


БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ

УДК 637.068

Використання ДНК-технологій для експертизи харчових продуктів

Димань Т.М. , Димань Н.О. 

Білоцерківський національний аграрний університет

 Димань Т.М. tetyanadyman@gmail.com



Димань Т. М., Димань Н. О. Використання ДНК-технологій для експертизи харчових продуктів. Збірник наукових праць «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва», 2023. № 2. С. 90–99.

Dyman T., Dyman N. Use of DNA technologies for the examination of foodstuff. «Animal Husbandry Products Production and Processing», 2023. № 2. PP. 90–99.

Рукопис отримано: 07.09.2023 р.

Прийнято: 22.09.2023 р.

Затверджено до друку: 23.11.2023 р.

doi: 10.33245/2310-9289-2023-182-2-90-99

Невід'ємною складовою системи управління в галузі харчової безпеки є експертиза харчових продуктів, яка базується здебільшого на фізичних, хімічних, фізико-хімічних та біохімічних методах досліджень. Прогрес в опануванні методів ДНК-діагностики став стимулом для розроблення і впровадження в лабораторну практику високочутливих методик оцінювання безпеки і якості харчових продуктів, основаних на методі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

За останні десятиліття попит на молекулярні інструменти для експертизи харчових продуктів, їх автентифікації та простежуваності значно зріс. Це пов'язано з тим, що законодавство в харчовому секторі стає дедалі жорсткішим, а ринкові стратегії спрямовано на оцінювання харчового ланцюга «від поля до столу» й забезпечення відповідності вибору споживачів їхнім очікуванням.

Представлено огляд перевірених і широко протестованих молекулярних підходів для експертизи харчових продуктів: метод PCR-RFLP, RAPD-PCR, SSR-PCR, RT-PCR. Описано також потенціал і перспективи найновіших технологій, таких як SNPs – одонуклеотидні поліморфізми, ізотермічна ампліфікація, цифрова ПЛР, повногеномне секвенування, меташтрихкування ДНК. Зазначені методи вирізняються високою продуктивністю, швидкістю і масштабуванням, уможливають дослідження біологічних систем на новому якісному рівні. Наведено приклади успішного використання зазначених методів для експертизи харчових продуктів рослинного і тваринного походження, їх автентифікації та простежуваності.

Широка панель молекулярних методів є потужним інструментом захисту як виробників, так і споживачів, забезпечуючи свободу вибору споживачам і підвищуючи прозорість систем виробництва харчових продуктів.

Ключові слова: ДНК-технології, полімеразна ланцюгова реакція, харчова безпека, експертиза харчових продуктів.

Постановка проблеми. Різке погіршення екологічної ситуації практично в усіх регіонах світу, пов'язане з антропогенною діяльністю, істотно вплинуло на якісний склад їжі і харчову безпеку. Гарантування безпеки і якості харчової продукції сьогодні має важливе соціально-медичне та соціально-економічне значення.

Однією із основних проблем охорони здоров'я та економіки є мікробна контамінація їжі. Цей чинник біологічної небезпеки переважає численні інші за кількістю потерпілих,

швидкістю розвитку захворювань, здатністю перетворювати доброякісну продукцію у непридатну для споживання у разі порушення умов зберігання.

Через їжу передається понад 200 хвороб бактеріальної, вірусної, паразитарної природи. За оцінками ВООЗ, щороку від цих хвороб потерпає приблизно 600 млн осіб (майже кожний 10-й мешканець планети) і 420 тис. помирає. Чисельність таких захворювань зростає в усьому світі, навіть у економічно розвинутих

країнах. Аліментарний шлях передавання збудників переважає під час спалахів гострих кишкових інфекцій у населення, а за деяких нозологій, наприклад сальмонельозу, є основним. У 2005–2015 рр. харчове походження мали 75 % випадків емерджентних інфекцій, і в подальшому їх приріст прогнозують саме за рахунок харчового шляху передавання [51].

Загрози мікробної контамінації харчової продукції зростають через глобальні антропогенні та техногенні впливи на навколишнє природне середовище, що призводить до глибоких змін якісних та кількісних характеристик мікробіоценозів. Зокрема, широке застосування антибіотиків, включаючи сільське господарство, прискорило еволюцію бактерій й призвело до появи резистентних штамів з підвищеною вірулентністю. Використання технологій холодильного зберігання, упакування без доступу повітря, мінімальної переробки сировини зумовило накопичення в їжі мало вивчених чи невласливих для конкретних локальностей бактерій, вірусів, плісневих грибів, токсинів, пріонів. Деякі патогенні бактерії та віруси можуть зберігати життєздатність роками, несучи в собі потенційну загрозу [4].

У сенсі нешкідливості та ефективності застосування важливе значення має дослідження технологічних мікроорганізмів та їх метаболітів. Наприклад, у молочній промисловості під час виробництва кисломолочних продуктів, сирів, кисловершкового масла для формування смаку і консистенції широко використовують молочнокислі бактерії. Останні допомагають також підтримувати свіжість продуктів шляхом пригнічення патогенної мікрофлори, що дає змогу зменшувати кількість штучних консервантів. Визначення справжності (автентифікація) заквашувальних та пробіотичних мікроорганізмів на кшталт *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, *S. thermophilus* – важливе завдання харчової галузі [26].

Для захисту здоров'я і життя населення створюються системи забезпечення мікробіологічної безпеки їжі, що базуються на нормативно-правових вимогах у санітарному, харчовому законодавстві і технічному регулюванні, гігієнічному нормуванні, державному нагляді і виробничому контролі продукції. Ці системи мають постійно удосконалюватися на основі нових знань у сфері біології, генетики мікробів з урахуванням їх мінливості, поведінки і виживання в процесі технологічної переробки і взаємодії з макроорганізмами.

