

**А.Н. Архипов, О.В. Мудрикова, Н.А. Масунов**

## **СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ ОРГАНИЗМОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ПРОИЗВОДСТВЕ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК**

Учитывая актуальность проблемы обеспечения продовольственного российского рынка качественными продуктами питания, в работе проведен сравнительный анализ геномов растений и микроорганизмов, используемых в производстве пищевых добавок, для выбора ДНК-мишени, которая позволит разработать методику идентификации стабилизирующих добавок растительного и животного происхождения.

Сравнительный анализ, геном, стабилизаторы, молекулярная мишень.

### **Введение**

Молочные продукты являются важнейшим компонентом в рационе питания человека. Постоянный прирост населения, совершенствование технологий получения традиционных продуктов питания и создание новых пищевых продуктов с заданным комплексом свойств, отрыв мест производства продуктов от мест их потребления вызывают необходимость стабильного роста использования пищевых добавок в молочной промышленности. Применение стабилизаторов необходимо для создания молочных продуктов с заданными свойствами.

Стабилизаторы дают возможность регулировать вязкость продуктов на разных этапах технологического процесса, который облегчает производство. С их помощью можно уменьшить температуру разлива молочного продукта, не вызывая при этом снижения вязкости конечного продукта. Они разрешают предупреждать выделение сыворотки при сохранении кисломолочных продуктов благодаря повышению влагоудерживающей способности молочного белкового сгустка, а также достигать повышения вязкости продуктов и увеличения прочности молочного белкового сгустка без увеличения содержания жира, который дает возможность вырабатывать с их помощью продукты питания пониженной калорийности. Для улучшения их стойкости при сохранении часто используют стабилизирующие добавки растительного и животного происхождения [1].

Их токсикологическая оценка и гигиеническое нормирование в настоящее время актуальны во всех странах. Исследования пищевых добавок в международном масштабе начаты еще в 50-х годах XX в. со времени создания в 1956 г. Объединенного комитета экспертов по пищевым добавкам. Принципы проведения исследований пищевых добавок и контаминантов, содержащихся в продуктах питания, сформулированы в руководстве «Гигиенические критерии состояния окружающей среды. Принципы оценки безопасности пищевых добавок и контаминантов в продуктах питания» [2]. На основании обобщения результатов исследований Объединенный комитет экспертов ФАО/ВОЗ выработал принципы проверки безопасности пищевых добавок. В 1963 г. учреждена объединенная программа ФАО/ВОЗ по пищевым стандартам. Относительно

пищевых добавок было признано, что в целях охраны здоровья населения целесообразно ограничить поступление их в организм.

Однако использование пищевых добавок в экономически развитых странах постоянно расширяется. И, поскольку они являются чужеродными веществами для организма человека (по химическому составу или по количеству, поступающему в организм человека с продуктами питания), это обуславливает необходимость проведения исследований и мероприятий, направленных на предупреждение их неблагоприятного влияния на здоровье человека.

Большинство пищевых добавок не оказывает особого пищевого и функционального влияния на организм, некоторые из них инертны в используемых количествах. Так, в виде стабилизаторов для молочных изделий допущены агар, агароид (фурцеларан), альгинат натрия. Экспериментальные исследования токсичности указанных соединений малочисленны, но имеются сообщения о том, что у людей и животных не обнаружено признаков их неблагоприятного влияния на организм. Однако поступление указанных соединений в организм в повышенных количествах может оказывать послабляющее действие, например, агар оказывает наиболее выраженное послабляющее действие [3].

Имеется достаточно много пищевых добавок, способных оказывать неблагоприятное воздействие на организм человека при поступлении в повышенных количествах. Определение уровня их безопасности проводится на основе гигиенической регламентации. В нормативах использования пищевых добавок отражены количественные показатели, которые характеризуют их безопасные уровни. При изучении каждой пищевой добавки в токсикологическом эксперименте устанавливается ДСД (допустимая суточная доза).

На основании проведенных исследований устанавливается недействующая доза добавки (или NOEL) и ДСД поступления ее в организм, которая выражается в мг/кг массы тела и, как правило, имеет коэффициент запаса, равный 100. Исходя из ДСД высчитывается максимально допустимый уровень (МДУ) присутствия пищевой добавки в каждом конкретном продукте [2].

