

УДК 577.2:575:57.08:658.562

ОБЛАП Р.В., канд. біол. наук; **НОВАК Н.Б.**, канд. с.-г. наук; **СЕМЕНОВИЧ В.К.**

ДП «Укрметртестстандарт», м. Київ;

ДИМАНЬ Т.М., д-р с.-г. наук

Білоцерківський національний аграрний університет

ВИЗНАЧЕННЯ ПРИСУТНОСТІ ГЛЮТЕНУ ЗЛАКОВИХ КУЛЬТУР У ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ПЛР-РЧ

За використання *TaqMan*-технології методу полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (ПЛР-РЧ) розроблено тест-систему для виявлення та ідентифікації у продовольчій сировині і харчових продуктах чотирьох злакових культур (пшениці, жита, вівса і ячменю), глютен яких призводить до виникнення у людини захворювання на целиацію. Тест-система уможливає аналіз продуктів, які піддавались термічному обробленню, ферментації, гідролізу, її рівень чутливості достатній для виявлення так званого прихованого глютену. Апробацію тест-системи проведено на 53 зразках продовольчої сировини і харчових продуктів шляхом порівняльних випробувань за використання комерційних ІФА- та ПЛР-тест-систем – RIDASCREEN® Gliadin та SureFood® ALLERGEN ID Gluten (R-Biopharm, Німеччина) відповідно. За ефективністю роботи (специфічністю, чутливістю, повторюваністю та відтворюваністю результатів) розроблена система не поступається зарубіжним аналогам і є значно дешевшою.

Ключові слова: глютен, целиація, ПЛР в режимі реального часу, харчові продукти.

Постановка проблеми, аналіз останніх досліджень і публікацій. Сьогодні як в Україні, так і в інших країнах світу актуальним є розроблення сучасних технологій виробництва харчових продуктів спеціалізованого призначення, спрямованих на профілактику та лікування аліментарно-залежних захворювань. До таких видів продуктів можна віднести передусім безглютенові вироби, які призначені для людей, хворих на целиацію [1, 2].

Целиація (глютенова ентеропатія) – це аутоімунне спадково обумовлене захворювання, яке характеризується несприйнятністю глютену таких злакових культур як пшениця, жито, ячмінь та меншою мірою овес, з розвитком гіперрегенераторної атрофії слизової оболонки тонкої кишки та пов'язаним з цим синдромом мальабсорбції [3].

Ще донедавна целиацію вважали рідкісним захворюванням з частотою зустрічальності 1 : 5 000–10 000. Однак широке впровадження у практику лабораторної діагностики методу визначення антигліадинових антитіл суттєво змінило уяву щодо поширення цього захворювання. За даними ВООЗ, у різних країнах світу целиація зустрічається з частотою від 1 : 80 до 1 : 300, кількість хворих на неї в світі коливається в межах 0,5–1 % [4]. У нашій країні до 2003 р. діагностувати це захворювання було практично неможливо, тому статистичні дані щодо захворюваності на целиацію відсутні. Нині в Україні діагностовано 600 (0,001 %) хворих на целиацію, хоча, за попереднім незалежним оцінюванням, ця цифра може сягати приблизно 500 тис. [5].

Єдиним дієвим методом лікування та профілактики ускладнень, спричинених целиацією, є дотримання протягом всього життя безглютенової дієти [6]. Однак уникнути глютену у разі дієтичного харчування досить складно, оскільки злаки застосовують у виробництві багатьох найменувань харчових продуктів. Крім того, низка продуктів містить «прихований» глютен, і навіть безглютенова продукція може бути забруднена в процесі технологічного циклу. Згідно з міжнародними нормами, вміст глютену в усіх без винятку безглютенових продуктах не має перевищувати 20 ppm (2 мг/100 г) з урахуванням різної чутливості до глютену та різних харчових уподобань [7, 8].