Ще одна проблема харчової безпеки – фальсифікація харчових продуктів, що сприяло розвитку їх тестування не лише на рівні

наукових досліджень, а й на промисловому та правоохоронному рівнях для виявлення несумлінної поведінки виробників [40]. Яловичина, свинина, курятина, буйволятина та ін. – м'ясо, яке широко використовується у м'ясопереробній галузі, має важливе харчове, економічне та культурне/релігійне значення й водночас часто виявляється взаємно фальсифікованим у сирому та переробленому вигляді. Має місце також часткова підміна м'яса субпродуктами, молочними продуктами (сухим молоком) або рослинною сировиною (соєю, крохмалем, борошном, крупами, овочами) [32, 44]. Фальсифікацію м'ясної продукції може зумовлювати мимовільне перехресне забруднення, спричинене спільним використанням обладнання для переробки різних видів рослин і тварин [52]. З огляду на це важливо здійснювати ідентифікацію видової належності тваринних тканин у м'ясній сировині, подрібненій сировині у складі м'ясних напівфабрикатів та готових необроблених м'ясних виробів, а також тих, що зазнали термічної обробки.

Сьогодні як в Україні, так і в інших країнах світу актуальним є розроблення технологій харчових продуктів спеціалізованого призначення, спрямованих на профілактику та лікування аліментарно-залежних захворювань. До таких видів продуктів можна віднести, наприклад, безглютенові вироби, які призначені для людей, хворих на целиацію. Відтак, постає проблема щодо організації ефективного лабораторного контролю харчових продуктів на предмет умісту глютену та інших харчових алергенів, а також розроблення та впровадження програми їх моніторингу в харчових продуктах, надто в спеціальному дієтичному та дитячому харчуванні, коректного маркування цих продуктів та гармонізації українського законодавства з європейськими вимогами [16, 34].

Особливої уваги потребує присутність у харчовій продукції генетично модифікованих організмів (ГМО). Система гарантування безпеки ГМО та продукції з ГМО для населення в Україні фактично не діє. Державних реєстрів ГМО та продукції з ГМО не створено. Лабораторний контроль за обігом ГМО в країні здійснюється неналежним чином, оскільки відсутня уніфікована методологія досліджень, не визначено вимог до періодичності здійснення таких досліджень, відсутні сучасні, якісні й недорогі діагностикуми вітчизняного виробництва. Тим часом генетично модифіковані інгредієнти виявляють у багатьох вітчизняних продуктах, передусім у ковбасних виробів та м'ясних напівфабрикатах, кондитерській про-

дукції, яку виготовляють з використанням соєвих бобів та кукурудзи [33].

Невід'ємними складовими системи управління в галузі безпеки харчової продукції й фундаментальними компонентами ланцюга її постачання є простежуваність та автентифікація. Надійна система й методологія автентифікації та простежуваності може стати важливим інструментом захисту споживачів, зменшуючи ймовірність споживання фальсифікованих чи забруднених харчових продуктів, а також посилюючи контроль постачальників й безпеку виробничих процесів.

Розроблено й впроваджено широкий спектр аналітичних методів для простежуваності та автентифікації харчових продуктів. Тривалий час аналіз харчових продуктів базувався на фізичних, хімічних, фізико-хімічних та біохімічних методах, які потребують багато часу і мають низький рівень точності. Інструментальні аналізи, які зазвичай використовують у фізико-хімічних методах, мають систематичні помилки, пов'язані з використанням обладнання і реагентами, а також помилки на етапах пробопідготовки, зчитування результатів аналізу. Результати біохімічних тестів, що використовуються для ідентифікації та біотипування бактерій, можуть демонструвати мінливість через вплив чинників навколишнього середовища на експресію генів, низьку дискримінаційну здатність мікроорганізмів з низькою генетичною мінливістю, що призводить до помилкових інтерпретацій [52].

Сучасною тенденцією у харчовій галузі є розроблення діагностичних приладів для швидкої ідентифікації цільових аналітів у харчових продуктах. Нині дедалі активніше для оцінювання безпеки і якісного складу харчової продукції застосовують методи, основані на аналізі молекул ДНК. Прогрес в опануванні методів ДНК-діагностики став стимулом для розроблення і впровадження в практику високочутливих методик оцінювання якості та експертизи харчових продуктів, що базуються на методі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Незважаючи на зазначене вище, спостерігається значний дефіцит робіт з практичного застосування сучасних досягнень генетики, ДНК-технологій під час розроблення систем моніторингу показників безпечності та якості сільськогосподарської сировини та харчової продукції на всіх етапах їх виробництва.

Мета статті – представити основні молекулярно-генетичні методи, які використовують для експертизи харчових продуктів, їх простежуваності та автентифікації.

Метод полімеразної ланцюгової реакції

В основі ПЛР – багатократне збільшення кількості копій (ампліфікація) нуклеотидних фрагментів-мішеней ДНК ферментом Таq-полімеразою у присутності синтетичних олігонуклеотидних праймерів та дезоксирибонуклеозидтрифосфатів. Впродовж кількох годин можна виділити та розмножити певну послідовність ДНК у кількості, що перевищує вихідну в 10^8 разів [31].

Всі діагностичні системи, основані на ампліфікації нуклеїнових кислот, значно переважають інші методики за чутливістю і точністю. Метод ПЛР добре піддається автоматизації, забезпечуючи високу пропускну здатність, стандартність виконання процедури, зведення до мінімуму ризику помилок за рахунок суб'єктивного фактора. Результати ДНК-аналізу наглядні, вони легко документуються, що дає змогу зберігати й швидко надавати первинні матеріали експертизи. Це забезпечує високу достовірність даних, відтак підвищує цінність експертних висновків. На молекулярні методи не впливають зміни навколишнього середовища, умови зберігання, виробничий процес тощо [13].

