

УДК 637.14.04/07; 637.5.04/07; 637.073

А.А. Бабак, З.Е. Егорова

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЕРТИКАЛЬНОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДЛЯ
ИДЕНТИФИКАЦИИ БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ
В МЯСО-МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ**

УО «Белорусский государственный технологический университет»

г. Минск, Республика Беларусь

Необходимость изучения и рационального использования биологических ресурсов всегда была очевидной для науки и общества. Белки – важная часть питания человека, поскольку в нашем организме не могут синтезироваться все необходимые аминокислоты и часть из них поступает с белковой пищей. Он используется организмом для построения и обновления тканей, а также для выработки энзимов и гормонов, сохраняется в мышцах и органах.

Белки представляют собой высокомолекулярные соединения, полностью или большей частью построенные из аминокислот и составляющие основную часть органических веществ, содержащихся в живой клетке. Белки чрезвычайно разнообразны по структуре и выполняют многочисленные биологические функции [1]. Умение идентифицировать белковых структур в пищевой промышленности является чрезвычайно важным, т. к. нежелательные белки могут выступать в роли аллергенов или токсичных веществ; а также это важно при определении фальсификации продуктов по белковым структурам, входящим в продукт [2].

Однако исследование любого пищевого продукта является довольно сложной аналитической задачей. Из-за индивидуальности состава и многокомпонентности продуктов необходимо приспособлять стандартные методы к особенностям состава и физико-химической структуре продукта [3]. При этом необходимо учитывать физическое состояние исследуемого вещества. Своеобразие состава пищевых продуктов осложняет подготовку проб и подразумевает необходимость предварительного выделения анализируемых компонентов. Поэтому разработка новых и совре-

менных методов идентификации белков в продуктах питания является весьма актуальной и перспективной задачей.

Принципиальным требованием к методам изучения пищевых продуктов является способность разделять и определять отдельные белки, оказывая минимальное воздействие на их состав в ходе анализа. С этих позиций важное место в разработке данных методик и знаний может занять вертикальный гель-электрофорез – один из современных, непрерывно развивающихся методов, позволяющий глубоко изучить качественный состав белков молочных и мясных продуктов.

Электрофорез занимает центральное место среди методов исследования белков. Данный метод позволяет разделять макромолекулы, различающиеся по таким важнейшим параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд, причем эти параметры могут выступать как порознь, так и в совокупности. Метод гель-электрофореза является основным современным инструментом протеомики и его целесообразно применять для идентификации белковых веществ в органической матрице, что позволит получить более точные результаты и более полное разделение белковых смесей на исходные белковые составляющие. Важным также является и то, что электрофоретическими методами можно проводить идентификацию полуфабрикатов, смесей различного фарша или термически обработанных продуктов [3].

Известно, что электрофоретическая подвижность заряженных молекул белка зависит от их суммарного заряда, размера и фор-

мы молекул. Величина заряда зависит от соотношения основных и кислотных ионных групп в молекуле, которое определяется аминокислотным составом белка, рН и ионной силой среды. С увеличением суммарного заряда подвижность макромолекул возрастает, при этом скорость перемещения белковых частиц обратно пропорциональна их размеру. С увеличением размера молекул уменьшается их подвижность в результате увеличения сил трения и электростатического взаимодействия крупных молекул с окружающей средой по сравнению с молекулами меньшего размера. Этими же причинами обусловлено различие в подвижности глобулярных и фибриллярных белков.

Использование полиакриламидных гелей в качестве носителей при проведении электрофореза позволяет широко варьировать размеры пор и градиент рН, что позволяет, меняя концентрацию геля и составы буферных растворов, добиваться более полного и качественного разделения анализируемых веществ. Наиболее целесообразным и предпочтительным для анализа продуктов питания является электрофорез в присутствии анионного детергента додецилсульфата натрия (SDS-sodium dodecil sulfat) характеризующегося тем, что в этой системе суммарный заряд белка равен нулю, т. е. додецилсульфат натрия покрывает белки отрицательно заряженными частицами, нейтрализуя катионные группы [4]. Комплексы «SDS-белок» имеют одинаковый заряд, поэтому процесс разделения происходит только по размеру молекулы. Таким образом, электрофоретическое разделение с додецилсульфатом натрия (SDS-электрофорез) может быть использовано при идентификации мясных продуктов питания, подвергшихся термической обработке (мясные консервы, колбасные изделия). Следовательно, данный метод позволяет выявлять «немясные» добавки в мясных продуктах, что является одним из самых частых методов фальсификации.

