

СУЧАСНІ ІНСТРУМЕНТАЛЬНІ МЕТОДИ ВИЯВЛЕННЯ ЖЕЛАТИНУ У ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ

Я.Ф. Жукова, к.б.н., зав.відділу,

П.І. Петров, пров.фах.,

Т.С. Кобилінська, пров.фах.,

відділу аналітичних досліджень та якості харчової продукції,

Інститут продовольчих ресурсів НААН

Желатин широко застосовується у різних галузях промисловості завдяки своїм унікальним фізико-хімічним та структурним властивостям. Оскільки більшість желатину є бичачого та свинячого походження, актуальним є розробка способів його виявлення, оскільки в деяких країнах існують обмеження щодо застосування такої продукції, зумовлені релігійними та культурними традиціями. Аналіз існуючих методів виявлення желатину показав, що кожний підхід має свої переваги і недоліки. Більшість з них, на даний момент, відпрацьовуються лише у наукових установах, у лабораторних умовах, на унікальному обладнанні. Найбільш перспективними є методи імуноферментного аналізу, але їхнім недоліком є неможливість детектування желатину в складних матриксах та у зразках після високотемпературної обробки. Також на серйозну увагу заслуговують методи молекулярно-генетичних досліджень, а саме полімеразна ланцюгова реакція. Ці методи є надійними, ефективними і відтворюваними, проте, внаслідок значної варіативності походження желатину та різноманіття його хімічних модифікацій, цей метод потребує постійного оновлення праймерів та складної валідації. Завдяки швидкому розвитку нанотехнологій знаходять своє застосування спектральні та хроматографічні підходи до детектування желатину, які є зручними і високоточними, але потребують високої чистоти досліджуваних зразків. Таким чином, визначення вмісту та видового джерела походження желатину є надзвичайно важливим питанням у сфері контролю якості і безпечності харчових продуктів, яке, на даний час, залишається недостатньо вивченим.

Ключові слова: желатин, електрофорез, імуноферментний метод, спектроскопія, хроматографія

MODERN INSTRUMENTAL METHODS FOR THE IDENTIFICATION OF GELATIN IN FOODSTUFFS

Ya.F. Zhukova., Ph.D., Biology, Head of Department

P.I. Petrov, Senior specialist,

T.S. Kobylinskaya, Senior specialist,

Department of Analytical Research and Food Quality,

Institute of Food Resources NAAS

Gelatin is widely used in various industrial fields due to its unique physico-chemical and structural properties. Since that most of produced gelatin is bovine and porcine origin, it is important to develop methods of its detection, because in some countries there are restrictions on the use of such products, according to religious and cultural traditions. An analysis of existing methods of gelatin detection has shown that each approach has advantages and disadvantages. Most of them are still being processed only in scientific institutions, in laboratory conditions, on unique equipment. The most promising are the methods of ELISA (the enzyme-linked immunosorbent assay), but their disadvantage is the impossibility of detecting gelatin in complex matrixes and in high-temperature treatment's samples. Also, serious attention should be paid to molecular-genetic methods, exactly to polymerase chain reaction. They are reliable, effective and reproducible. However, due to the considerable variability in the origin of gelatin and the

variety of its chemical modifications, these methods require constant primers updating and complicated validation. Rapid development of nanotechnology stimulates using of spectral and chromatographic approaches of gelatin detection, which are convenient and high-precision, but require high purity of the test samples. Thus, the determination of the content and species of origin of gelatin is an extremely important issue in the field of food quality and safety control, which, at present, is insufficiently studied.

Key words: chromatography, gelatin, electrophoresis, ELISA, spectroscopy

Зростаючий попит у споживачів на функціональні продукти харчування стимулює виробників виготовляти продукти та добавки з підвищеною поживною цінністю. Високий вміст незамінних амінокислот та привабливі фізико-хімічні властивості желатину зумовлюють його широке використання з метою підвищення якості, поліпшення структури та зовнішнього вигляду харчових продуктів, лікарських препаратів та засобах особистої гігієни [1].

