною 7 см і шириною 0,5 см. Білки сої (вихідна концентрація 8 мг/мл) розбавляли в ЗФР шляхом експоненціального розведення і наносили на мембранні смужки по 2 мкл на точку. Смужки висушували при кімнатній температурі, після чого обробляли 3 % розчином бичачого сироваткового альбуміну (БСА) в ЗФР у присутності 0,05 % детергенту Twin 20 протягом 1 год. за температури 23 °С.

Для визначення титру антитіл сироватку крові імунізованих кролів розводили ЗФР у співвідношенні 1:100. Смужки мембран із сорбованим антигеном поміщали в кювети, заливали 3 мл розведеної антисироватки і інкубували впродовж 1 год. при 23 °С. Стріпи відмивали 3 рази по 5 хв. в ЗФРТ (ЗФР + 0,05 % Twin 20) і інкубували впродовж 1 год. при 23 °С з кон'югатом авідин–пероксидази хрону (Sigma-Aldrich, США), розведеними ЗФР у співвідношенні 1: 10 000. По закінченні інкубації смужки відмивали 3 рази по 5 хв. в ЗФРТ після чого зафарбовували в розчині діамінобензидин/Н₂О₂. Реакцію фарбування зупиняли додаванням 0,1 % Н₂SO₄. Зафарбовані мембрани висушували і сканували на сканері HP Scanjet G4050 (рис. 3).

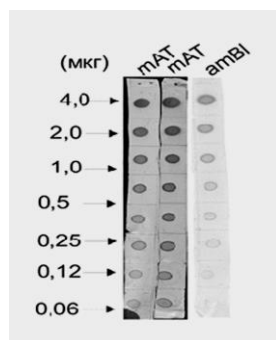


Рис. 3. Визначення титру біотинільованих антитіл, афінно очищених із сироватки крові імунізованих кролів (mAT). 1, 2 – mAT- у розведенні 1:500 (смужки обробляли кон'югатом авідин-пероксидази хрону у розведенні 1:10000). Кількість антигена (білки сої) нанесеного на мембрану (показано стрілками), amBl – смужка мембрани, зафарбована фарбою Amidoblack 10B

Для отримання стандартних зразків білки сої екстрагували із борошна впродовж 18 год. при 4 °С в ЗФР, після чого осаджували додаванням сухого сульфату амонію до виникнення мутного розчину. Розчин білка центрифугували при 10 тис. об./хв. протягом 10 хв. і осад діалізували впродовж 18 год. проти ЗФР. Діалізат повторно центрифугували і визначали концентрацію білка (спектрофотометрично при 280 нм). Білок (2 мкл) наносили на нітроцелюлозну мембрану шляхом експоненціального розведення. Мембрани висушували і блокували 3 % БСА в ЗФР в присутності 0,05 % Twin 20.

Смужки мембран (стріпи), із попередньо нанесеними на них у відомій концентрації білками сої, поміщали в кювети, розміром 1x12 см і заливали 1 мл ЗФР. У кювети додавали одночасно 100 мкл досліджуваних зразків (екстрактів м'ясних фаршів) і 5 мкл біотинільованих антисоевих АТ і інкубували впродовж 1 год. при кімнатній температурі (рис. 4). Стріпи відмивали 3 рази по 5 хв. в ЗФР і інкубували 1 год. з кон'югатом авідин-пероксидази хрону (1:10000). По закінченню часу інкубації стріпи відмивали 3 рази по 5 хв. в ЗФР в присутності 0,05 % детергенту Twin 20 і фарбували в розчині діамінобензидин/Н₂О₂. Зафарбовані мембрани висушували і сканували на сканері HP Scanjet G4050.

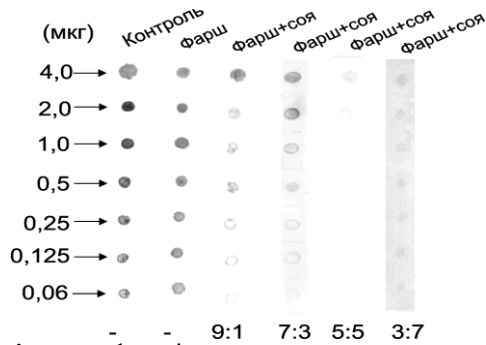


Рис. 4. Виявлення білків сої у м'ясному фарші методом конкурентного непрямого ІЕА. Співвідношення соя/м'ясний фарш : (-) - контроль (ЗФР), фарш - (м'ясний фарш у відсутності білків сої), 9:1 – (9 частин фаршу + 1 частина соєвого борошна), 7:3 – (7 частин фаршу + 3 частини соєвого борошна), 5:5 – (5 частин фаршу + 5 частин соєвого борошна), 3:7 - (3 частини фаршу + 7 частин соєвого борошна).