В своей изоэлектрической точке каждый компонент белковой смеси находится в виде узкой сфокусированной зоны, что приводит к фракционированию белковой смеси по значению рН входящих в ее состав белков [5]. Именно по этим белковым зонам и происходит идентификация молочных белков и видов

мяса. Этим зонам условно дано название «маркерные зоны». Растительные белки также имеют характерные белковые спектры. Наличие в анализируемом мясном фарше того или иного вида мяса или какой-либо пищевой добавки устанавливается по выявлению на электрофореграмме исследуемого образца соответствующих видоспецифических маркерных зон.

Учитывая выше изложенное, целью наших исследований было использование вертикального гель-электрофореза для идентификации белковых компонентов в продукции мясо-молочной промышленности. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- подбор объектов исследования;
- подбор условий и методики применения гель-электрофореза для определения состава белковых веществ пищевых продуктов;
- выделение белковых составляющих из объектов исследований.

В качестве объектов исследования использовали образцы молочных и мясных продуктов, приобретенные в продуктовых магазинах г. Минска, а именно:

- сметана с массовой долей жира 15, 21 и 24 %;
- вареные колбасы (высшего и второго сортов): 1 – Губернская (в.с.); 2 – Советская (2 с.); 3 – Мортаделла (в.с.); 4 – Молочная (в.с.); 5 – Прима (2 с.)

Контрольными образцами служили:

- сывороточные белки и казеин – для идентификации молочных белков;
- электрофореграммы фаршей говядины и свинины [6] – для идентификации мяса.

С целью проверки возможности идентификации белков немолочного и неживотного происхождения готовились модельные пробы с добавлением растительного белка (сои). Экспериментальная часть работы была выполнена в рамках магистерской диссертации на кафедре физико-химических методов сертификации продукции на установке для вертикального гель-электрофореза «Consort E 4200» в полиакриламидном геле.

Подготовку образцов сметаны осуществляли по ГОСТ Р 53761 [7]. Высушенную пробу обезжиренных белков сметаны хранили в холодильнике при температуре $(4\pm 2)^\circ\text{C}$. Непосредственно перед проведением электро-

фореза белок, полученный из образцов сметаны, переводили в растворимое состояние, затем добавляли глицерин и раствор бромфенолового синего (лидирующий краситель), тщательно перемешивали на аппарате для встряхивания «Вортекс» и центрифугировали при частоте 3000 об/мин в течение 5 мин. Для анализа использовали только надосадочную жидкость. Аналогичным образом к проведению электрофореза подготавливались и образцы стандартов (казеина и сывороточных белков).

Получение гелевой пластинки для электрофореза молочных белков осуществляли по [8] следующим образом. Вначале готовили раствор мономеров (смешивали $(5,6840 \pm 0,0005)$ г акриламида, $(0,1220 \pm 0,0005)$ г N'. N –метиленабисакриламида, $(3,1040 \pm 0,0005)$ г карбамида, $8,75$ см³ раствора трис–НС1 с рН= $(8,8 \pm 0,1)$ и 26 см³ дистиллированной воды), который затем подвергали деаэрации. Далее в раствор мономеров добавляли надсернистый аммоний и

N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин и тщательно перемешивали. Подготовленный выше описанным способом раствор вносили в камеру для полимеризации и вставляли гребенку для получения лунок необходимой длины. Полимеризация геля происходила в течение 6 мин. Камеру с гелем прикрепляли к термостатируемому резервуару и помещали в электрофоретическую ячейку с промышленным электродным буфером «50X TAE Electrophoresis Buffer». В лунки геля под электродный буфер вносили подготовленные пробы объемом 25 мкл каждая. Разделение белковых компонентов проводили в режиме постоянного напряжения, равного 160 В, до прохождения маркерного красителя до нижней границы гелевой пластины. Далее гель из электрофоретической ячейки извлекали, фиксировали, окрашивали в течение 2 ч и отмывали от красителя. Полученная гелевая пластинка с разделенными белками приведена на рисунке 1.