Желатин – це водорозчинний високомолекулярний білок, який отримують зі сполучної тканини тварин (шкіри, рогів, кісток, білої сполучної тканини) в результаті гідролізу колагену [1]. Желатин широко застосовується, як в'язучий та гелеутворюючий агент у харчових, фармацевтичних та косметичних виробках, завдяки своїй унікальній структурній стабільності, функціональним та фізико-хімічним властивостям [2-3]. Желатин є засвоюваним білком, що містить унікальний набір амінокислот, зокрема, з високим вмістом гліцину ($\approx 27\%$), проліну та гідроксіпроліну ($\approx 25\%$), глютамінової кислоти ($\approx 10\%$), аланіну ($\approx 9\%$), аргініну ($\approx 8\%$) [4].

Залежно від структури вихідного колагену існують два основних способи виробництва комерційного желатину:

1) Спосіб кислотної обробки (тип А), який застосовується для колагену з невеликою кількістю ковалентних поперечних зв'язків та колагену з високим вмістом жиру (наприклад, свинячої або рибної шкіри), щоб уникнути омилення.

2) Спосіб лужної обробки (тип Б), який використовується для отримання желатину з подрібненої сировини та кісток (наприклад, побічних продуктів обвалювання великої рогатої худоби та риби) [5].

Фізико-хімічні характеристики желатину визначаються тривимірною структурою амінокислотної послідовності, розподілу молекулярної маси, іонної сили та рН, оскільки два типи желатину відрізняються за ізоелектричною точкою. Для желатину типу А ізоелектрична точка знаходиться в діапазоні рН від 7,0 до 9,0, тоді як для желатину типу Б – лише від 4,6 до 5,5. Функціональні особливості желатину пов'язані з його емульгуючими, гелеутворюючими та адгезивними властивостями, здатністю до розчинення та в'язкістю [5].

Проте, як ціна, так і прийнятність продуктів з желатину споживачами залежать від виду тварин, з якого його отримано. Наприклад, стандарти виробництва халяльної та кошерної продукції встановлюють, щоб желатин або желатинові капсули не виготовлялися зі сполучної тканин та кісток свиней, тоді як індустські релігійні звичаї вимагають, щоб желатин не був отриманим з тканин великої рогатої худоби (корів). Окрім цього, в Європі та США уникають вживання продуктів з желатином, отриманого з великої рогатої худоби, що пов'язано з можливістю перенесення губчастої енцефалопатії, що є серйозним нейродегенеративним захворюванням, яке спричиняє дегенерацію головного та спинного мозку [6]. У зв'язку з цим, останнім часом, набуває популярності желатин, вироблений на основі кісток та шкіри риб, оскільки її вживання не суперечить більшості культурних та релігійних традицій [1].

Таким чином, визначення вмісту та видового джерела походження желатину є надзвичайно важливим та актуальним питанням у сфері контролю якості, так і безпечності харчових продуктів. Це сприяє обмеженню зоонозних хвороб, насамперед, енцефаліт та аутоімунні захворювання (алергії на гідролізований білок тваринного походження), підвищує довіру споживачів та перешкоджає недобросовісній конкуренції.

Метою даної роботи є аналіз останніх досліджень з ідентифікації желатину у харчових продуктах різними інструментальними методами, їх класифікація і порівняння.

Матеріали та методи. У даній роботі використано пошук та аналіз наукових робіт, присвячених дослідженню методів якісної та кількісної ідентифікації желатину у харчових продуктах.

Результати дослідження. Варіювання асортименту харчових продуктів та динаміка популярності окремих виробів великою мірою залежить від культурних, релігійних традицій, економічного розвитку регіону та фінансового забезпечення населення. Крім того, останнім часом на попит споживачів великою мірою впливають нутріцевтичні концепції та вимоги відповідності окремим міжнародним стандартам (дотримання релігійних вимог, органічній сертифікації, простежуваності географічного походження тощо).