Проблема целиації має велике медико-соціальне значення для здоров'я всієї нації, тому її вирішення неможливе без відповідної вчасної діагностики, обліку хворих та забезпечення їм можливості дотримання спеціальної безглютенової дієти. На жаль, в Україні сьогодні відсутні законодавчі акти, які б забезпечували належний рівень контролю за виготовленням безглютенової продукції та інформування споживачів. Водночас виробники дедалі частіше ставлять питання щодо перевірки своєї продукції на вміст глютену. На вітчизняному ринку представлено обмежений спектр діагностиків, які б уможлилювали проведення таких досліджень. Крім того, це тест-набори винятково іноземного виробництва, що відповідно позначається на вартості аналізу. З огляду на це, розроблення вітчизняних тест-систем для

визначення вмісту глютену в харчових продуктах, які б відповідали європейським стандартам, є актуальним і своєчасним завданням.

Метою роботи було розроблення методичного підходу до визначення глютенів злакових культур та створення і апробація вітчизняного діагностикуму на основі методу ПЛР у реальному часі (ПЛР-РЧ, Real-Time PCR) для виявлення та ідентифікації походження глютену в харчовій продукції.

Матеріал і методика досліджень. Дослідження проводили у лабораторії молекулярно-генетичних досліджень науково-дослідного центру випробувань продукції ДП «Укрметртестстандарт», яку акредитовано Національним агентством акредитації України на компетентність відповідно до вимог ДСТУ ISO / ІЕС 17025-21.

Матеріалом для виділення геномної ДНК слугували зразки насіння пшениці, жита, ячменю, вівса та ряду інших культур, а також проби харчових продуктів та продовольчої сировини. ДНК виділяли методом СТАБ-преципітації з власними модифікаціями. Концентрацію виділеної нуклеїнової кислоти та її чистоту за співвідношеннями A260/A280 та A260/A230 визначали на спектрофотометрі «BioPhotometer AG 22331» (Eppendorf, Німеччина) [9].

ПЛР у режимі реального часу (технологія *TaqMan*) проводили за допомогою приладу CFX96 (BioRad, США) [10]. Реакційна суміш містила 100 нг ДНК, 10 мМ Трис-НСІ (рН 8,3), 50 мМ КСІ, 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дНТФ-суміші, 20 пкМ кожного з праймерів, 10 пкМ зонду та 1 од. Таq-полімерази (Thermo Scientific™, Литва). Олігонуклеотидні зонди були мічені флуоресцентними барвниками FAM, JOE, ROX, Cy5 та гасниками флуоресценції BHQ1 і BHQ2. Температурний режим складався з початкової денатурації впродовж 3 хв за 95 °С та наступних 45 циклів: денатурації – 15 с за 95 °С, відпалу праймерів та синтезу – 40 с за 60 або 65 °С. Флуоресцентний сигнал вимірювали по завершенню стадії відпалу праймерів та синтезу у кожному циклі ампліфікації.

Для виготовлення тест-системи використовували реагенти фірм «Sigma-Aldrich» (США), «Thermo Scientific™» (Литва) та «Metabion» (Німеччина).

Результати досліджень та їх обговорення. До найбільш алергенних злакових культур, які призводять до розвитку целиакії, належать пшениця та її різновиди (камут, полба), жито, ячмінь та меншою мірою овес. З огляду на це, як цільові гени для визначення глютенів зазвичай використовують гени запасних білків зерна вищеозначених культур.

У своїх дослідженнях ми зупинилися на локусах, які кодують високомолекулярні (НМВ) субодиниці глютенінів, зокрема *Glu B1-1* пшениці та *Glu1-R* жита. Для детекції ячменю та вівса було обрано гени *Hor3* та *12S SSP* відповідно [11].

Під час розроблення тест-системи було використано технологію *TaqMan* методу ПЛР-РЧ завдяки його високій чутливості, специфічності та швидкості виконання. Запропонована нами тест-система є мультиплексною та уможливує проведення декількох незалежних реакцій в одній пробірці. Діагностикум складається з двох реакційних сумішей. Перша ПЛР-суміш дає змогу ідентифікувати послідовності ДНК пшениці, жита та вівса, друга – ячменю та гена *psbA*. Останній було обрано як видоспецифічний ендогенний контроль перебігу ПЛР. Перебіг кожної реакції відстежували за допомогою флуоресційно мічених зондів FAM (*12S SSP*), ROX (*Hor3*), HEX (*Glu1-R, psbA*) та Cy5 (*Glu B1-1*).