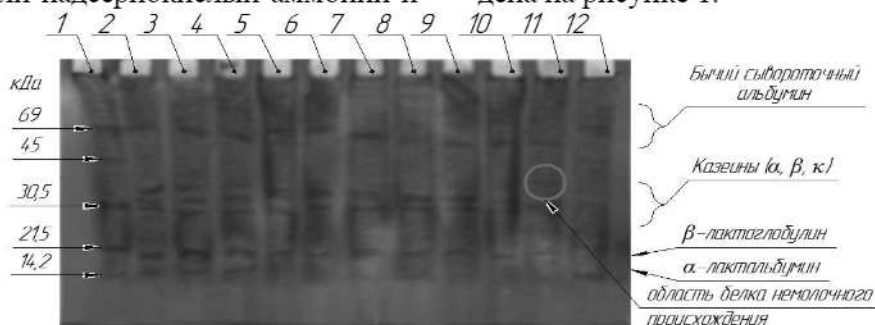


Рисунок 1 – Электрофореграмма образцов сметаны: 1, 12 – стандарты белков с различными молекулярными массами (кДа); 2-4 – сметана жирностью 15 %; 5-7 – сметана жирностью 21 %; 8-10 – сметана жирностью 24 %; 11 – модельный образец с введенным растительным белком

Идентификация белков молочного и немолочного происхождения осуществлялась визуально на основе сравнения полос анализируемых проб с контрольными пробами.

Как показали результаты исследований, все пробы сметаны имели те же полосы при том же пройденном расстоянии, что и контрольные образцы (казеин и сывороточные белки). Это свидетельствует о том, что исследуемые нами кисломолочные продукты содержат белки только молочного происхождения. В тоже время, анализируя электрофореграмму модельного раствора с растительными белками, можно отметить явные различия в положении и наличии дополнительных белковых зон, свидетельствующих о присутствии белков немолочного происхождения.

Таким образом, сравнительный анализ

полученных нами электрофореграмм свидетельствует о существенных различиях в составе образцов сметаны с белками из натурального молока и образцов с введенными чужеродными белками немолочного происхождения, что позволяет сделать следующий вывод. С помощью данного метода можно определять содержание необходимых компонентов в молочном сырье и готовой продукции, а также выявлять добавки, имеющие немолочное происхождение.

Подготовку образцов колбасной продукции осуществляли следующим образом. Образцы вареной колбасы дважды измельчали и замораживали при температуре минус 6 °С. Замороженные пробы аккуратно растирались до получения однородной субстанции. К порции полученного гомоген-

ната, равной 1 г, добавляли 10 см³ ацетона, перемешивали и центрифугировали при 5000 об/мин. Полученную надосадочную жидкость сливали, а к остатку прибавляли 10 см³ ацетона и повторяли центрифугирование. Данную процедуру проводили не менее 4 раз до полного обезжиривания образца. Полученный обезжиренный осадок высушивали в вытяжном шкафу при комнатной температуре в течение 48 ч до полного его высыхания. К сухому остатку приливали 3 см³ свежеприготовленного трехпроцентного раствора Тритона XI00, гомогенизировали полученную смесь и выдерживали ее на водяной бане при температуре 40 °С 20 мин. После этого полученная смесь подвергалась окончательному центрифугированию при 5000 об/мин в течение получаса. Фугат переносили в чистые сухие пробирки и использовали для анализа [4].

Подготовку стоковых растворов буферов для проведения процесса разделения образцов осуществляли по ГОСТ Р 31475 [9]. Гель для электрофоретической ячейки состоял из двух слоев: более плотного нижнего сепарирующего и менее плотного верхнего формирующего слоев. Формирование лунок в гелевой пластине и их заполнение растворами белков осуществлялось таким же образом, как и для молочных белков. Далее камеру с гелем прикрепляли к термостатируемому резервуару и помещали в электрофоретическую ячейку. В электродные камеры ячейки заливали электродный буфер, приготовленный по [9].

Объем растворов белка, вносимого в каждую лунку, составлял 20 мкл. После внесения образцов прибор подключали к

источнику тока и проводили электрофорез. Контроль электрофоретического разделения осуществляли визуально по движению полосы красителя бромфенолового синего. За счет использования при электрофорезе более плотного геля разделение проводилось при более высоком напряжении, равного 175 В. Электрофорез проводился до прохождения маркерного красителя до нижней границы гелевой пластины.

В ходе электрофореза окрашенные полосы белков собирались на дне углублений верхнего геля, затем продвигались вниз. Происходило формирование молекул белка под воздействием тока (движение) и распрямление белковых глобул в присутствии реактива додецилсульфата натрия, способствующего разворачиванию молекул белка [10]. После прохождения белков через верхний гель полосы собирались на границе двух гелей, входили в нижний сепарирующий гель, и происходило разделение белка на его составные части (рисунок 2).

По окончании электрофореза отключали источник питания, пластины разнимали, отслаивая одну из них от геля с помощью шпателя. Отделенный гель помещали в раствор 13% трихлоруксусной кислоты, выдерживали в течение 10 мин, после чего промывали дистиллированной водой и переносили в окрашивающий раствор. Через 1,5 ч снова промывали дистиллированной водой и раствором для обесцвечивания в течение 2 ч.