Дослідження властивостей желатину та його видової ідентифікації в харчових продуктах у центрі уваги фахівців країн, де переважає мусульманське населення. Розроблено та верифіковано низку методів, спрямованих на виявлення тваринного желатину, а саме спектрометричний [7], хроматографічно-хеометричний [8-9], електрофоретичний [10-11], хромато-мас-спектрометричний [12]; імуно-хроматографічний [13], методи на основі полімеразної ланцюгової реакції [14-15]. Ці методи переважно базуються на білкових та ДНК-маркерах та їх спектральних відбитках.

Методи на основі аналізу білків. Імуноферментний аналіз (ІФА, ELISA). ІФА – імунологічний метод якісного або кількісного визначення різних низькомолекулярних сполук, в основі якого лежить специфічна реакція антиген-антитіло. Виявлення комплексу, що утворився, проводять з використанням ферменту в якості мітки для реєстрації сигналу. Теоретичні основи ІФА спираються на сучасну імунохімію і хімічну ензимологію, знання фізико-хімічних закономірностей реакції антиген-антитіло, а також на основні принципи аналітичної хімії.

ІФА є одним з напрямків хімічної ензимології, що активно розвивається. Це обумовлено тим, що в ІФА унікальна специфічність імуно-хімічної реакції (тобто зв'язування антитіл виключно з певними антигенами, і ні з якими іншими) поєднується з високою чутливістю детектування ферментативної мітки (до 10^{-21} моль в зразку) [16]. Висока стабільність реагентів, простота методів реєстрації, можливість створення каскадних систем посилення хімічних сигналів, відносно низька ціна сприяли широкому впровадженню ІФА в різні галузі, в тому числі харчову промисловість.

Серед різновидів ІФА, непрямі та «сендвіч»-методики найкраще підходять для автентифікації продуктів харчування, зокрема, желатину в різних виробках [7, 17]. Реакцію проводять за допомогою поліклональних антитіл, отриманих з тирозильованих зразків свинячого та бичачого желатину [18]. Тирозильовання відбувається за участі тирозину, отриманого з колагену, з метою посилення імуногенності останнього і перетворення його в потужний антиген.

У *непряму* ІФА модифіковані антитіла мають великі відмінності за своєю чутливістю. Деякі антитіла можуть виявити походження желатину в продуктах харчування, а інші проявляють високу чутливість до кислого або лужно-обробленого желатину. Тирозильований свинячий желатин показує більшу чутливість, ніж бичачий, за винятком лужно-обробленого желатину (отриманого з свинячих кісток). Проте, таким способом деякі антитіла проявили низьку специфічність через гомологію послідовності колагену серед різних видів [18].

Для отримання більшої специфічності методики до бичачого желатину та зменшення чутливості до процесу його обробки, було розроблено новий спосіб отримання антитіл проти колагену $\alpha 1$ -специфічної бичачої послідовності, щоб показати зміни в амінокислотних послідовностях між бичачим колагеном та колагеном інших видів [19]. Було обрано специфічні послідовності з центральної області N-кінцевого регіону в бичачому колагені – телопептидного ланцюга $\alpha 2$ (I) (Glu-Phe-Asp-Ala-Lys-Gly-Gly-Gly-

Pro-Gly), як пептид 1 і послідовність (Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Pro-Gly-Pro-Pro-Gly), як пептид 2. Показано, що антитіла антипептиду 2 мають більш високу реакційну здатність до желатину та колагену, ніж антипептиду 1 та виявили більшу чутливість до бичачого желатину, ніж до свинячого. Таким чином, даний підхід може бути використаний як ефективний аналітичний інструмент для розрізнення походження желатину (в залежності від виду тварини). Проте, вид обробки при виготовленні желатину, вид тварини та джерело сировини (кістки або шкіра) можуть впливати на чутливість аналізу [19-20].