Оптимізацію умов ампліфікації проводили за такими параметрами як температура відпалу праймерів, концентрація MgCl₂, концентрація та співвідношення праймерів і зондів. Оптимальна температура, за якої підібрані нами праймери найбільш ефективно працювали, становила 60 °С для першої ПЛР-суміші, та 65 °С – для другої. Проведення серії реакцій з різними комбінаціями співвідношень MgCl₂, праймерів та зондів дало змогу підібрати оптимальні умови ампліфікації, за яких у разі постійної концентрації матриці-мішені спостерігали мінімальну величину граничного циклу Ст і максимальне значення відносного рівня флуоресценції ΔRn. Оптимальні значення концентрацій становили 2,5 мМ для MgCl₂, 20 пкМ для праймерів та 10 пкМ для зондів.

Ст для кожного зразка визначали циклом, за якого кінетична крива флуоресценції перетинала граничну лінію. Базову лінію, що являє собою фоновий рівень флуоресценції, прилад визначав автоматично. Пробу розглядали як позитивну на присутність глютену, якщо сигнал флуоресценції в першій ПЛР-суміші детектувався хоча б за одним із трьох каналів (FAM, HEX, Cy5), у другій – за каналом ROX, а значення Ст варіювало з 15 по 40 цикл. Відповідно, пробу розглядали як негативну, якщо сигнал детектувався лише за каналом HEX (ендогенний контроль) у другій ПЛР-суміші, що

свідчило про коректне проведення усіх стадій аналізу та відсутність інгібіторів ферментативної реакції в пробі. Якщо флуоресценція була відсутня за всіма каналами, проводили повторне дослідження даної проби зі збільшенням кількості вихідного матеріалу, взятого для виділення ДНК.

Оцінювання ефективності роботи тест-систем проводили за такими аналітичними характеристиками як специфічність, чутливість, повторюваність та відтворюваність результатів аналізу, згідно з вимогами до розроблення ПЛР тест-систем. Виділення ДНК з кожного досліджуваного зразка здійснювали у двох повторностях, кожен виділений зразок ДНК ампліфікували також у двох повторностях.

Експериментальне визначення специфічності проводили тестуванням таких видів рослин як жито (*Secale cereal*), пшениця (*Triticum aestivum*), ячмінь (*Hordeum vulgare*), овес (*Avena sativa*), гречка (*Fagopyrum esculentum*), рис (*Oryza sativa*), кукурудза (*Zea mays*), соя (*Glycine max*), ріпак (*Brassica napus*), помідори (*Lycopersican esculentum*), картопля (*Solanum tuberosum*). Перехресних реакцій при цьому виявлено не було.

Межу чутливості розробленої тест-системи визначали шляхом приготування серії десятикратних розведень ДНК від 0,0001 до 100 нг геномної ДНК. Межа чутливості системи за генами *Glu B1-1*, *Glu1-R*, *Hor3* та *12S SSP* становила 0,1 нг, а за геном *psbA* – 0,001 нг. Отримані нами результати виявились подібними до описаних іншими авторами та отриманих за використання комерційних наборів [11, 12].

Наступним етапом дослідження була перевірка можливості застосування розробленої тест-системи для аналізу харчової продукції, у тому числі тієї, що піддавалась термічному обробленню.

Апробацію тест-системи проводили упродовж 2013–2015 рр. шляхом порівняльних випробувань харчової продукції з відомим складом. Для порівняння результатів було використано комерційні ІФА- та ПЛР-тест-набори – відповідно RIDASCREEN® Gliadin та SureFood® ALLERGEN ID Gluten (R-Biopharm, Німеччина). Всього було досліджено 53 зразки продовольчої сировини та харчових продуктів.