За останні десятиліття попит на молекулярні інструменти для експертизи харчових продуктів, їх автентифікації та простежуваності значно зріс. Це пов'язано з тим, що законодавство в харчовому секторі стає дедалі жорсткішим, а ринкові стратегії спрямовано на оцінювання харчового ланцюга «від поля до столу» й забезпечення відповідності вибору споживачів їхнім очікуванням [13, 52].

Для аналізу харчових продуктів застосовують різні варіанти ПЛР та її модифікації: метод PCR-RFLP, що базується на поліморфізмі довжин рестрикційних фрагментів; метод RAPD, у результаті якого відбувається випадкова ампліфікація поліморфної ДНК; SSR-PCR – ампліфікуються мікросателітні або прості повтори послідовностей ДНК; RT-PCR – полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі; Nested-PCR – гніздова (вкладена) ПЛР; мультиплексна ПЛР та ін.

PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism – поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів, ПДРФ)

PCR-RFLP – спосіб дослідження геномної ДНК шляхом фрагментування ДНК за допомогою ендонуклеаз рестрикції і подальшого аналізу розмірів утворених фрагментів за використання методу гель-електрофорезу [37].

За допомогою RFLP було проаналізовано мітохондріальну ДНК різних видів риб і про-

ведено їх диференціацію. Фальсифікація деяких видів риб, зокрема лосося, дуже поширена, й рибопереробні підприємства потребують підтвердження, що рибна сировина, яку вони отримують, відповідає сертифікаціям постачальника. Дослідники розробили метод ампліфікації певної частини мітохондріальної ДНК й використали RFLP для її розрізнення. Для цього продукти ампліфікації гідролізували ендонуклеазою рестрикції і на основі поліморфізму рестрикційних фрагментів змогли ідентифікувати різні види риб [50].

У багатьох європейських країнах (Німеччина, Австрія, Швейцарія) проблему становить фальсифікація спельти (гексаплоїдний вид пшениці). Через невеликі обсяги вирощування її ціна досить висока, тому деякі постачальники змішують зерно спельти з зерном пшениці. Зазначені види морфологічно схожі, і їх не розрізняють під час контролю якості в багатьох харчових галузях. У зв'язку з цією проблемою для контролю автентичності вивчали поліморфізм гена гама-гліадину пшениці і спельти за використання поліморфізму рестрикційних фрагментів. Дослідники визнали метод досконалим для контролю якості зернових культур, насіння та чистоти сортів [30].

RAPD-PCR (random amplification of polymorphic DNA – випадково ампліфікована поліморфна ДНК)

У RAPD-PCR використовується як один, так і декілька праймерів. Продукт RAPD утворюється у результаті ампліфікації фрагмента геномної ДНК, фланкованої інвертованою послідовністю використовуваного праймера. Метод універсальний для дослідження різних видів за використання одних і тих самих праймерів. Зазвичай праймер, що виявляє високий поліморфізм для одного виду, буде ефективним і для інших [18].

За допомогою RAPD-PCR аналізували *Campylobacter spp.* у харчових продуктах та об'єктах довкілля [23], досліджували генетичну мінливість *Listeria monocytogenes* у харчових ізолятах [29].

Ефективність методу RAPD-PCR було доведено для ідентифікації свіжого м'яса, отриманого від різних видів тварин – великої рогатої худоби, кіз, овець, верблюдів, свиней, диких кабанів, ослів, котів, собак, кролів та ведмедів. Для цього дослідники використали декануклеотидний праймер ACGACCCACG. Тим часом ефективність методу для ідентифікації видів у м'ясних сумішах змінювалася залежно від складу суміші [1].

Молекулярні зонди на основі RAPD було використано для ідентифікації трьох видів яловичини – отриманої від великої рогатої худоби голштинської, ангуської та тайванської жовтої породи [27].

SSR-PCR (simple sequence repeats – прості повторювані послідовності)

Прості повтори послідовностей ДНК – це тандемні повторювані мотиви завдовжки 2–6 п. н., фланковані висококонсервативними послідовностями. Поліморфізм обумовлений різною кількістю повторів у мікросателітній ділянці і може бути легко виявлений за допомогою ПЛР [54]. Високий рівень поліморфізму зазначених послідовностей ДНК та висока відтворюваність методу сприяли тому, що SSR-PCR став найширше застосовуваним підходом у дослідженні агропродовольчої продукції, передусім для ідентифікації видів і сортів, виявлення фальсифікацій. Найпоширеніший підхід передбачає ампліфікацію ділянок ДНК, що становлять інтерес, з подальшим оцінюванням розмірів фрагментів (ампліконів) за допомогою капілярного електрофорезу. Більшої ефективності в аналізі ампліконів досягають за використання методу плавлення з високою роздільною здатністю (SSR-HRM). Останній підхід було використано, наприклад, для з'ясування сортового складу оливкової олії та винних сумішей, й вдалося визначити фальсифікат у межах від 1 до 2,5 % [9].

SSR було ефективно використано для оцінювання відповідності сортів малини [35], оливки [41] і навіть цукіні (виду, який вирізняється обмеженим сортовим різноманіттям) [46], відстеження моносортних і полісортних вин по всьому виробничому ланцюгу [53].

RT-PCR – полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі

Революцію в сенсі кількісного визначення та фрагментації ДНК і РНК здійснило розроблення ПЛР у реальному часі. Це потужний, високоточний і чутливий метод, який уможливорює визначення не тільки присутності цільової нуклеотидної послідовності в зразку, а й кількості її копій. Кількість ампліфікованої ДНК вимірюється після кожного циклу ампліфікації за допомогою флуоресцентних міток – зондів чи інтеркаляторів. Оцінювання може бути кількісним (визначення кількості копій матриці) та відносним (вимірювання відносно внесеної ДНК чи додаткових калібрувальних генів) [45]. Метод уможливорює автоматичну реєстрацію та інтерпретацію отриманих результатів. До переваг технології можна віднести

зменшення артефактів та часу на проведення аналізу, що досягається за рахунок відмови від гель-електрофорезу, а також підвищення специфічності.