Помимо этого, необходимо разработать, утвердить и провести метрологическую аттестацию мето-

дов идентификации и количественного определения содержания отдельной пищевой добавки в конкретных видах продукции.

В химическом отношении стабилизаторы являются полисахаридами или белками. При классификации пищевых стабилизаторов могут применяться разные подходы и критерии как с точки зрения происхождения, так и способа производства. Классификация пищевых стабилизаторов довольно сложная, и потому был предложен целый ряд разных схем, например:

- описание всех соединений как полисахаридных материалов;
- наименования, которые содержит ботанический вид;
- происхождение – растительное, животное или синтетическое;
- химическая классификация.

Позднее была предложена классификация, которая включает метод обработки:

- натуральные стабилизаторы;
- модифицированные натуральные или полусинтетические стабилизаторы (химические модификации натуральных стабилизаторов или подобных им веществ);
- синтетические камеди (полученные химическим синтезом) [4].

Кроме этого, все чаще возникает термин «стабилизационные системы», он хоть и не является общепотребительным, но широко применяется в молочной промышленности для обозначения смесей загустителей и гелеобразователей, качественный и количественный состав которых специально подобран для производства различных молочных продуктов [5].

Таким образом, проблема разработки методов идентификации и количественной оценки содержания стабилизаторов в продуктах молочной промышленности является актуальной и очень сложной задачей.

#### Объекты и методы исследований

Прогресс в расшифровке различных геномов открывает для исследователей возможность использования электронных международных геномных баз [6]. Большой практический интерес представляет их использование при поиске новых молекулярных мишеней для вновь создаваемых высокочувствительных ДНК-методов оценки качества и экспертизы растительного сырья для пищевых добавок и молочных продуктов питания на их основе.

Актуальность создания новых методик неоспорима, поскольку используемые в настоящее время методы органолептического и физико-химического анализа не позволяют однозначно идентифицировать и оценить количественно содержание стабилизаторов в готовых продуктах питания. Несмотря на то что использование метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для видовой идентификации тканей животного и растительного происхождения получило высокую оценку зарубежных специалистов, в нашей стране это направление не нашло еще широкого практического применения в области санитарной экспертизы [7].

Первоочередной задачей является выбор презентативных ДНК-мишеней, на основе которых возможно конструирование олигонуклеотидных праймеров для дифференциальной амплификации специфических последовательностей ДНК. Нами были выбраны следующие требования, предъявляемые к ДНК-мишени:

- биологические (мишень должна присутствовать во всех целевых видах организма, видовые отличия мишени должны быть возможно меньшими, а родовые как можно большими, отсутствие резистентности у целевых видов микроорганизмов, отсутствие мутаций мишени);

- технологические (мишень должна быть детально изученным объектом, структура мишени при технологической обработке в процессе приготовления продуктов питания должна быть постоянной).

В качестве объектов исследования были выбраны нуклеотидные последовательности организмов, участвующих в производстве стабилизаторов. Объекты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Источники и ботанический вид стабилизаторов растительного и животного происхождения

Название стабилизатора	Источник	Ботанический вид
Гуаровая камедь	Растение	<i>Cyamopsis tetraganoloba</i>
Камедь рожкового дерева	Растение	<i>Acacia Mill.</i>
Гуммиарабик	Растение	<i>Acacia senegal</i>
Трагакант	Растение	<i>Astragalus</i>
новая ка дь	Бактерии	<i>Xanthomonas campestris</i>
Агар-агар	Водоросли	<i>Gracilaria, Gelidium, Ceramium</i> и др.
Альгинат натрия	Водоросли	<i>Laminaria cichorioides, Laminaria japonica</i>

Поиск нуклеотидных последовательностей геномов проводили по базам данных GeneBank – Национального института здоровья США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), EMBL – Европейской молекулярно-биологической лаборатории (<http://www.ebi.ac.uk>), DDBJ – Национального института генетики Японии при помощи поисковой системы Entrez Национального центра биотехнологической информации США.