З метою ідентифікації походження желатину (свинячого або бичачого) в харчових продуктах та для зменшення ризику розвитку алергічних реакцій на желатин у пацієнтів, було проведено дослідження з використанням методики «сендвіч»-ІФА [21]. Авторами розроблено двоє «сендвіч»-поліклональних антитіл: одне, отримане після імунізації желатином кролів (pAb2-pAb1, де pAb1 використовується для зв'язування, а pAb2 – для покриття), а інше – отримане від кіз (pAb3-pAb3). Тест на реактивність для обох антитіл показав високу реакційну здатність до свинячого та бичачого желатину, але низьку до рибиного. Антитіло від кіз, pAb3-pAb3, реагувало, в основному, на бичачий і свинячий желатин, отриманих шляхом лужної обробки, тоді як антитіло від кролів, pAb2-pAb1, реагувало тільки зі свинячим желатином, отриманим шляхом лужної обробки. Загалом, автори успішно виявили желатин у всіх харчових продуктах, використовуючи антитіло з кози (pAb3-pAb3), без випадків хибно-позитивних чи хибно-негативних результатів, чи перехресної реактивності. Основними чинниками, що впливають на чутливість методів «сендвіч»-ІФА є різновид обробки колагену – кислотна обробка призводить до меншої чутливості антитіл, ніж лужна. Також, даний підхід може бути обмежений перехресною реактивністю у випадку зразків м'яса інших видів тварин (курка або морські тварини) [20].

В цілому, методи ІФА здатні виявляти желатин без необхідності використання дорогого обладнання або підготовки зразків високої чистоти [7, 20-21]. Крім того, методи ІФА забезпечують високу швидкість аналізу, низьку вартість та високу специфічність диференціювання різних джерел походження желатину [22]. Однак, жоден з досліджених підходів ІФА-аналізу, внаслідок високого ступеню чутливості біомаркерів желатину до денатурації, не в змозі ідентифікувати желатин, отриманий з риби, а також в продуктах, технологія вироблення яких передбачає обробку температурою, тиском або хімічним реагентом [23-24].

Електрофорез. Електрофоретичні техніки, розроблені для ідентифікації желатину, засновані на аналізі молекулярної маси біомаркерів протеїнів, є простими, відносно швидкими, з низькою собівартістю аналітичного обладнання [10, 25]. Желатин різного походження містить пептиди (ланцюги) з різною молекулярною масою, що може бути використано для його ідентифікації. Желатин містить ланцюги α , β і γ колагену з приблизними молекулярними масами 100 кДа, 200 кДа та 300 кДа, відповідно. Проте, між різновидами желатину спостерігаються значні коливання довжин і молекулярної маси цих ланцюгів, що призводить до появи окремих смуг у його різних видів під час електрофоретичного розділення [26]. Фрагментний профіль желатину різного походження також має відмінності. Так, при електрофоретичному розділенні, бичачий желатин розділявся на 4 фрагменти, а свинячий – на 12 [27].

Згідно з результатами проведених досліджень, електрофорез у поліакриламідному гелі з використанням додецил сульфату натрію (ПААГ-НДС) є простим і доступним способом автентифікації желатину у харчових продуктах [11, 28]. Також, поєднання ПААГ-НДС електрофорезу та інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є використовується для ідентифікації бичачого та свинячого желатину в продуктах харчування, що засновується на двовимірній конформації пептиду або білка [11].

Комбінування електрофорезу та такого способу статистичної обробки даних, як аналіз головних компонент (РСА) підвищує чутливість автентифікації джерела походження желатину. Так, даний підхід давав змогу виявляти концентрацію в 5% желатину у змішаній матриці [17]. Желатин екстрагували з желатинових оболонок

фармацевтичних капсул, сировиною для яких виступали свинячі та бичачі субпродукти, за допомогою холодного ацетону. В результаті розділення білків методом ПААГ-НДС електрофорезу було отримано розділення свинячого желатину на 12 смуг (239, 221, 200, 171, 158, 139, 122, 115, 108, 96, 90 і 83 кДа), а бичачого на 4 смуги (236, 222, 120 і 107 кДа).