Розроблено декілька варіантів RT-PCR, які різняться способами детекції результатів ПЛР: SYBR Green, TaqMan, з молекулярними маяками (molecular beacons), з MGB-зондами (minor groove binding, проба малої борозенки ДНК), з зондами Scorpion і Duplex Scorpion, з резонансним перенесенням енергії флуоресценції (FRET – fluorescence-resonance resonance energy transfer) та ін.[48].

Метод напівкількісної ПЛР (англ. semi-quantitative sqPCR) – це модифікований метод кількісної ПЛР. Його часто використовують для порівняння експресії декількох генів. У цьому випадку вимірюють кількість накопиченого продукту лише в одній точці – після завершення реакції [19].

Часто ПЛР в реальному часі комбінують з іншими методами, зокрема з ПЛР зі зворотною транскрипцією (RT-qPCR). Це варіант ПЛР, в якому один ланцюг РНК зворотно транскрибується в її комплементарну ДНК за допомогою ферменту резервної транскриптази. Отриману кДНК ампліфікують за допомогою ПЛР. Цей метод дає змогу виявляти низькі рівні експресії генів і полегшує створення бібліотек кДНК або клонування специфічних кДНК [8].

Метод RT-PCR зручний для визначення видової належності м'яса тварин у термічно обробленій продукції, оскільки уможливорює ідентифікацію навіть невеликих фрагментів ДНК, що збереглися після теплової обробки м'яса. Наприклад, завдяки цьому методу в дослідних сумішах вдалося ідентифікувати яловичину, що піддавалась термічній обробці, слідові кількості свинини, конини, баранини, курятини та індичатини. Рівень виявлення становив 0,05 %, кросреактивності з іншими дикими та свійськими тваринами не було виявлено [25].

В іншому дослідженні ПЛР зі зворотною транскриптазою та RT-PCR було використано для виявлення та кількісного визначення мРНК актину дріжджів та плісняви в йогуртах та пастеризованих молочних продуктах. Для цього було розроблено універсальні праймери на основі послідовностей актину грибів, що дало змогу ампліфікувати в ПЛР фрагмент розміром 353 п. н., притаманний для видів грибів, які спричиняють псування харчових продуктів [6].

Метод sqPCR та SYBR® Green-технологія методу ПЛР у реальному часі, було використано для визначення вмісту глютену в харчовій продукції [42]. За використання як мішеней генів *γ-hordein*, *gos9*, *helianthinin* та

acetyl-CoAcarboxylase було розроблено чотири незалежні TaqMan RT-PCR-системи для ідентифікації та кількісного оцінювання в продукції вмісту таких культур як ячмінь, рис, соняшник та пшениця [22]. З 2013 р. компанія R-Biopharm (Німеччина) розпочала виробництво лінійки комерційних наборів SureFood® Алерген для визначення харчових алергенів, зокрема глютену (SureFood® ALLERGEN QUANT Gluten) за допомогою TaqMan-технології RT-PCR. Набір дає змогу визначати від 1 до 400 мг алергенної речовини на кг харчового продукту [38].

SNPs (single nucleotide polymorphisms – однонуклеотидні поліморфізми)

Однонуклеотидні поліморфізми – це варіації послідовностей ДНК, що містять одну основу. Вони є найпоширенішими маркерами в будь-якому живому організмі, а їх діалельна природа забезпечує низький рівень помилок у визначенні алелів порівняно з іншими молекулярними маркерами. Крім того, ідентифікація SNP не потребує розділення ДНК за розміром й придатна для автоматизації, що значно збільшує швидкість і відтворюваність аналізу.

SNPs широко використовують у простежуваності харчових продуктів тваринного походження, зокрема для визначення видової належності м'яса [57].

У 2011–2015 рр. за використання панелі 54 SNP було диференційовано види мідій (*Mytilus spp.*) у 21 зразку харчових продуктів, придбаних у супермаркетах та на ринках Італії, Іспанії, Польщі та Німеччини. У 85 % випадків заявлена на етикетках харчових продуктів інформація відповідала результатам, отриманим за допомогою генетичних інструментів. У харчових зразках ідентифікували два види мідій: *M. edulis* і *M. galloprovincialis* (атлантичні та середземноморські форми) [49].

Стосовно простежуваності продукції рослинного походження SNPs використовували здебільшого для аналізу оливкової олії [5], диференціації сортів кави арабіки та робусти [43], ідентифікації сортів винограду у суслах та винах [7, 11].

Окремої уваги заслуговує система SNP-генотипування, що базується на використанні нанофлюїдних технологій. Ця система полягає у використанні інтегрованих рідинних контурів для високопродуктивної RT-PCR, що уможливорює аналіз декількох зразків за короткий час з використанням невеликих кількостей ДНК. Нанофлюїдний протокол SNP було успішно застосовано для виявлення фальсифікації сортів какао-бобів [14], дискримінації 40 сортів чаю [15], диференціації кавових зерен [55].

Цифрова ПЛР

Останніми роками розвиваються методи, основані на цифровій ПЛР (dPCR), які дають змогу набагато швидше і простіше виявляти забруднювальні речовини в харчових продуктах. dPCR уможливорює абсолютне кількісне визначення цільової нуклеїнової кислоти в зразку навіть за мізерної присутності її копій. Метод працює шляхом розділення фрагментів ДНК на тисячі окремих чипів, що дає змогу безпосередньо підрахувати кількість молекул-мішеней за допомогою пуассоновської статистики [12, 28]. Цифрову ПЛР ефективно використовують для моніторингу ГМО, ідентифікації різноманітних патогенів, виявлення харчових фальсифікацій. Наприклад, dPCR було успішно використано для виявлення наявності арахісових та соєвих алергенів у хлібобулочних виробах [13]. Дуплексний чиповий цифровий ПЛР-аналіз застосовано для ідентифікації й кількісного оцінювання присутності пшениці звичайної у всьому ланцюгу виробництва макаронних виробів. Точність якісного аналізу становила 0,3 %, кількісного – 1,5 % [13]. Дуплексна крапельна та чипова цифрова ПЛР продемонстрували ефективність під час кількісного визначення квасолі в пасті із насіння лотоса. Останню часто фальсифікують дешевшими інгредієнтами [13].