Отже, в основу визначення білків сої у м'ясних фаршах або напівфабрикатах конкурентним дот-блот імуноензимним аналізом (ІЕА) покладена конкуренція у зв'язуванні попередньо мічених кролячих антитіл, моноспецифічних до білків сої з антигенами (білками сої), що знаходяться в досліджуваному зразку із антигенами (цими ж білками), які у відомій кількості попередньо сорбовані на поверхні нітроцелюлозної мембрани. До білкового екстракту додавали антитіла й інкубували із мембранними смужками на які попередньо були сорбовані білки сої. У випадку, коли досліджувані зразки не містили білків сої відбувалось зв'язування антитіл (утворення імунних комплексів), які знаходились у інкубаційному розчині із білками сої (антигенами) сорбованими на мембрані. Імунні комплекси виявляли за пероксидазною реакцією після обробки мембрани кон'югатом авідн-пероксидази (реагент, який із високою вибірковістю зв'язується із біотинільованими антитілами).

Наступним етапом наших досліджень була ідентифікація та встановлення гістологічної будови білків сої методом мікроструктурного дослідження.

Прагнучи при найменших затратах отримати найбільший зиск, підприємці часто замінюють у м'ясних фаршах високосортне м'ясо, грудинку, ошийки продуктами сої, м'ясом механічного обвалювання, субпродуктами тощо. У м'ясній промисловості важливе місце займають білкові добавки, утворені в результаті переробки сої, які вводять до складу різних ковбасних виробів, м'ясних напівфабрикатів у вигляді ізольованого соєвого білка, соєвого борошна, соєвого білкового концентрату або текстурованого соєвого білка, кожен з яких має своє функціональне навантаження та ціну.

При гістологічному дослідженні м'ясних фаршів із внесеним соєвим борошном, їх ідентифікували як групу клітин із вираженою еозинофільною цитоплазмою, а самі клітини розділені між собою не зафарбованими прошарками целюлози (рис. 5, 6).

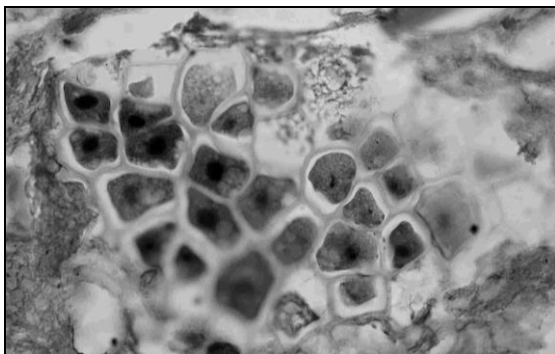


Рис. 5. Клітини соєвого борошна у модельному фарші. Гематоксилін та еозин. Ок. 10, об. 40

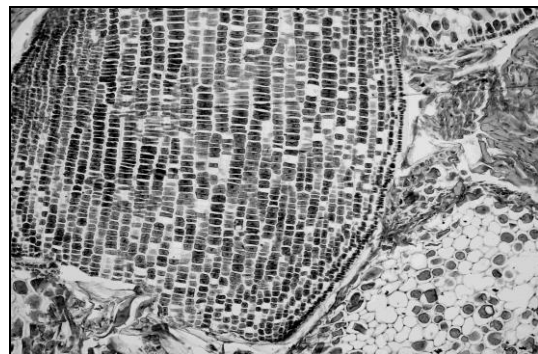


Рис. 6. Соєве борошно у модельному фарші. Поздовжнє розміщення клітин. Гематоксилін та еозин. Ок. 10, об. 20

Клітини сої, на гістопрепаратах можуть бути орієнтовані як в поперечному, так і в поздовжньому напрямках відносно осі клітин. При цьому вони зберігають округлу чи овальну-циліндричну форму.

Залежно від способу технологічної обробки соєвого продукту морфологічні особливості соєвого борошна будуть змінюватись, проте диференціювати їх можливо.

В И С Н О В К И

Незважаючи на окремі позитивні властивості соєвих білкових інгредієнтів, використання їх у м'ясній промисловості часто піддається різкій критиці. Це, як правило, пов'язано з тим, що виробники та постачальники не завжди гарантують якість та відсутність фальсифікації самого продукту. Світове занепокоєння викликає також проблема біологічної безпеки цього продукту для людей, оскільки соя та її похідні, окрім того, що є достатньо сильним алергеном, виготовляється із генетично модифікованих рослин, а відповідний контроль за їх якістю в Україні ретельно не проводиться. Тому постійні перевірки за показниками безпеки та якості соєвих білкових інгредієнтів, а також продуктів які містять в своєму складі сою, потрібно проводити як інструментальними методами, для встановлення можливостей наявності ГМО, так і новими — імуноензимним та мікроструктурним методом із метою отримання ширшої інформації про якість та склад м'ясопродуктів.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати будуть використані при розробці нових методів контролю якості м'яса та м'ясопродуктів.