Таблиця 1 – Порівняльні випробування визначення глютену в харчовій продукції

№ п/п	Назва продукту та його виробник	ПЛР-РЧ скринінг		ПЛР SureFood® Allergen ID Gluten	ІФА Ridascreen® Gliadin (мг/кг)
		внутрішній контроль	глютен		
1	Органічні мюслі «Яблуко-Груша», Familia (Швейцарія)	+	+	+	72,8
2	Картопляний крохмаль, Nordic (Фінляндія)	+	-	-	<5,0
3	Пшенична крупа, Хуторок (Україна)	+	+	+	>80,0
4–8	Суміші молочні сухі «Малютка швидкого приготування», Хорольський молококонсервний комбінат дитячих продуктів (Україна)	+	-	-	<5,0
9	Суміш молочна суха «Малютка швидкого приготування» з вівсяним борошном, Хорольський молококонсервний комбінат дитячих продуктів (Україна)	+	+	+	<5,0
10	Вівсяні мюслі без глютену, ТМ «Provena», Raisio Nutrition Ltd. (Фінляндія)	+	+	+	<5,0
11–17	Борошно (рисове, кукурудзяне, просяне, соргове, льняне, гарбузове, з виноградних кісточок) повноцінне аглютенове «Аннушка®», НВ ТОВ «Житомирбіопродукт» (Україна)	+	-	-	<5,0
18	Борошно амарантове повноцінне аглютенове «Аннушка®», НВ ТОВ «Житомирбіопродукт» (Україна)	+	+	+	39,7
19	Борошно гречане повноцінне аглютенове «Аннушка®», НВ ТОВ «Житомирбіопродукт» (Україна)	+	+	+	39,3
20	Дитяче розчинне печиво Бебик «Преміум» без глютену, «Quality food group» (Італія)	+	-	-	<5,0

21	Дитяче розчинне печиво Бебик «6 злаків», «Quality food group» (Італія)	+	+	+	>80,0
22	Паста сиркова «Груша-кукурудза» 4,2 % жиру, ТМ «Яготинське для дітей», Філія ПАТ «Яготинський маслозавод» (Україна)	+	-	-	<5,0
23	Крупа гречана ядриця, КП Білоцерківхлібопродукт (Україна)	+	-	-	<5,0
24	Крупа манна, КП Білоцерківхлібопродукт (Україна)	+	+	+	>80,0
25–26	Продукти для спец. дієтичного харчування: сирок 3,9 % жиру і йогурт 2,7 % жиру з наповнювачем «Злаки», ПАТ «ВБД Україна» (Україна)	+	-	-	<5,0
27–31	Пиво та квас, ПАТ «Оболонь» (Україна)	-	-	-	<5,0
32–33	Концентрати квасного суслу, ТОВ «Квас Бевериджиз», (Україна)	+	+	+	>80,0
34–35	Ячмінно-солодові екстракти, ТОВ «Квас Бевериджиз», (Україна)	+	+	+	>80,0
36	Борошно гречане, ТОВ «Фільварок» (Україна)	+	+	+	10,0
37	Борошно рисове, ТОВ «Фільварок» (Україна)	+	+	+	16,0
38–39	Сири кисломолочні безлактозні 0 та 5% жирності, Дочірнє підприємство (ДП) «Мілкіленд-Україна» (Україна)	-	-	-	<5,0
40	Кефір безлактозний 2,5 %, ДП «Мілкіленд-Україна» (Україна)	-	-	-	<5,0
41	Йогурт по-грецьки безлактозний, ДП «Мілкіленд-Україна» (Україна)	-	-	-	<5,0
42	Молоко сухе знежирене, ДП «Мілкіленд-Україна» (Україна)	-	-	-	<5,0
43–44	Сири кисломолочні 0 та 9% жирності, ДП «Мілкіленд-Україна» (Україна)	-	-	-	<5,0
45–48	Сири м'які з різним % жирності, ДП «Мілкіленд-Україна» (Україна)	-	-	-	<5,0
49	Масло солодковершкове екстра 82,5 %, ТМ Добряна, ДП «Мілкіленд-Україна» (Україна)	-	-	-	<5,0
50–52	Корми для собак, Hill's™, (США-Нідерланди)	+	-	-	<5,0
53	Хлібці хрусткі рисові «Крекерси», ТМ Жменька, ТОФ Фабрика бакалійних продуктів (Україна)	+	-	-	<5,0