Методи, що базуються на ізотермічній ампліфікації

Дешевшою спрощеною альтернативою класичної ПЛР є методи, основані на ізотермічній ампліфікації, за останню декаду було розроблено низку таких методів. Вони забезпечують швидке й ефективне виявлення ДНК-мішені без використання термоциклера й уможливають експоненціальне збільшення копій певної ділянки ДНК чи РНК за постійної температури. Методи здебільшого використовують для виявлення різних мікроорганізмів і є зручним інструментом для контролю аліментарно залежних захворювань. Найпоширенішим серед зазначених методів є петельна ізотермічна ампліфікація (LAMP – loop mediated isothermal amplification), що використовує 4–6 різних праймерів, здатних розпізнавати 6–8 різних послідовностей цільової ділянки ДНК. Продуктами ампліфікації є шпильки ДНК з різними інвертованими цільовими повторами. Ці продукти можуть бути виявлені різними методами, включаючи аналіз у реальному часі [56]. Підхід було використано для підтвердження автентичності шафрану та виявлення його фальсифікатів, таких як сафлор і куркума [58], для виявлення ДНК гранату, яблука та винограду у свіжому фруктовому соку [24], виявлення сорту пшениці *Aureo* в зерні та борошні [10].

NGS (next generation sequencing – секвенування нового покоління)

Традиційне секвенування за методом Санджера за один раз дає можливість виявити певну ділянку ДНК розміром не більш як 900 п. н. Це відносно повільний і трудомісткий метод, що має високу вартість, потребу у високоякісній ДНК, обмеження за кількістю зразків, які можна проаналізувати одночасно. Ці чинники зумовили витіснення секвенування за Санджером технологіями секвенування нового покоління (NGS), які дають змогу «прочитати» одразу декілька ділянок геному. NGS здійснюють за допомогою повторюваних циклів подовження ланцюга, індукованого полімеразою, чи багатократного лігування олігонуклеотидів. У ході NGS може генеруватися до сотень мегабаз і гігабаз нуклеотидних послідовностей за один робочий цикл. Метод має високу продуктивність, швидкість і масштабування, уможливорює дослідження біологічних систем на новому якісному рівні [47].

Незважаючи на великий потенціал методів NGS, їх використання у сфері молекулярної простежуваності харчових продуктів наразі вкрай обмежене, передусім через високу вартість і потребу в значних обчислювальних потужностях. Якість виділеної із харчового продукту ДНК також має бути високою, чого не завжди можна досягти, особливо коли продукт піддавався глибокій переробці. Існує дві основні стратегії NGS: повногеномне секвенування та меташтрихкодування (метабаркодинг) ДНК [21].

Повногеномне секвенування (WGS) уможливорює сканування кількох видів одночасно, навіть якщо вони в невеликій кількості присутні в харчовій матриці. Метод доцільно використовувати для ідентифікації й характеристики складних мікробних спільнот у зразках харчових продуктів, некультивованих форм патогенних мікроорганізмів, а також джерел контамінації [2]. З високою специфічністю і чутливістю можна простежувати конкретні види і сорти у складі харчових продуктів, ідентифікувати заборонені види, аналізувати складні харчові матриці й виявлені зчитування співвіднести з відповідними організмами шляхом порівняння зі спеціальними базами даних [13].

Практичним втіленням зазначеної технології було розроблення програмного пайплайну під назвою AFS (All-Food-Seq) для кількісного аналізу видового складу харчових продуктів. Розробниками використано переваги глибокого секвенування тотальної ДНК, що дало змогу ідентифікувати види шляхом порівняння зчитувань з загальнодоступними референтними

геномними послідовностями, а також визначити пропорції кожного виду на основі підрахунку зчитувань послідовностей. Метод успішно застосовують для простежуваності та автентифікації різних харчових продуктів рослинного і тваринного походження [39].

Ще один приклад – розроблення біоінформатичного пайплайну FASER (Food Authentication from Sequencing Reads) для визначення складу еукаріотичних видів у харчових сумішах за допомогою секвенування РНК чи ДНК. Крім того, було розроблено базу даних, що включає понад 6000 рослин і тварин, які можуть бути присутніми у складі харчових продуктів. FASER виявився високочутливим і точним інструментом для виявлення шахрайських підмін чи забруднень у найрізноманітніших харчових матрицях [20].

За допомогою повногеномного секвенування вдалося ідентифікувати ДНК люпину під час аналізу печива, виготовленого із пшеничного борошна, в якому містилося 0,05 % люпинового борошна [36].

Підхід меташтрихкодування ДНК поєднує високопродуктивні стратегії секвенування зі штрихкодуванням ДНК, що уможливорює аналіз декількох ампліконів, які відповідають різним ділянкам штрих-коду, шляхом їх паралельного секвенування. Загальна стратегія базується на (1) виділенні тотальної ДНК із харчових продуктів, (2) ампліфікації певної ділянки штрих-коду розміром від 120 до 600 п. н., (3) секвенуванні відповідного амплікону, (4) аналізі послідовності за допомогою спеціальних пайплайнів. Ця стратегія особливо принагідна для аналізу високотехнологічних харчових продуктів, оскільки ДНК, виділена із таких матриць, зазвичай деградована, відтак ампліфікуються лише короткі ділянки [17]. Наявність декількох баз даних штрих-кодування ДНК рослин значно спрощує виявлення та ідентифікацію видів рослин.

Ефективність метабаркодингу ДНК було доведено, наприклад, під час досліджень поліфлорного та монофлорного меду – було не тільки ідентифіковано ботанічний склад меду, а й досліджено його географічне походження на основі генетичної характеристики складу пилку [3].