MODERN DETECTION AND IDENTIFICATION METHODS OF SOYBEAN PROTEIN IN MEAT PRODUCTS

O. M. Shchebentovska

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives

S U M M A R Y

The article describes the method of competitive indirect immune enzyme analysis that can help to detect protein in meat half-finished products and finished meat products. The detection of soybean protein in meat forcemeat or half-finished products by means of competitive dot-blot indirect immune enzyme analysis is based on competition in binding of previously tagged rabbit antibodies that are mono-specific to soybean protein with antigens (soybean protein) that are contained in forcemeat with antigens previously absorbed on the surfaces of nitrocellulose membrane. In case of presence of soybean protein in tested samples antibody binding is observed (immune complex creation) located in incubation solution with soybean protein (antigens) absorbed on membrane.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ БЕЛКОВ СОИ В МЯСНЫХ ИЗДЕЛИЯХ

O. H. Щебенцовская

Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье описана методика конкурентного иммуно-энзимного анализа, с помощью которой можно выявлять белки сои в мясных полуфабрикатах и готовых мясных изделиях. В

основе определения белков сои в мясных фаршах или полуфабрикатах конкурентным дот-блот иммуноэнзимным анализом (IEA) лежит конкуренция в связывании предварительно меченых кроличьих антител, моноспецифических к белкам сои с антигенами (белками сои), которые находятся в мясном фарше с антигенами (этими же белками), которые в известном количестве предварительно сорбированы на поверхности нитроцеллюлозной мембраны. В случае, когда исследуемые образцы не содержат белков сои, происходит связывание антител (образование иммунных комплексов), которые находятся в инкубационном растворе с белками сои (антигенами), сорбированными на мембране.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бём Р. Микроскопия мяса и сырья животного происхождения / Р. Бём, В. М. Плева // Пищевая промышленность, 1964. — 336 с.
2. Егоров А. М. Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров, А. П. Осипов, Б. Б. Дзаитиев. — М.: Высш. школа, 1991.— 288 с.
3. Коснырева Л. М. Товароведение и экспертиза мяса и мясных товаров / Л. М. Коснырева, В. И. Криштафович, В. М. Позняковский. — М.: Издательский центр «Академия», 2005. — 320 с.
4. Меркулов Г. А. Курс патологической техники / Г. А. Меркулов. — Л.: Медицина, 1969. — 423 с.
5. Пчелкина В. А. Новые подходы к определению состава порошковых добавок для мясной промышленности / В. А. Пчелкина, С. И. Хвыля, С. С. Бурлакова // Обеспечение продовольственной безопасности России через наукоемкие технологии переработки мясного сырья: 12 Междунар. научн. конф. памяти В. М. Горбатова. — М., 2009. — С. 236–240.
6. Пчелкина В. А. Разработка новых стандартов для идентификации растительных добавок в мясных продуктах / В. А. Пчелкина // Все о мясе, 2000. — № 1. — С. 33–35.
7. Хвыля С. И. Выявление растительных добавок в мясных продуктах / С. И. Хвыля // Мясные технологии, 2005. — № 6. — С. 18–19.
8. Хвыля С. И. Микроструктурный анализ, идентификация и фальсификация мясных продуктов / С. И. Хвыля // Пищевая промышленность, 1998. — № 5. — С. 68–70.
9. Belloque J. Analysis of soyabean proteins in meat products: a review / J. Belloque, M. C. Garcia, M. Torre, M. L. Marina // Crit. Rev. Food Sc. Nutr., 2002. — Vol. 42, № 5. — P. 507–532.
10. Bookwalter G. N. Soy protein utilization in food systems / G. N. Bookwalter // Adv. Exp. Med. Biol., 1978. — Vol. 105. — P. 749–766.
11. Carpenter A. B. Enzyme-linked immunoassays / A. B. Carpenter, N. R. Rose, J. D. Folds, H. C. Lane // Manual of clinical laboratory immunology, Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1997. — P. 20–29.
12. Cordle C.T. Soy Protein Allergy / C. T. Cordle // Incidence and Relative Severity, 2004. — Vol. 134(5). — P. 1213–1219.
13. Flores-Mungula M. E. Detection of adulteration in processed traditional meat products / M. E. Flores-Mungula, M. C. Bermudez-Almada, L. A. Vazquez-Moreno // J. Muscle Foods, 2000. — Vol. 11. — P. 319–325.
14. Giovannacci I. Species identification of meat products by ELISA / I. Giovannacci, C. Guizard, M. Carlier et al. // International Journal of Food Science & Technology, 2004. — Vol. 39, № 8. — P. 863–867.
15. Haeney M. R. Soya protein antibodies in man: their occurrence and possible relevance in coeliac disease / M. R. Haeney, B. J. Goodwin, N. Mike, P. Asquith / J. Clin Pathol., 1982. — Vol. 35. — P. 319–322.