

## РАЗРАБОТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКСА ИММУНОХИМИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ КОМПОНЕНТОВ РАЗНОГО ВИДОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ

*Е.А. Зверева, О.Д. Гендриксон, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев*

*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук, Москва, Россия*

В современном мире недостаток ресурсов отрицательно сказывается на пищевой индустрии: дефицит сырья обуславливает повышение цен и снижение рентабельности производства [1]. С другой стороны, новые технологии производства пищевых продуктов позволяют снижать затраты производителя при сохранении или даже увеличении производственных мощностей. Однако, решая вопросы объемов и прибыльности, производители пищевой продукции не всегда руководствуются требованиями к ее качеству. Поэтому в обществе возрастает озабоченность составом пищевых продуктов, заменами качественного сырья более дешевым [2, 3]. Это касается, в частности, мяса и мясных изделий – важного компонента пищевого рациона и источника белков, обеспечивающего организм, незаменимыми аминокислотами и рядом других нутриентов [4, 5].

Необходимость контроля качества мясной продукции обусловлена также этическими и религиозными соображениями (кошерность, халяльность), а также ограничительными требованиями к рациону у людей с пищевой аллергией, непереносимостью определенных пищевых компонентов, заболеваниями желудочно-кишечного тракта, онкологической предрасположенностью и другими проблемами со здоровьем [6, 7]. Поэтому обеспечение качества и аутентичности мясной продукции требует массового контроля ее состава на всем протяжении технологических цепочек от сырья до готовых продуктов. Тенденция последних лет состоит в перенесении значительной части анализов из специализированных лабораторий непосредственно в места отбора проб, что обеспечивает открытость тестирования и позволяет оперативно принимать решения на основании его результатов. В связи с этим активно развиваются аналитические системы для внелабораторного применения – по месту требования, в соответствии с медицинской терминологией, отражающей ту же тенденцию (point-of-care tests). Вполне оправданным представляется особый интерес к иммунохроматографическим тест-системам (ИХТС), обеспечивающим простоту и скорость получения результатов при низкой стоимости. Простое погружение тест-полоски в характеризующую пробу инициирует ее движение под действием капиллярных сил и взаимодействие выявляемых соединений с предварительно нанесенными на тест-полоску реагентами. Результат тестирования оценивается по окрашиванию зон тест-полоски через 10–20 мин и может быть качественным (есть/нет), полуколичественным или количественным.

При оценке состава мясного сырья и готовой продукции большое значение имеет выбор детектируемого маркера, содержащегося в определенном типе мяса. Как правило, в роли молекулярных идентификаторов для ИХТС выступают различные белки и пептиды. Показаны возможности применения в этом качестве тропонина I [8], миозина [9], гемоглобина [10], желатина [11]. Чувствительность иммунохроматографического выявления мясных ингредиентов составляет до 0.01 % (масс./масс.).

Кроме вышеупомянутых биомаркеров, перспективными представляются иммуноглобулины (Ig) – видоспецифичные белки крови млекопитающих и птиц, локализованные также в мышечной ткани в концентрации, достаточной для достоверной детекции. Иммуноглобулины могут быть легко извлечены из мышечной ткани путем простой водной экстракции. Поэтому пробоподготовка, в отличие от термостабильных белков-идентификаторов, характеризуется быстротой и минимальными трудозатратами. Целью настоящего исследования была разработка иммунохроматографических систем детекции иммуноглобулинов для контроля состава мясной продукции.

Тест-система для выявления добавок куриного мяса в мясопродуктах основана на детекции иммуноглобулинов курицы (IgY). IgY детектировали с помощью поликлональных антител кролика, полученных против иммуноглобулинов курицы (АкИк). В ИХТС использовали препараты коллоидного золота (КЗ), которые характеризовались средним диаметром частиц 30 нм. Для конъюгирования были использованы антитела АкИк в концентрации 10 мкг/мл. В аналитической зоне тест-полоски были иммобилизованы антитела АкИк, а в контрольной зоне – антитела козы к иммуноглобулинам кролика.

Для оценки возможностей ИХТС в лунки микропланшета добавляли серию разведений иммуноглобулинов курицы и конъюгатов АкИк-КЗ, инкубировали и погружали в полученную смесь тест-полоску. Образующиеся иммунные комплексы перемещались с жидкостью вдоль мембраны и достигали аналитической зоны, где связывались с антивидовыми антителами с образованием окрашенной полосы.

Показано, что оптимальные аналитические характеристики достигались при концентрации наносимых на мембрану АкИк 1 мг/мл и использовании 2 мкл конъюгата АкИк-КЗ. Время анализа складывалось из 5 мин инкубации пробы с мечеными антителами и 15 мин инкубации тест-полоски с получаемой смесью. Показано, что тест-система позволяет определять содержание куриного мяса в сырых и термообработанных мясных смесях, а также в мясных продуктах (колбасах, бургерах и пр.).