За використання NGS вдалося значно прискорити визначення повної послідовності мільйонів геномів організмів, починаючи від бактерій і завершуючи людиною. З'явилась реальна можливість одночасно оцінювати експресію тисяч генів в організмах, тканинах та поодиноких клітинах (секвенування транскриптомів), а також аналізувати регуляцію їх активності

(аналіз експресії мікро РНК та метилювання геному). Зазначені підходи реалізуються на секвенаторах нового покоління, основними виробниками яких є компанії Illumina, Thermo Fisher Scientific, Pacific Biosciences и Oxford Nanopore Technologies.

За останні дві декади було розроблено, комерціалізовано і продовжують розвиватися нові технології визначення послідовностей ДНК. В основу їх розроблення покладено прагнення до мініатюризації, автоматизації, збільшення обсягу отриманих даних, а також удешевлення процесу.

Висновки. Таким чином, молекулярно-генетичні методи становлять великий інтерес для здійснення експертизи харчових продуктів, їх ідентифікації та простежуваності. Можливість бути обізнаним про склад харчової продукції набуває дедалі більшого значення для споживачів. Широка панель молекулярних методів є потужним інструментом захисту як виробників, так і споживачів, забезпечуючи свободу вибору споживачам і підвищуючи прозорість систем виробництва харчових продуктів, що дає змогу чесним виробникам належним чином просувати свою продукцію.

REFERENCES

1. Arslan, A., Ilhak, I.O., Calicioglu, M., Karahan, M. (2005). Identification of meats using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. *Journal of Muscle Foods*, 16 (1), pp. 37–45. DOI:10.1111/j.1745-4573.2004.07504.x
2. Beck, K. L., Haiminen, N., Chambliss, D., et al. (2021). Monitoring the microbiome for food safety and quality using deep shotgun sequencing. *NPJ Sci Food*. 5 (3). DOI:10.1038/s41538-020-00083-y.
3. Beltramo, C., Cerutti, F., Brusa, F., Mogliotti, P., et al. (2021). Exploring the botanical composition of polyfloral and monofloral honeys through DNA metabarcoding. *Food Control*, 128. DOI:10.1016/j.foodcont.2021.108175
4. Belyh, I. A., Kleschev, N. F., Grek, A. M., Sakun, A. V. (2012). Analysis of methods of indication of microorganisms and products of their metabolism. *Modern problems of toxicology*, 3–4, pp. 70–80 (in Ukrainian)..
5. Ben Ayed, R., Rebai, A. (2019). Tunisian table olive oil traceability and quality using SNP genotyping and bioinformatics tools. *BioMed Res. Int.* DOI:10.1155/2019/8291341.
6. Blevé, G., Rizzotti, L., Dellaglio, F., Torriani, S. (2003). Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Appl Environ Microbiol*, 69(7), pp. 4116–4122. DOI:10.1128/AEM.69.7.4116-4122.2003.
7. Boccacci, P., Chitarra, W., Schneider, A., Rolle, L., Gambino, G. (2020). Single-nucleotide

polymorphism (SNP) genotyping assays for the varietal authentication of 'Nebbiolo' musts and wines. *Food Chem.*, 312. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.126100.

8. Bustin, S. A., Nolan, T. (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech.*, 15 (3), pp. 155–166.

9. Chedid, E., Rizou, M., Kalaitzis, P. (2020). Application of high resolution melting combined with DNA-based markers for quantitative analysis of olive oil authenticity and adulteration. *Food Chemistry*, 6. DOI:10.1016/j.fochx.2020.100082.

10. Cibecchini, G., Cecere, P., Tumino, G., Morcia, C., Ghizzoni, R., Carnevali, P., Terzi, V., Pompa, P.P. (2020). A fast, naked-eye assay for varietal traceability in the durum wheat production chain. *Foods*, 9 (11). DOI:10.3390/foods9111691.

11. di Rienzo, V., Fanelli, V., Miazzi, M. M., Savino, V., et al. (2017). A reliable analytical procedure to discover table grape DNA adulteration in industrial wines and musts. *Acta Hort.* DOI:10.17660/ActaHortic.2017.1188.49.

12. Du, M., Li, J., Liu, Q., Wang, Y., Chen, E., Kang, F., Tu, C. (2021). Rapid detection of trace *Salmonella* in milk using an effective pretreatment combined with droplet digital polymerase chain reaction. *Microbiol Res.*, 251. DOI:10.1016/j.micres.2021.126838.

13. Fanelli, V., Mascio, I., Miazzi, M. M., Savoia, M. A., et al. (2021). Molecular Approaches to Agri-Food Traceability and Authentication: An Updated Review. *Foods*, 10 (7). DOI:10.3390/foods10071644.

14. Fang, W., Meinhardt, L. W., Mischke, S., Bellato, C. M., et al. (2014). Accurate determination of genetic identity for a single cacao bean, using molecular markers with a nanofluidic system, ensures cocoa authentication. *J. Agric. Food Chem.*, 62. DOI:10.1021/jf404402v. Epub 2013Dec 31.

15. Fang, W. P., Meinhardt, L. W., Tan, H.W., Zhou, L., et al. (2014). Varietal identification of tea (*Camellia sinensis*) using nanofluidic array of single nucleotide polymorphism (SNP) markers. *Hortic. Res.*, 1. DOI:10.1038/hortres.2014.35.

16. Gaidey, O. S., Garkavenko, T. O., Pischanskii, O. V. (2018). Food allergens. Relevance and problems in Ukraine. *Veterinary biotechnology*, 32 (1), pp. 453–458 (in Ukrainian)..

17. Galimberti, A., Casiraghi, M., Bruni, I., Guzzetti, L., et al. (2019). From DNA barcoding to personalized nutrition: The evolution of food traceability. *Curr. Opin. Food Sci.*, 28. DOI:10.1016/j.cofs.2019.07.008.