Однак, в желатинвмісних продуктах, які було піддано серйозній технологічній обробці (наприклад, у зефірі, желе, желатинових цукерках, твердих і м'яких оболонках капсул), амінокислотний профіль продукту може відрізнятися від амінокислотних вихідною сировиною. Таким чином, метод електрофорезу більш придатний для ідентифікації желатину в умовах однорідної матриці, в той час як при аналізі значно оброблених продуктів можна отримати неточні результати.

Хроматографічні методи. Хроматографічні методи ефективні для ідентифікації хімічних сполук і також здатні виявляти структурно подібні компоненти у композиційних харчових матрицях [12, 28-29]. Для розділення різних біомолекул з близькими структурними подібностями застосовують переважно газову (ГХ) та вискоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) [30]. Принцип розділення ВЕРХ базується на трьох основних хімічних характеристиках: електричному заряді, розмірі молекули та її полярності. Даним методом ідентифікують вуглеводи, білки, амінокислоти, вітаміни, фенольні сполуки, хіральні сполуки, пігменти та вітаміни. Газова хроматографія базується на здатності молекул переходити у газовий стан і може бути використана для розділення специфічних летких сполук, присутніх у рідкому або твердому зразку [31-32]. Також, метод ВЕРХ зі зворотною фазою (ВЕРХ-ЗФ) є корисним інструментом автентифікації, оскільки він простий в експлуатації та здатний виявляти широкий спектр макромолекул, особливо з використанням флюорометричного детектора [33].

Останнім часом, для автентифікації харчових продуктів широко використовується поєднання методів хроматографії високої роздільної здатності з мас-спектрометрією, такими як газова хроматографія та мас-спектрометрія (GC-MS/MS) або рідинна хроматографія з часо-пролітним мас-аналізатором (LC-TOF-MS) [3, 32]. Серед цих методів, для ідентифікації свинячого та бичачого желатину в деяких молочних продуктах харчування (морозиво, сир та йогурт) був використаний метод рідинної хроматографії високого тиску, поєднаний з квадрупольною часо-пролітною мас-спектрометрією та іонізацією електророспилюванням (Nano-UPLC-ESI-q-TOF-MSE) [34]. Даний складний аналіз проходив у два етапи: 1) виділення желатину з харчових продуктів перед підготовкою проби для мас-спектрометрії; 2) розщеплення та визначення його точної молекулярної маси трипсинових пептидів желатину. Автори змогли виявити специфічні пептиди маркерів для свинячого та бичачого желатину, які були додані до зразків молочних продуктів.

Також, комбінування ВЕРХ та мас-спектроскопії в змозі виявляти специфічні поліпептидні ланцюги після гідролізу з HCl в концентрації 3 моль/л [35]. Даний підхід базується на теорії, що желатин містить деградовані поліпептиди з колагену типу А, а амінокислотні послідовності у желатині різного тваринного походження не ідентичні. Для розщеплення свинячого і бичачого желатину для отримання специфічних послідовностей пептидів застосовували ферменти: трипсин, 6-Амінохінол-*N* гідроксисукцинімідилу карбамат і орто-фталдальдегід [36-38]. Порівняння існуючих даних показало, що більшість пептидних послідовностей у желатині типу А і типу Б виявилися подібними, але деякі часткові послідовності були специфічними. Більше маркерних пептидів ідентифікували у ланцюзі $\alpha 2$ – різниця загальних амінокислотних залишків становила 2,3%, в той час як в ланцюзі $\alpha 1$ – 1,1% [3,20]. Проте, на точність, чутливість та відтворюваність цього способу можуть впливати температура і гідролізу [20, 35].