Сравнение нуклеотидных последовательностей геномов растений с помощью программы парного выравнивания ClustalW Multi Sequence Alignment позволило сократить количество известных нуклеотидных последовательностей (в силу выравнивания последовательности расходящихся последовательностей) с нескольких тысяч для каждого объекта до десятков. Анализ нуклеотидных последовательностей на вариабельность проводили online.

Построение филогенетического дерева проводили с помощью программы AliBee, ресурса Институ-

та физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского (МГУ) www.belozersky.msu.ru.

### Результаты и их обсуждение

Филогенетические связи между всеми живыми организмами могут быть прослежены путем сравнения последовательностей генов и отдельных участков генов, кодирующих рибосомальные РНК. Данные полностью либо частично секвенированных генов рРНК различных видов организмов поступают в международные базы данных и доступны через компьютерную сеть.

Большинство из стабилизаторов, выбранных для исследования, производятся из сырья растительного происхождения. Геном хлоропласта является уникальным для растений. В растительной клетке он представлен большим количеством копий, переменных и некодируемых областей (интроны и межгенные области), что делает данный геном очень чувствительным к родовой и видовой идентификации растительного сырья в объектах [10].

Наибольшее распространение для таксонометрических исследований в подобных случаях получил ген 5,8S рРНК. 5S-рРНК область является компонентом всех рибосом, кроме митохондрий определенных видов растений. Во всех высших эукариотах 5S-рРНК транскрибируется от сотен до тысяч генов. Гены, кодирующие 5S-рРНК, расположены отдельно от 18S-26S рРНК кластеров генов и организованы в виде тандемных повторов с альтернативными массивами кодирования последовательностей 5S-рРНК, и транскрибирующими спейсерами (ITS) по одному или несколько сайтов в геноме [11]. Кластеры генов могут быть локализованы как в связанном состоянии и, следовательно, не располагаться в хромосоме или самостоятельно в геноме. У высших эукариот 5S-рРНК гены организованы в виде тандемных повторов, 200–900 б.п. длиной, с 1000–50 000 копий [12].

Сам ген состоит из 120 п.н. и связан со спейсерами различных размеров. Последовательность 120 п.н. 5S-рРНК сохраняется внутри рода, а ITS области кластеров изменяются от вида к виду и имеют различную длину в диапазоне от 100 до 800 п.н. [11], так как они, видимо, находятся не под жестким давлением отбора в кодирующей области.

Гуаровая камедь и трагакант производятся из растений, относящихся к различным семействам, поэтому для их идентификации будет достаточно использовать родоспецифичные участки, за которые отвечает 5,8S рРНК ген. Нуклеотидная последовательность гена 5,8S рРНК для *Cyamopsis tetraganloba*: cgcgtcgttg ccctaactcg gacgtctcat ttggtgtcgt tgagtggcga atgttgctt cccacgagcg ttgcctcatg gttggtgaa atcgagtcg gtggtggagg atgccacgat tgatatggtg ttgagtaat tagctcgaga cccatcgtga gcgactccat ctgttttgg actctttgac ccacatgagc atctccgatg ctcgtagc. Нуклеотидная последовательность для *Astragalus*: tcggcggtgg tgctttgca catgatacag aatgactctc ggcaacggat atctaggctc ttgcatcgat gaagaacgta gcgaatcgcg atacttggtg tgaattgcag aatcccgtga.

В случае гуммиарабика и камеди рожкового дерева, а они производятся из растений, относящихся