18. Garcia, A. A. F., Banchimol L. L., Barbosa A. M. M. (2004). Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetics and Molecular Biology*, 27 (4). pp. 579–588.

19. Gouvêa-Barros Selma., Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira. (2012). Semi-Quantitative PCR for Quantification of Hepatotoxic Cyanobacteria. *Journal of Environmental Protection*, 3. DOI:10.4236/jep.2012.35053.

20. Haiminen, N., Edlund, S., Chambliss, D., Kunitomi, M., et al. (2019). Food authentication from

shotgun sequencing reads with an application on high protein powders. *NPJ Sci Food*, 3, 24. DOI:10.1038/s41538-019-0056-6

21. Haynes, E., Jimenez, E., Pardo, M.A., Helyar, S.J. (2019). The future of NGS (Next Generation Sequencing) analysis in testing food authenticity. *Food Control*, 101, pp. 134–143. DOI:10.1016/j.foodcont.2019.02.010.

22. Hernaandez, M., Esteve, T., Pla, M. (2005). Real-Time Polymerase chain reaction based assays for quantitative detection of barley, rice, sunflower, and wheat. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, pp. 7003–7009.

23. Hilton, A. C., Mortiboy, D., Banks, J. G., Penn, C. W. (1997). RAPD analysis of environmental, food and clinical isolates of *Campylobacter* spp. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 18(2), pp. 119–124. DOI:10.1111/j.1574-695X.1997.tb01036.x.

24. Hu, Y., Lu, X. (2020). Rapid pomegranate juice authentication using a simple sample-to-answer hybrid paper/polymer-based lab-on-a-chip device. *ACS Sens.*, 5, pp. 2168–2176. DOI:10.1021/acssensors.0c00786.

25. Jonker, K., Tilburg, J., Hagele, G., De Boer, E. (2008). Species identification in meat products using real-time PCR. *Food Additives and Contaminants*, 25 (5), pp. 527–533. DOI:10.1080/02652030701584041.

26. Liaskovskii, T. M. (2008). Identification of probiotic strains of lactic acid bacteria. *Journal of microbiology*, 70 (6), pp. 3–9 (in Ukrainian)..

27. Lin, C. C., Tang, P. C., Chiang, H. I. (2019). Development of RAPD-PCR assay Cattle for meat adulteration detection. *Food Sci Biotechnol.*, 28(6). pp. 1769–1777. DOI:10.1007/s10068-019-00607-7.

28. Low, H., Chan, S. J., Soo, G. H., Ling, B., Tan, E. L. (2017). Clarity™ digital PCR system: A novel platform for absolute quantification of nucleic acids. *Anal. Bioanal. Chem.*, 409, pp. 1869–1875. DOI:10.1007/s00216-016-0131-7.

29. Martinez, I., Rorvik, L. M., Brox, V., Lassen, et al. (2003). Genetic variability among isolates of *Listeria monocytogenes* from food products, clinical samples and processing environments, estimated by RAPD typing. *Int J Food Microbiol.*, 84 (3), pp. 285–297. DOI:10.1016/s0168-1605(02)00423-3.

30. Mayer, F., Haase, I., Graubner, A., Heising, F., Paschke-Kratzin, A., Fischer, M. (2012). Use of polymorphisms in the γ -gliadin gene of spelt and wheat as a tool for authenticity control. *J Agric Food Chem.*, 60 (6), pp. 1350–1357. DOI:10.1021/jf203945d. Epub 2012 Feb 7.

31. Miraglia, M., Berdal, K. G., Brera, C., Corbisier, P. et al. (2004). Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology*, 42 (7), pp. 1157–1180. DOI:10.1016/j.fct.2004.02.018.

32. Oblap, R. V., Novak N. B., Dyman T. M. (2014). Development of test systems based on RT-PCR to determine the species affiliation of tissues in foodstuff composition. *Animal Husbandry Products Production and Processing*. BNAU, 2 (112), pp. 112–115 (in Ukrainian).