Основна відмінність в амінокислотному складі желатину різного тваринного походження полягає в значеннях концентрації аспарагіну і глутаміну. В свинячому желатині рівень даних амінокислот вищий, в той час як в бичачому спостерігають дефіцит

цих амінокислот. Таким чином, вибірковий підхід до екстракції, попередньої концентрації та аналізу глутаміну та аспарагіну може бути надійним інструментом для автентифікації джерела походження желатину. Проте, ідентифікація цих амінокислот досить складна, через їхню гідрофільну природу та низьку абсорбцію в УФ-спектрі.

Зважаючи на це, був розроблений спосіб автентифікації тваринного желатину на основі комбінування імпульсної електромембраної екстракції (РЕМЕ) та ВЕРХ. Для екстрагування та попередньої концентрації дериватизованих амінокислотних послідовностей було використане імпульсне електричне поле [39]. Завдяки додаванню о-фталевого альдегіду збільшувалося ультрафіолетове поглинання та ліпофільність. Потім було застосоване електричне поле з напругою 137В протягом 20 хв із частотою 10 хв⁻¹ для міграції аналітів через органічну рідку мембрану в об'ємі приблизно 200 мкм у водну акцепторну фазу. Отриману водну фазу аналізували за допомогою ВЕРХ-УФ. Даний підхід забезпечував 43% або 79% збіжність при екстрагуванні. Межа виявлення для аспарагіну та глутаміну становила 25 нг·мл⁻¹ та 50 нг·мл⁻¹ відповідно [39]. Таким чином, цим способом можливо детектувати наявність желатину та джерело його походження.

Комбінування хроматографічних методів, амінокислотних профілів желатинових оболонкок капсул, отриманих гідролізом HCl, та обробка отриманих даних методом аналізу головних компонент (РСА) показало, що головна компонента 1 (PC1) та головна компонента 2 (PC2) продемонстрували 64,4% та 15,7% варіації амінокислотного складу для бичачого та свинячого желатину відповідно [11, 37].

Таким чином, хроматографічні методи забезпечують високу специфічність та чутливість аналізу при розрізненні джерела желатину в чистому вигляді, але, наприклад, при гідроксилюванні деяких амінокислот в процесі ферментування, відбувається деградація маркерних пептидів та збільшується складність диференціювання пептидів, що робить хроматографічні методи менш придатними для автентифікації джерела желатину в складних матрицях [3].

Методи на основі дослідження нуклеїнових кислот (ДНК). Методи хроматографії при ідентифікації сполук передбачають високий ступінь очищення, що є складним завданням і вимагає дорогого обладнання та часу. Метод ІФА є швидким та зручним, однак він не підходить для продуктів з високою температурною обробкою через денатурацію епітопів, що є біомаркерами. Таким чином, використання маркерів на основі ДНК є більш перспективним, що пов'язано зі значною стійкістю біомаркерів ДНК при обробці високими температурами, тиском та хімічними реагентами, які мають місце при виробництві як желатину, так і желатин-вмісного продукту [6, 40]. Окрім цього, значною перевагою застосування ДНК-методів є їх надзвичайна чутливість, що забезпечується ампліфікацією всього від однієї копії до значної кількості, що дає можливість їх легко ідентифікувати [41].

Автентифікація джерела походження желатину за допомогою ДНК-методів, серед яких метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) є основним, полягає в екстракції ДНК з желатину та його похідних. Вдала екстракція залежить від успішного лізису продукту із желатину з використанням протеїнази К, розривом зв'язків між білками та ДНК, що включає модифікацію рН. Так, осадження ДНК в ізопропанолі при значеннях близько рН 8,5, підвищує якість екстрагованої ДНК [42].