к одному роду – род *Acacia*, необходимо использовать кластер ITS1-5,8S рРНК-ITS2, где ITS1 и ITS2 – это транскрибируемые спейсеры. Нуклеотидная последовательность кластера ITS1-5,8S рРНК-ITS2 для *Acacia senegal*: gagcgaccgg cggaccggtt ggatategtg ccccagcgtg gggggcgacg gcctcgcgc ccgaggcctc ccccgccaac caaacccgg cgccgagge gccaaggaaa cgtaacagag cagtggcgac gccggccggc ggcccgggaa cggcgccgca cggcgccca cggcaacgc gaaccgaaac gactctcggc aacggatat tcggctctcg catcgatgaa gaacgtagcg aaatgcgata ctggtgtga atgcagaat cccgtgaacc atcagctctt tgaacgcaag ttgcgccga agcctctgg ccgagggcac gtctgctgg gctcacgca ccgtgccac cggccacc cggcgcgcg cggagatggc ctccgggag ccccgcctc cggctggcgg aatgggggc cgacttgac ggccgccacg gtccacggtg gctgagcgg cagcgcctc agaccaagac gtgcggggc cgtccgagga gagggccgt cggcgagggc agcgcctcc acaaccgac ggcactc. Для *Acacia Mill.* – ggcggttcg tcggcgac gtcgagaa gtccactgaa cttatcatt tagaggaagg agaagtcgta acaagtttc ctaggtgaa cctgcggaag gatcattgtc gcgtccacgc aaragagcg acccgcaac cgttggaac gatcccacg agcgggggag ggcgaggcg cggccgaggc ctcccggc aaccaacc cggcgccca ggcgcaagg aacagagaay gaaagcgggg cgcgcccgt ggcgcccgg gaacggagcc gatcggcag cgtcgcgcgc ctcttccat ttgtgatcc gaaacgactc tcggcaacgg atatctggc tctcgatcg atgaagaacg tagcgaaatg cgactctgg ttgtaattgc agaatcccgt gaaccatcga gctttgaa gcaagttgc cccgaagcgg tcaggccgag ggacgcctg cctgggcgtc acgacgctc gccaacgccc gatcccacgg cgcgcccgga tgatggcctc ccgggagcct cggcccccgg ctggccgaaa agggggccca acgtggcgac gccacgac caggtggtt gagcagcagc tcgcccggc cgagacgtg cgcgctcgt cccaccggc ttggcccgc cggcagggca ccacggctgc caagcccgta cggacccca ggtcaggcgg ggctaccgcg tgaattaagc atatcaataa g.

Ситуация осложняется при анализе таких стабилизаторов, как агар-агар и альгинат натрия, они производятся из бурых водорослей. Классификация бурых водорослей неоднозначна, и существует несколько систем классификаций, например, система классификации в соответствии с Saunders and Hommersand (2004) и система классификации в соответствии с Hwan Su Yoon et al. (2006). Для оценки межвидовых отношений было проведено построение филогенетического дерева, оно приведено на рис. 1. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что водоросли, используемые для производства стабилизаторов в промышленных масштабах, относятся к различным семействам и даже порядкам. Это свидетельствует о том, что в качестве ДНК-мишени будет достаточно использовать ген 5,8S-рРНК.

В случае агар-агара, когда возможно использование сразу трех видов водорослей, относящихся к различным порядкам, необходимо создать систему, позволяющую одновременно идентифицировать присутствие любого из объектов. Необходимо создать систему, содержащую праймеры ко всем нуклеотидным последовательностям гена 5,8S рРНК различных видов водорослей.

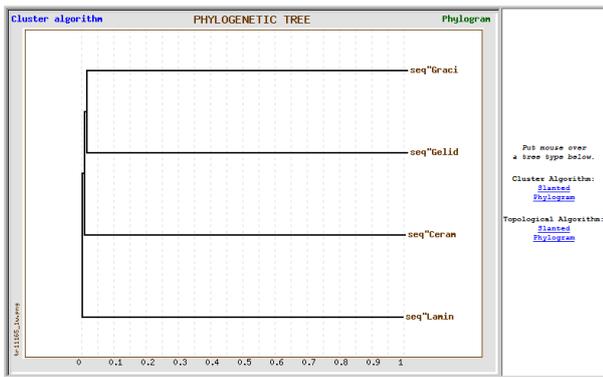


Рис. 1. Филогенетическое дерево, основанное на анализе структур ITS1-5,8S рРНК-ITS2, отражающее родственные связи исследуемых видов бурых водорослей

Нуклеотидные последовательности гена 5,8S рРНК, выбранные для дальнейшей работы над идентификацией агар-агара:

1) acaaatgga cttggcatt ctgcattatg tgtgctcaga tgatgactt gttttttaa aataataa ggacatggtc ttgagctc tttcaataa gaggccgct gatgggtgcg tccttacgac ttgtaataa aattacaaga ttgggggtca cctgaagaat acttgggtgt gtacagcgtt gccttgaat aattgaaaa aactcgtttt ttctgtttt ttctgaaag taatgtgtac aagaataa accgtgtttt cattctctc ttgaaagact tgagttgat cttttttt ttccctcc gggaagaca aaaaagaact catgttggg gaaagctgc aatttaatt tccgacaga cttgagaacc ttgactcgag ttctgtggc gaccggctg cgaattggtg tttgatgta aaagtcgac aacattctg cagtgttta agacgctta caagaatata ccaaatcga tcaagatag tatcgttcta tctcagatg aattgctgga gagtaaga gtaggagtg tgaccataa acaaatgctt tttgtttt gtttggggc gttttattg ttgtttgct cgacatccat attatggggg ggtttttgt ttgcagaaaa gaaaagcaga aaggatcna tatttattga aaattctgg gatttttct ctg;

2) tccgacaaa actcaatctt attcagttt tgaaccctt tggttaaaa aactgaata gctgatggc gtagattca ttactttag tccatgaat cttttagaat ttatggtgct ctgaagagta gagcgtgctg aaaaatttga accttttgg ttatttata agaagatgt gcaatattc tattgacatt aattcatt ttgaagcgtt acgaagtaatt attattttc tcaatgttt caaatggag ttagtggaa cagaatcta gatgaatc cagaaacat aggtactgtt tattattgct aataaaaa caattttt ggatcctaaa tcaga;

3) aaacgtaatg cgattgacg aactcgtgaa tcatcgaatt ttgaacgca agtggcctc gcgggaaatc ctgcgagcat gtctgtttga gtgcccttg gtaaaaaaca ctaaacatc tgttttaatt cagatttatt ttgccgtctt tctgtttca ttacttgaa gcacggggga tggcagctgt tgggtgctc ctgctagat gttttttat ctggtgggg caccitaaat ttatgacacc attggagggc atcgtctcaa aacacggaat tacttttaa ttcacctgcc gagcaattat ttgtgataat ttgtgttta cgcattctat cagctctccg agatgacatg cttgcatgaa gtctggggag gaaatacggg gtggcgtgtg tgccttttgg gggtcctgac gaagtaata gatcttatt taattttct tttttctt gggcattct caacatgc agccaagca attttcttc tggaaataga gtctgtaaa ttgtcgagga attttgtt ttgactgtgn tgcataaatt gtttttatt ttgattgat gtgattctc gtgggtaaa atgtattca ttatttga aac.

#### Список литературы

1. Залашко, М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки / М.В. Залашко. – М.: Агропромиздат, 1990. – 192 с.
2. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. Принципы оценки безопасности пищевых добавок и контаминантов в продуктах питания. – ВОЗ, Женева, 1991. – 159 с.
3. Габович, Р.Д. Гигиенические основы охраны продуктов питания от вредных химических веществ / Р.Д. Габович, Л.С. Припутина. – Киев: Здоров'я, 1987. – С. 199–237.
4. Зобкова, З.С. Пищевые вещества, формирующие консистенцию и новые свойства молочных продуктов / З.С. Зобкова, Т.П. Фурсова // Молочная промышленность. – 2007. – № 10. – С. 18–19.

Нуклеотидные последовательности кластера ITS1-5,8S рРНК-ITS2 для *Laminaria cichorioides* и *Laminaria japonica* до сих пор не просеквенированы, поэтому для анализа использовали последовательности других видов рода Ламиinarieвые. Возможность проведения таких испытаний была доказана сравнением нуклеотидных последовательностей геномов всех депонированных видов данного семейства с помощью программы парного выравнивания ClustalW Multi Sequence Alignment. Таким образом, была получена следующая нуклеотидная последовательность гена 5,8 S рРНК для идентификации альгината натрия: tgtgac accactcgc ccctctccct cccccgtgaa aagggtggg aggcggggcg gactctgagt gtccggagt tccatgctc cgagtgcacc taatctcgtg aacgaagcct ctgcgcctt gccgacaga gttgtgacg gctcgtcgtt cggcggcgac tctcactcg ccaaacgtgc gcaggctcgg gggcttctc cggcgtctc cgagaagggt gtaaaaacc tctctcgtg gaaaccgtac cactttcgt cg.