33. Oblap, R. V., Novak N. B., Dyman T. M. (2018). Monitoring of foodstuff, feed and agricultural raw materials in Ukraine for GM ingredients content. *Bioresources and nature management*, 10 (3–4), pp. 49–55 (in Ukrainian).
34. Oblap, R. V., Novak, N. B., Semenovich, V. K., Dyman, T. M. (2015). Determination of the presence of gluten from cereal crops in foodstuff by RT-PCR method. *Animal Husbandry Products Production and Processing*. BNAU. no. 1(116), pp. 111–116 (in Ukrainian).
35. Pinczinger, D., von Reth, M., Hanke, M.V., Flachowsky, H. (2020). SSR fingerprinting of raspberry cultivars traded in Germany clearly showed that certainty about the genotype authenticity is a prerequisite for any horticultural experiment. *Eur. J. Hort.*, 85, pp. 79–85.
36. Raime, K., Krjutškov, K., Remm, M. (2020). Method for the identification of plant DNA in food using alignment-free analysis of sequencing reads: A case study on lupin. *Front. Plant Sci.*, 11. DOI:10.3389/fpls.2020.00646.
37. Rasmussen, H-B. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting Available at: https://cdn.intechopen.com/pdfs/35104/InTech-Restriction_fragment_length_polymorphism_analysis_of_pcr_amplified_fragments_pcr_rflp_and_gel_electrophoresis_valuable_tool_for_genotyping_and_genetic_fingerprinting.pdf
38. R-BiopharmAG. SureFood®/SureFast® набори для проведення ПЛР в реальному часі: Каталог продукції. Available at: http://biola-lab.com/content/pages/files/2014-05_surefood_Продукти_2014.pdf.
39. Ripp, F., Krombholz, C.F., Liu, Y., Weber, M. et al. (2014). All-Food-Seq (AFS): A quantifiable screen for species in biological samples by deep DNA sequencing. *BMC Genom.* 15. DOI:10.1186/1471-2164-15-639.
40. Saadat, S., Pandya, H., Dey, A., Rawtani, D. (2022). Food forensics: Techniques for authenticity determination of food products. *Forensic Sci Int.*, 333. DOI:10.1016/j.forsciint.2022.111243.
41. Sabetta, W., Miazzi, M.M., di Rienzo, V., Fanelli, V. et al. (2017). Development and application of protocols to certify the authenticity and traceability of Apulian typical products in olive sector. *Riv. Ital. Delle Sostanze Grasse*, 94 (1), pp. 37–43.
42. Sandberg, M., Lundberg, L., Ferm, M., Malmheden Yman, I. (2003). Real-time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. *European Food Research and Technology*, 217, pp. 344–349.
43. Spaniolas, S., Bazakos, C., Tucker, G. A., Bennett, M. J. (2014). Comparison of SNP-based detection assays for food analysis: Coffee authentication. *J AOAC Int.*, 97 (4), pp. 1114–1120. DOI:10.5740/jaoacint.13-237.
44. Uddin, S., Hossain, M., Chowdhury, Z., Johan, M. (2022). Detection, and discrimination of seven highly consumed meat species simultaneously in food products using heptaplex PCR-RFLP assay. *Journal of Food Composition and Analysis*, 100, pp. 938–944.
45. VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44, pp. 619–626. DOI:10.2144/000112776.
46. Verdone, M., Rao, R., Coppola, M., Corrado, G. (2018). Identification of zucchini varieties in commercial food products by DNA typing. *Food Control*, 84, pp. 197–204.
47. Voelkerding, K. V., Dames, S. A., Durtschi, J. D. (2009). Next-generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. *Clinical Chemistry*, 55 (4), pp. 651–658. DOI:10.1373/clinchem.2008.112789.
48. Wang, C., Yang, C. J. (2013). Application of Molecular Beacons in Real-Time PCR. *Molecular Beacons*, 18, pp. 45–59. DOI:10.1007/978-3-642-39109-5_3.
49. Wenne, R., Prądzińska, A., Poćwierz-Kotus, A., Larraín M-A., Araneda C., Zbawicka M. (2022). Provenance of *Mytilus* food products in Europe using SNP genetic markers. *Aquaculture*, 554. DOI:10.1016/j.aquaculture.2022.738135.
1. Wolf, C., Burgener, M., Hubner, P., Luthy, J. (2000). PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: differentiation of fish species. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 33, pp. 144–150.
50. World Health Organization. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007–2015. Geneva: WHO Press, 2015. Available at: https://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/.
51. Zambelli, R. A., Brasil, I. M. (2022). Molecular Techniques for identification applied to food: A review. *Int J Agric Sc Food Technol.*, 8(4), pp. 305–315. DOI:10.17352/2455-815X.000182.
52. Zambianchi, S., Soffritti, G., Stagnati, L., Patrone, V., et al. (2021). Applicability of DNA traceability along the entire wine production chain in the real case of a large Italian cooperative winery. *Food Control*, 124. DOI:10.1016/j.foodcont.2021.107929.
53. Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.*, 11, pp. 1–16.
54. Zhang, D., Vega, F.E., Infante, F., Solano, W. et al. (2020). Accurate differentiation of green beans of Arabica and Robusta coffee using nanofluidic array of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) markers. *J. AOAC Int.*, 103, pp. 315–324. DOI:10.1093/jaoacint/qs002.
55. Zhang, X., Lowe, S. B., Gooding, J. J. (2014). Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosens. Bioelectron.*, 61, pp. 491–499. DOI: 10.1016/j.bios.2014.05.039.
56. Zhao, J., Li, A., Jin, X., Pan, L. (2020). Technologies in individual animal identification and meat products traceability. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 34, pp. 48–57. DOI:10.1080/13102818.2019.1711185.

57. Zhao, M., Shi, Y., Wu, L., Guo, L., et al. (2016). Rapid authentication of the precious herb saffron by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based on internal transcribed spacer 2 (ITS2) sequence. *Sci. Rep.*, 6. DOI:10.1038/srep25370.

Use of DNA technologies for the examination of foodstuff

Dyman T., Dyman N.

An integral component of the management system in the field of food safety is the examination of food products, which is based mostly on physical, chemical, physico-chemical and biochemical methods of research. Progress in the mastery of DNA diagnostic methods has become an incentive for the development and introduction into laboratory practice of highly sensitive methods for assessing the safety and quality of foodstuff, based on the polymerase chain reaction (PCR) method.

In recent decades, the demand for molecular tools for food examination, authentication and traceability has increased significantly. This is due to the fact that legislation in the food sector is becoming increasingly

strict, and market strategies are aimed at evaluating the food chain "from field to table" and ensuring that consumer choices match their expectations.

An overview of proven and widely tested molecular approaches for the examination of food products is presented: PCR-RFLP method, RAPD-PCR, SSR-PCR, RT-PCR. The potential and prospects of the latest technologies, such as SNP - single nucleotide polymorphisms, isothermal amplification, digital PCR, Whole-Genome Sequencing (WGS), DNA metabarcoding, are also described. The specified methods are characterized by high productivity, speed and scaling, enabling the study of biological systems at a new qualitative level. Examples of successful use of the specified methods for examination of foodstuff of plant and animal origin, their authentication and traceability are given.

A broad panel of molecular methods is a powerful tool to protect both producers and consumers, providing consumers with freedom of choice and increasing transparency in food production systems, enabling honest producers to properly promote their products.

Key words: DNA-technologies, polymerase chain reaction, food safety, foodstuff examination.



Copyright: Димань Т.М., Димань Н.О. © This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



ORCID iD:

Димань Т.М.

Димань Н.О.

<https://orcid.org/0000-0002-6428-1476>

<https://orcid.org/0000-0003-4087-2957>