Видоспецифічний ПЛР-аналіз (ПЛР з детектуванням за «кінцевою точкою»). Автентифікація джерела походження желатину за допомогою специфічного ПЛР включає в себе ампліфікацію цільового сегмента мітохондріального гену за допомогою пари видоспецифічних праймерів з подальшою ідентифікацією методом електрофорезу на агарозному гелі з використанням бромистого етидію та інших фарбників [40]. Чутливість даної методики становить 0,001-0,1% при ідентифікації свинячого, бичачого та рибного желатину [40].

Також, дану методику успішно застосовано для автентифікації желатину у халяльних харчових продуктах [43]. Для цього були розроблені праймери з

мітохондріальної ДНК (ген цитохром b) з розміром амплікона 212 п.н. (для свинячого желатину) і 271 п.н. (для бичачого). Чутливість запропонованого методу становила 0,1% для обох типів желатину в умовах змішаної матриці. Окрім цього, було проаналізовано 8 оболонок капсул з бичачого желатину та 8 продуктів харчування, які містили бичачий желатин, з позитивними результатами ідентифікації в усіх зразках.

Для розрізнення желатину різного походження (бичачого, свинячого та риб'ячого) у желатинових оболонках фармацевтичних капсул запропоновано варіант груп-специфічної ПЛР, орієнтованої на мітохондріальний ген 16S рРНК. Встановлено, що межа виявлення для специфічних сайтів риби тилапії, великої рогатої худоби та свиней складала відповідно 0,1; 0,001; 0,01 нг/мкл, а для універсальних мішеней риб межа виявлення становила 0,01 нг/мкл [44].

Для ідентифікації желатину з тканин свиней у желатинових оболонках фармацевтичних капсул було проведено ПЛР сайзерн гібридизацію. Показано, що чутливість розробленого аналізу змінюється з послідовністю цільових генів, де межа чутливості становить 0,25 нг для цитохром b; 0,1 нг для II субодиниці цитохромоксидази (СОІІ) і 0,0001 нг для послідовностей генів АТР6. Таким чином, автори прийшли до висновку, що ПЛР сайзерн гібридизація є надійним та чутливим методом автентифікації свинячої ДНК у желатинових оболонках фармацевтичних капсул [15].

Проте, такі фактори, як складність, відсутність специфічності та низька ефективність ампліфікації, притаманна цьому методу, зробили його непридатним для кількісного застосування [45]. Крім того, згідно протоколу, за єдиною кінцевою точкою можна за одну реакцію проаналізувати лише один вид желатину, що збільшує вартість аналізу і вказує на необхідність подальших досліджень [45].

Метод ПЛР в режимі реального часу (qPCR) нещодавно стала важливим аналітичним інструментом в галузі біохімії, молекулярної біології, харчової промисловості [46]. На відміну від звичайної ПЛР, яка передбачає аналізування ампліфікованих фрагментів за допомогою електрофорезу в агарозному гелі, ПЛР у реальному часі виявляє ампліфіковану ДНК спектрофлуориметрично за допомогою репортера барвника [45, 47]. Крім ідентифікації, метод ПЛР в режимі реального часу був використаний для виявлення та кількісного визначення наявності конкретних желатинів у оболонках фармацевтичних капсул [6, 40] та в оброблених харчових продуктах, таких як зефіри [48]. Таким способом у продукті було виявлено 1,0% свинячого та бичачого желатину. Подальші дослідження показали можливість детектування желатину у приправах і рідких продуктах [48]. Однак, такі аналізи передбачають високі витрати та складні етапи пробопідготовки та валідації.

