

Н. В. Савина, науч. сотр.,
С. В. Кубрак канд. биол. наук, вед. науч. сотр.,
Л. В. Милько, науч. сотр.,
А. В. Кильчевский д-р биол. наук, проф., акад.
(Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, г. Минск)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ОБРАЗЦА ПРОДУКЦИИ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

В настоящее время растет интерес потребителей к натуральным компонентам питания, несущим потенциальные выгоды для здоровья. Для удовлетворения потребительского спроса крупные компании, производящие продукты питания и напитки, движутся в направлении замены синтетических пищевых красителей на натуральные пигменты растительного происхождения. Производство натуральных красителей значительно дороже синтетических, и, тем не менее, спрос на продукты с «чистой этикеткой», то есть свободные от искусственных добавок, продолжает расти. Среди природных пигментов значительный интерес представляет группа антоцианов – как непосредственно пищевых красителей, так и в качестве компонентов функционального питания. В тестах *in vitro* экспериментально доказана высокая антиоксидантная способность антоцианов, которую связывают с защитой от некоторых форм рака, с улучшением зрения, со снижением риска развития диабета, с усилением когнитивных функций и памяти [1].

В данном исследовании проанализирован коммерческий продукт растительного происхождения – концентрированный сок черной моркови (изготовитель «Gemma Gida Kimya», Турция). Целью являлась видовая идентификация образца молекулярно-генетическими методами. В последние годы черная (фиолетовая) морковь используется в пищевой промышленности как альтернатива синтетическому красителю FD&C Red 40 (аллура красная). Концентрация антоциановых пигментов в фиолетовой моркови значительно превышает их содержание в других фруктах и овощах. Добавление сока черной моркови в готовую соковую продукцию обогащает продукт инулином, влияющим на уровень холестерина в крови, а также рядом биологически активных компонентов, которые улучшают работу сердца, желудка, кишечника и почек. Научные исследования по анализу накопления антоцианов в корнях черной моркови из различных мест произрастания показали, что турецкие сорта накапливают антоцианы во всех слоях корнеплода, демонстрируя наиболее интенсивную фиолетовую окраску [2–4]. Одновременно с появлением новых перспективных ingredi-

ентов возникает проблема их возможной фальсификации, что в конечном итоге может повлиять на здоровье потребителей. Фруктовые соки наряду с оливковым маслом, специями, чаем входят в топ-10 продуктов питания, наиболее подверженных фальсификации. Поэтому актуален поиск надежного, чувствительного и эффективного метода для оценки подлинности соковой продукции. Технологии на основе ДНК оказались полезными для аутентификации пищевых продуктов. Они быстрые, производительные, ниже по себестоимости, хорошо воспроизводимые [5–6]. Для определения видовой принадлежности образца растительного происхождения использовали метод ДНК-штрихкодирования. В качестве маркера использовали ДНК-штрихкод *psbA-trnH* [7]. Последовательность прямого и обратного праймеров и базовые рекомендации по условиям проведения амплификации представлены на сайте CCDB (Canadian Centre for DNA Barcoding). Геномную ДНК выделяли с помощью коммерческого набора COrDIS согласно протоколу производителя (Гордис, РФ). В исследовании использовали образцы концентрированного экстракта сока черной моркови (Extrakt-3) и разведенного концентрата (Extrakt-4-razved). В качестве контроля использовали ДНК, выделенную из корнеплода черной моркови (*Daucus atrorubens*-5). Для постановки ПЦР использовали реактивы Биолабмикс (РФ), праймеры производства Праймтех (РБ). Амплификацию проводили в термоциклере C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad, США), результаты проверяли в 1,5% агарозном геле. Терминирующую реакцию проводили с использованием коммерческого набора Brilliant Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Nimagen, Нидерланды) с последующей очисткой продуктов реакции этанолом. Определение нуклеотидной последовательности проводили на генетическом анализаторе ABI 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США). Для каждого образца выполняли анализ в двух повторностях (две пробы из одного продукта) в прямом и обратном прочтении. Хроматограммы сиквенсов анализировали в Sequence Scanner 1.0., результирующая (консенсусная) последовательность для каждого образца получена с помощью модуля ContigExpress Project. Полученные консенсусные последовательности *psbA-trnH* исследуемых образцов сравнивали с видовой последовательностью ID KC526436.1 моркови черной *Daucus carota* L. var. *atrorubens* Alef. из международной базы NCBI BLAST.