Сравнивая визуально полосы разделенных белков контрольных проб и проб исследуемых объектов (рисунок 2), можно идентифицировать основные виды мясного сырья, из которого были сделаны пробы.

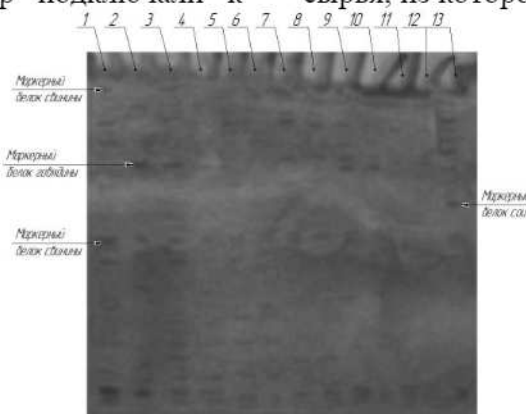


Рисунок 2 – Электрофореграмма образцов колбас: 1 – стандарт свинины (свиной фарш); 2 – стандарт говядины (говяжий фарш); 3-4 – образец 1; 5-6 – образец 2; 7-8 – образец 3; 9-10 – образец 4; 11-12 – образец 5; 13 – модельный белок, содержащий сою

Сравнив результаты разделения белков известных видов фарша (контрольные пробы говядины и свинины) видно, что все анализируемые пробы имеют те же основные маркерные полосы, что и контрольные образы при том же пройденном расстоянии. Данный факт свидетельствует о том, что анализируемые образцы имеют в своем составе виды мяса, указанные производителем в маркировке изученных нами объектов исследования.

Что касается модельного образца с внешним соевым белком (лунка №13), введение которого вне установленной рецептуры может быть использовано для замены дорогостоящего мясного белка и удешевления продукции (фальсификация продукции), то рассмотрев пластинку мы наблюдаем четко выделенную область, несвойственную для мясных белков. Эта область является областью белка растительного происхождения. Выделение этой области является показателем того, что в продукции есть добавки.

Таким образом, с помощью вертикального гель-электрофореза возможна проверка готовых продуктов питания на предмет введенных искусственно белок-заменяющих ингредиентов, а значит можно предупредить попытку фальсификации.

Также можно сделать вывод, что по выявлению на электрофореграмме видоспецифичных маркерных белков можно проводить идентификацию видовой принадлежности сырья в составе многокомпонентного пищевого продукта.

References:

1. Himiya pishchi: Belki: Struktura, funkcii, rol' v pitanii / I.A. Rogov, L.V. Antipova, N.I. Dunchenko, N.A. ZHerebcov. V 2-h kn. Kn.1 – M.: Kolos, 2000. – 384 s.

2. Mikulovich, J.S. Tovarovedenie prodovol'stvennyh tovarov / J.S. Mikulovich. - Minsk, 2010. - 416 s.

3. СНepurnoj, I.P. Identifikaciya i fal'sifikaciya prodovol'stvennyh tovarov / I.P. СНepurnoj. – M., 2002. – 460 c.

4. Uilson, K. Prakticheskaya biohimiya / K. Uilson. – M., 2008. – 149 s.

5 Dambre, A. Himiya belka / A. Dambre. – M., 1990

6. Antipova, L.V. Metody issledovaniya myasa i myasnyh produktov / L.V. Antipova, I.A. Glotova, I.A. Rogov. – M.: Kolos, 2001. – 376 s.

7 GOST R 53761. Moloko. Identifikaciya belkovogo sostava ehlektroforeticheskim metodom v poliakrilamidnom gele.

8. Osterman L.A. Metody issledovaniya belkov i nukleinyh kislot / L.A. Osterman. – M.: MCNMO, 2002. – 248 s.

9 GOST R 31475. Myaso i myasnye produkty. Opredelenie massovoj doli rastitel'nogo (soevogo) belka metodom ehlektroforeza

10. Poznyakovskij, V.M. Ekspertiza myasa i myasoproduktov / V.M. Poznyakovskij. – Novosibirsk, 2001. – 526 s.

A.A. Babak, Z.Y. Yegorova

USING A VERTICAL GEL ELECTROPHORESIS FOR IDENTIFICATION OF PROTEIN COMPONENTS THE MEAT AND DAIRY PRODUCTS

Summary

The results of the identification of proteins in finished products for dairy and beef production are shown. Control of raw product components and identification of additives "unwanted" proteins is possible, as proven in an experiment.