Из выбранных для исследования стабилизаторов только ксантановая камедь производится из источника животного происхождения – бактерии *Xanthomonas campestris*. Особенно широко в таксономических исследованиях у бактерий используются последовательности генов малой (16S) субъединицы рРНК, которая, как меньшая по величине, имеет менее протяженный и потому менее изменчивый ген по сравнению с большой (23S) субъединицей. Использование в качестве ДНК-мишени данного гена отвечает всем необходимым требованиям. Нуклеотидная последовательность, выбранная из баз данных для последующей работы: cctcctttga gcatgacgtt attcgtcctg tccggcgtcc tcacaataa cctgcattca gagattcata cgggacaggg tccgtatgag aagtccttt tggggcctta cccagctgg gagacacct gctttgcaag caggggctg tccggtgat cccgacaggg tccaccatatt ttagtgaaaa gactcgggt ctgtagctca ggtggttaga ggcaccctc gataagggtg agtccgtag ttcgagctca cccagaccca cactctgaa ttagtgac acttaagaat ttatggat cagcgttgag gctgagacat gttctttat aactgtgac gtagcagcg tttgagat ctatctaac gtgtcgttga ggctaaggcg gggactcga gtcctaaat aattgagtcg tatgttcggt ttggtggctt tgcaccac acaacacggc atgtaactcc gagcaactt ggggttat ggtaagcga ataagcgcac acggtgg.

В результате исследований проведен сравнительный анализ геномов организмов, используемых в производстве пищевых добавок, произведен выбор презентативных ДНК-мишеней для проведения полимеразной цепной реакции в случае родовой и видовой идентификации различных видов стабилизаторов. Полученные данные имеют огромное значение в процессе разработки новой методики идентификации и количественной оценки определенных пищевых добавок.

5. Сарафанова, Л.А. Применение пищевых добавок в молочной промышленности. – СПб.: Профессия, 2007. – 262 с.
6. Дубанов, А.В. Компьютерный поиск новых мишеней для действия противомикробных средств на основе сравнительного анализа геномов / А.В. Дубанов, А.С. Иванов, А.И. Арчаков // Вопросы медицинской химии. – 2001. – № 3. – С. 54–60.
7. Обухов, И.Л. Применение ПЦР в ветеринарии // Аграрная Россия. – 2002. – № 5. – С. 62–64.
8. Rossen, L. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA extraction solutions / L. Rossen, P. Norskov, K. Holmstrom, O.F. Rasmussen // Int. J. Food Microbiol. – 1992. – № 17. – P. 37–45.
9. Woolfe, M. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud / M. Woolfe, S. Promrose // Trends Biotechnol. – 2004. – № 22. – P. 222–227.
10. Delano, J. Use of an intron region of a chloroplast tRNA gene (trnL) as a target for PCR identification of specific food crops including sources of potential allergens / J. Delano, A. Schmidt // Food Research International. – 2004. – № 37. – P. 395–402.
11. Hunter, D.C. Fruit-based functional foods II: the process for identifying potential ingredients / D.C. Hunter, J. Zhang, L.M. Stevenson, M.A. Skinner // Int. J. Food Sci. Technol. – 2008. – № 43. – P. 2123–2129.
12. Gnani, G. Maffei PCR, sequencing and PCR–RFLP of the 5S-rRNA-NTS region as a tool for the DNA fingerprinting of medicinal and aromatic plants / G. Gnani, M. Cinzia, M. Berteaa, E. Massimo // Flavour Fragr. J. – 2010. – № 25. – P. 132–137.

ГОУ ВПО «Кемеровский технологический институт  
пищевой промышленности»,  
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47.  
Тел./факс: (3842) 73-40-40  
e-mail: office@kemtipp.ru

## SUMMARY

**A.N. Arhipov, O.V. Mudrikova, N.A. Masunov**

### **Comparative Genome Analysis of Organisms Used in the Production of Food Additives**

Taking into account the urgency of the problem of supplying the Russian food market with high quality foodstuffs, a comparative analysis of genomes of plants and microorganisms used in food additives production and the DNA target selection that will help to develop a methodology for the identification of stabilizing additives of plant and animal origin has been done.

Comparative analysis, genome, stabilizers, molecular target.

Kemerovo Institute of Food Science and Technology  
47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia  
Phone/Fax: +7(3842) 73-40-40  
e-mail: office@kemtipp.ru