Як свідчать дані, наведені у таблиці 1, розроблена тест-система за своїми характеристиками не поступається комерційним наборам. У всіх без винятку випадках результати аналізів, отримані за використання трьох різних тест-систем, були ідентичні. Серед 53 досліджених зразків 43 (81 %) виявилися такими, що не містять глютен (< 5 мг/кг). У решті 10 (19 %) зразків глютен було виявлено в кількостях від 10 мг/кг і більше. Переважна більшість досліджених зразків не була маркована як безглютенова продукція, тому наведена інформація носить винятково інформативний характер.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Проведені дослідження і випробування довели, що розроблена тест-система дає змогу виявляти та ідентифікувати присутність пшениці, жита, ячменю та вівса як у продовольчій сировині (крупа, борошно), так і продуктах, що піддавались термічному обробленню, ферментації або гідролізу (сухі сніданки, печиво, солодові екстракти). Крім того, рівня чутливості тест-системи достатньо для виявлення так званого прихованого глютену, який може бути присутнім у складі продуктів промислового виробництва у вигляді добавок-загусників, формоутворювачів, стабілізаторів, пшеничного борошна, крохмалю та ін. Запропонована тест-система може бути використана як скринінговий тест для якісного аналізу харчової продукції на вміст глютену.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Козубаева Л.А. Разработка рецептур безглютеновых кондитерских изделий / Л.А. Козубаева, С.С. Кузьмина, Э.П. Могучева // Ползуновский вестник. – 2011. – № 3/2. – С. 117–121.
2. Резниченко И.Ю. Современные требования к качеству и безопасности безглютеновой продукции в Великобритании, информационное обеспечение потребителей / И.Ю. Резниченко, Ю.А. Алешина // Ползуновский вестник. – 2011. – № 3/2. – С. 219–222.

3. Горгун Ю.В. Диагностика и лечение целиакии / Ю.В. Горгун, А.С. Портянко, Ю.Х. Мараховская. – Минск, 2006. – 35 с.
4. Julio C. Celiac disease. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines / World Gastroenterology Organisation, 2012.– Режим доступа: <http://www.worldgastroenterology.org>
5. Боярская Л.Н. Решенные и нерешенные проблемы диагностики и лечения целиакии у детей / Л.Н. Боярская, Е.А. Иванова // Перинатология и педиатрия. – 2013. – № 2 (54). – С. 113–119.
6. Ревнова М. О. Целиакия: болезнь или образ жизни / М.О. Ревнова, И.Э. Романовская. – С.-Петербург, 2006. – 144 с.
7. Codex Alimentarius. Revised Codex standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten / ALINORM 08/31/26. Appendix III. – 2008.– Режим доступа: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/291/cxs_118e.pdf
8. Commission Regulation (EC) No 41/2009 concerning the composition and labelling of foodstuffs suitable for people intolerant to gluten / Official Journal L 16/09 21. – January 2009.
9. ДСТУ ISO 21571:2008 Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Екстрагування нуклеїнової кислоти. – К.: Держспоживстандарт України, 2009. – 31 с.
10. ПЦР в реальном времени / [Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др.]; под ред. Д.В. Ребрикова. – М.: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.
11. Zeltner D. Real-time PCR systems for the detection of the gluten-containing cereals wheat, spelt, kamut, rye, barley and oat / D. Zeltner, M.A. Glomb, D. Maede // Eur Food Res Technol. – 2009. – Vol. 228. – P. 321–330.
12. Sandberg M. Real Time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods / M. Sandberg, L. Lundberg, M. Ferm // Eur Food Res Technol. – 2003. – Vol. 217. – P. 344–349.