Разработана тест-система для выявления свиных IgG в мясном сырье и в готовых мясных продуктах. На первом этапе пробу в течение 5 мин инкубировали с поликлональными антителами, специфичными к свиным IgG (АкИс) и конъюгированными с КЗ (2 мкл, OD<sub>520</sub> = 15). На втором этапе в реакционную смесь погружали тест-полоску, в тестовой зоне которой были иммобилизованы АкИс, а в контрольной зоне – поликлональные антитела козы, полученные против IgG кролика. Если в пробе присутствовали свиные IgG, то они взаимодействовали с конъюгатом АкИс-КЗ на первом этапе, а затем с АкИс в тестовой зоне, вызывая ее окрашивание, интенсивность которого отражает содержание свиных IgG в пробе.

Тест-система характеризовалась инструментальным пределом обнаружения свиных IgG 9.8 нг/мл и рабочим диапазоном определяемых концентраций 18.5–161.7 нг/мл в оптимизированных условиях. Визуальный предел обнаружения IgG составлял 1.5 нг/мл. Коэффициенты вариации внутри и между сериями измерений не превышали 10 %. Разработанная тест-система выявляет 0.125 % свинины в фарше из баранины, курицы, кролика, индейки и 0.063 % свинины в фарше из говядины. Такая высокая чувствительность позволяет контролировать даже небольшие нарушения рецептуры.

Для обнаружения добавок баранины в мясном сырье и готовой мясной продукции была разработана ИХТС, специфичная к овечьим иммуноглобулинам класса G. Оптимизация анализа позволила выявлять овечьи IgG в течение 13 мин с визуальным и инструментальным пределами обнаружения 60 нг/мл и 10 нг/мл, соответственно. Для применения тест-системы при контроле мясной продукции была предложена простая и быстрая процедура пробоподготовки, реализуемая в течение 45 мин. Высокая специфичность тест-системы в отношении только овечьих IgG была подтверждена при тестировании как иммуноглобулинов других млекопитающих и птиц, так и экстрактов из соответствующих видов мяса. При изучении применимости тест-системы для мясных смесей показана возможность достоверного выявления от 5 % добавок баранины в курятину. ИХТС успешно апробирована при детекции баранины в пельменях.

Полученные результаты свидетельствуют об эффективности использования иммуноглобулинов в качестве маркеров при контроле качественного и количественного состава мясного сырья и готовой мясной продукции, а также подтверждают возможности их высокочувствительного и селективного выявления.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 19-16-00108.*

### Литература

1. Berry, E.M. Food insecurity, social inequity, and sustainability. *World Rev. Nutr. Diet.* 2020, 121, 95–104.
2. Sridhar, K. Recent trends in design of healthier plant-based alternatives: nutritional profile, gastrointestinal digestion, and consumer perception. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2022. DOI: 10.1080/10408398.2022.2081666.
3. Badar, I.H.; Chen, Q.; Liu, H.; Xia, X.; Kong, B. Future trends of processed meat products concerning perceived healthiness: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2021, 20(5), 4739–4778.
4. Lv, C.; Xu, C.; Gan, J.; Jiang, Z.; Wang, Y.; Cao, X. Roles of proteins/enzymes from animal sources in food quality and function. *Foods* 2021, 10(9), article 1988.
5. Xie, Y.; Ma, Y.; Cai, L.; Jiang, S.; Li, C. Reconsidering meat intake and human health: a review of current research. *Mol. Nutr. Food Res.* 2022, 66(9), article e2101066.
6. Regenstien, J.M. The Kosher and Halal food laws. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2003, 2(3), 111–127.
7. Shah, R.; Schwartz, R.A. Meat allergy: a ticking time bomb. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2022. DOI: 10.1007/s40257-022-00696-x.
8. Zvereva, E.A.; et al. flow immunoassay to detect the addition of beef, pork, lamb, and horse muscles in raw meat mixtures and finished meat products. *Foods* 2020, 9(11), article 1662.
9. Pan, X. – D; Chen, J.; Chen, Q.; Huang, B. – F.; Han, J. – L. Authentication of pork in meat mixtures using PRM mass spectrometry of myosin peptides. *RSC Adv.* 2018, 8(20), 11157–11162.
10. Jiang, X.; Wu, M.; Dong, W.; Rao, Q.; Huo, H.; Han, Q. Monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for porcine hemoglobin quantification. *Food Chem.* 2020, 324, article 126880.
11. Tukiran, N.A.; Ismail, A.; Mustafa, S.; Hamid, M. Enzyme immunoassay for the detection of porcine gelatine in edible bird's nests. *Food Addit. Contam. Part A* 2015, 32(7), 1023–1028.