В ходе секвенирования ДНК-штрихкода *psbA-trnH* у контрольного образца (*Daucus atrorubens*-5) получен фрагмент размером 252 п.н., у образцов Extrakt-3 и Extrakt-4-razved фрагменты размером 253 п.н. и 221 п.н., соответственно. Полученные последовательности в ви-

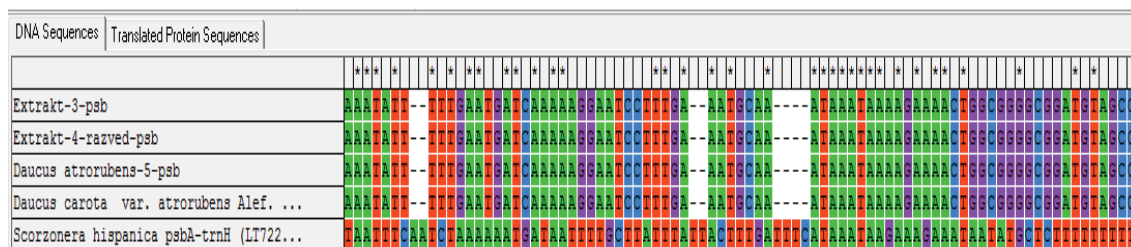
де QR-кодов представлены в таблице.

Таблица – Маркерные последовательности *psbA-trnH* образца растительного происхождения

Образец	Extrakt-3	Extrakt-4-razved	Daucus atrorubens-5
Последовательность <i>psbA-trnH</i>			

Множественное выравнивание полученных нами маркерных участков проведено в программе MEGA 4, в сравнение дополнительно были включены две контрольные последовательности *psbA-trnH* из базы данных NCBI BLAST – эталонный образец моркови черной *Daucus carota* L. var. *atrorubens* (KC 526436.1) и козельца испанского *Scorzonera hispanica* L. (LT 722067.1).

Последовательность *psbA-trnH* козельца испанского (скорцонера, чёрный корень) была дополнительно включена в анализ по причине внешней схожести корнеплода с черной морковью. По химическому составу все разновидности скорцонеры богаты микро- и макроэлементами, полисахаридами и аминокислотами, что обуславливает белковую ценность овоща. В ходе анализа выявлено полное совпадение участка *psbA-trnH* концентрированного экстракта (Extrakt-3) и разведенного концентрата (Extrakt-4-razved) с участками *psbA-trnH* ДНК контрольного образца, выделенного из корнеплода черной моркови (*Daucus atrorubens*-5). Сравнение концентрированного экстракта (Extrakt-3) и разведенного концентрата (Extrakt-4-razved) с эталонным образцом KC 526436.1 из международной базы данных выявило сходство на 100%. Сходства предоставленного для исследования биологического растительного материала с материалом *Scorzonera hispanica* (скорцонеры) не обнаружено (рис. 1).



1 строка – последовательность *psbA-trnH* образца Extrakt-3; 2 строка – последовательность образца Extrakt-4-razved; 3 строка – последовательность образца *Daucus atrorubens*-5; 4 строка – эталонный участок черной моркови KC 526436.1; 5 строка – эталонный участок скорцонеры LT 722067.1

Рисунок 1 – Результат сравнения маркерных последовательностей *psbA-trnH*

Таким образом, с помощью метода ДНК-штрихкодирования установлено, что переданный на исследование образец растительного происхождения («Gemma Gida Kimya», Турция) достоверно (100%) является концентрированным соком черной моркови (*Daucus carota* L. var. *atrorubens* Alef.).

Растущее внимание потребителей к функциональному питанию и более здоровой диете обуславливает эволюцию рынка продуктов питания. В свою очередь, подлинность продуктов питания вызывает серьезную озабоченность как у потребителей, так и у производителей. Необходим надежный метод для точной видоидентификации материала растительного происхождения, и технологии на основе ДНК, в том числе метод ДНК-штрихкодирования, являются достоверным методом аутентификации пищевых продуктов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Carrot Anthocyanins Genetics and Genomics: Status and Perspectives to Improve Its Application for the Food Colorant Industry / M. Iorizzo [et al.] // Genes. – 2020. – Vol. 11, 906. – P.1–36; doi:10.3390/genes11080906.
2. Cebeci, E. Effects of growing location and cold storage on nutritional values of purple carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) genotypes / E. Cebeci, F. Hanci // Applied Ecology and Environmental Research. – 2019. – Vol. 17, N 6. – P. 15245-15254; doi: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1706_1524515254.
3. Müller, R. UV-B Exposure of Black Carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens*) Plants Promotes Growth, Accumulation of Anthocyanin, and Phenolic Compounds / R. Müller // Agronomy. – 2019. – Vol. 9, N 323. – P. 2-12; doi:10.3390/agronomy9060323.
4. Polyphenolic profile and biological activities of black carrot crude extract (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) / A. Smeriglio [et al.] // Fitoterapia. – 2018. – Vol. 124. – P. 49-57.
5. Dasenaki, M. E. Quality and Authenticity Control of Fruit Juices. Review / M.E. Dasenaki, N.S. Thomaidis // Molecules. – 2019. – Vol. 24, N 1014. – P.1–35; doi:10.3390/molecules24061014.
6. Advances of DNA-based methods for tracing the botanical origin of food products / P. Madesis [et al.] // Food Research International. – 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.042>.
7. Hollingsworth, P.M. Choosing and using a plant DNA barcode / P.M. Hollingsworth, S.W. Graham, D.P. Little // PLoS One. – 2011. – Vol. 6 (5). e19254. doi: 10.1371/journal.pone.0019254.