REFERENCES

1. Kozubaeva L.A. Razrabotka receptur bezglutenovykh konditerskikh izdelij / L.A. Kozubaeva, S.S. Kuz'mina, Je.P. Mogucheva // Polzunovskij vestnik. – 2011. – № 3/2. – S. 117–121.
2. Reznichenko I.Ju. Sovremennye trebovanija k kachestvu i bezopasnosti bezglutenovoj produkcii v Velikobritanii, informacionnoe obespechenie potrebitel'ev / I.Ju. Reznichenko, Ju.A. Aleshina // Polzunovskij vestnik. – 2011. – № 3/2. – S. 219–222.
3. Gorgun Ju.V. Diagnostika i lechenie celiakii / Ju.V. Gorgun, A.S. Portjanko, Ju.H. Marahovskaja. – Minsk, 2006. – 35 s.
4. Julio C. Celiac disease. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines / World Gastroenterology Organisation, 2012.– Rezhym dostupu: <http://www.worldgastroenterology.org>
5. Bojarskaja L.N. Reshennye i nereshennye problemy diagnostiki i lechenija celiakii u detej / L.N. Bojarskaja, E.A. Ivanova // Perinatologija i pediatrija. – 2013. – № 2 (54). – S. 113–119.
6. Revnova M. O. Celiakija: bolezni ili obraz zhizni / M.O. Revnova, I. Je. Romanovskaja. – S.-Peterburg, 2006. – 144 s.
7. Codex Alimentarius. Revised Codex standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten / ALINORM 08/31/26. Appendix III. – 2008.– Rezhym dostupu: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/291/cxs_118e.pdf
8. Commission Regulation (EC) No 41/2009 concerning the composition and labelling of foodstuffs suitable for people intolerant to gluten / Official Journal L 16/09 21. – January 2009.
9. DSTU ISO 21571:2008 Metodi vijavlennja genetichno modifikovanih organizmiv i produktiv z ihnim vmistom. Ekstraguvannja nukleinoj kisloti. – K.: Derzhspozhivstandart Ukraïni, 2009. – 31 s.
10. PCR v real'nom vremeni / [Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Ju. i dr.]; pod red. D.V. Rebrikova. – M.: BINOM, Laboratorija znanij, 2009. – 223 s.
11. Zeltner D. Real-time PCR systems for the detection of the gluten-containing cereals wheat, spelt, kamut, rye, barley and oat / D. Zeltner, M.A. Glomb, D. Maede // Eur Food Res Technol. – 2009. – Vol. 228. – P. 321–330.
12. Sandberg M. Real Time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods / M. Sandberg, L. Lundberg, M. Ferm // Eur Food Res Technol. – 2003. – Vol. 217. – R. 344–349.

Определение присутствия глютена злаковых культур в пищевых продуктах методом ПЦР-РВ

Р.В. Облап, Н.Б. Новак, В.К. Семенович, Т.Н. Дымань

При использовании *TaqMan*-технологии метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) разработана тест-система для выявления и идентификации в продовольственном сырье и пищевой продукции четырех злаковых культур (пшеницы, ржи, овса и ячменя), глютен в составе которых может приводить к развитию у человека заболевания целиакии. Тест-система позволяет анализировать продукты, которые подвергались термической обработке, ферментации, гидролизу, уровень ее чувствительности достаточен для выявления так называемого скрытого глютена. Аппробация тест-системы проведена на 53 образцах продовольственного сырья и пищевых

продуктов путем сравнительных испытаний при использовании коммерческих ИФА- и ПЦР-тест-систем – RIDASCREEN® Gliadin и SureFood® ALLERGEN ID Gluten (R-Biopharm, Германия) соответственно.

По эффективности работы (специфичности, чувствительности, повторяемости и воспроизводимости результатов) разработанная система не уступает зарубежным аналогам и значительно дешевле.

Ключевые слова: глютен, целиакия, ПЦР в режиме реального времени, пищевые продукты.

Надійшла 2.04.2015