Біосенсори. Останнім часом розробка нанотехнологічних біосенсорів та підходів для виявлення ДНК отримала величезну підтримку з боку дослідницьких центрів, виробників та фінансових установ. Наноструктурні матеріали з унікальними оптичними та електрохімічними властивостями значною мірою полегшують біорозпізнавання специфічних ДНК-мішеней. Висока стабільність, поліморфна гнучкість і гарантовано захищені області молекул ДНК ідеальні для виявлення конкретних цільових послідовностей. Новітні наноматеріали дозволили розробити наноплатформи з вбудованими сайтами розпізнавання ДНК, які можна було б визначити за допомогою спектроскопічних, електрохімічних, магнітних та інших аналітичних інструментів до цільової гібридизації. Злиття наноматеріалів з конкретною зондовою ДНК або одноланцюговою ДНК (ssDNA) є ключовим для розвитку біосенсорів ДНК. Різноманітні наноматеріали – золото, діоксид кремнію, оксиди металів, графен і вуглецеві нанотрубки – показали великий потенціал в зондуванні нуклеїнових кислот [49].

Однак, поки що при ідентифікації ДНК за допомогою сенсорних пристроїв існує чимало проблем. По-перше, ці пристрої знаходяться на етапі розробки. Отже, більшість цих датчиків все ще перебувають у лабораторних масштабах і тестуються з очищеною ДНК, вилученою з біологічного зразка. По-друге, у приладах, що використовують ДНК, нуклеїнові кислоти з'єднуються з поверхнею, що суттєво обмежує гнучкість поверхневої

реакції при гібридизації мішені, оскільки ДНК, прикріплена до поверхні електростатичною або гідрофобною взаємодією, має тенденцію набувати плоскої конформації.

Слід зазначити, що хоча застосування біосенсорів інтенсивно розвивається від нанопристроїв у комп'ютерних системах до гігантських промислових зразків, поки що було проведено лише експерименти з синтетичними олігонуклеотидами та ДНК, виділеної з тканин свиней або мікробіологічних об'єктів, і не було проведено жодної спроби з автентифікації желатину.

Спектроскопічні методи. Спектроскопічним методикам властиво забезпечувати надійні та точні результати з невеликих об'ємів зразків. За їх допомогою можливо вимірювання поглинання світла у діапазоні довжини хвилі 200-800 нм, що спричиняє збудження π -електронних зв'язків, які є розповсюдженими у широкому діапазоні біомолекул [50]. Різні типи біомакромолекул, такі як ліпіди, білки та вуглеводи, містять делокалізовані електрони в ароматичних структурах, що здатні поглинати УФ-світло за довжини хвилі 150-400 нм [51]. Наприклад, пептидні зв'язки здатні поглинати в діапазоні близько 180-230 нм, а ароматичні структури в молекулах окремих амінокислот, таких як тирозин, трипсин та фенілаланін, мають поглинання близько 240-230 нм. Ці спектральні відбитки є основою для ідентифікації желатинових продуктів у складних матрицях [50-51].

Серед численних спектроскопічних інструментів інфрачервона спектроскопія (ІЧ) є найбільш поширеною і застосовується для генерації ІЧ-відбитків великого домену функціональних груп у біомолекулах [11, 52-53]. ІЧ вимірює молекулярні коливання, які зумовлені поглинанням світла, і успішно встановлює специфічну вторинну структуру різних желатинів, самоорганізацію макромолекул внаслідок теплової обробки та внутрішні зв'язки у молекулах колагенів різних видів [53]. Це робить ІЧ корисним аналітичним підходом для автентифікації джерела желатину, оскільки його результати представляють актуальну інформацію про різні функціональні групи маркерних пептидів [20].

Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є (ІЧПФ) – це різновид ІЧ-спектроскопії, який використовується для ідентифікації органічних молекул в полімерах або полімерних сумішах, що забезпечує особливу чутливість до виявлення неорганічних домішок [52]. На сьогодні, методика ІЧПФ використовується для перевірки автентичності халяльних продуктів, таких як м'ясо та желатин. Було доведено можливість застосування ІЧПФ для розрізнення свинячого та бичачого желатину [53].

ІЧПФ-спектроскопія та метод порушеного повного внутрішнього відбиття (ІЧПФ-ППВВ) – це новітній підхід, чутливий до коливання молекул у хімічних сполуках, він потребує мінімальної пробопідготовки. Спектральні результати отримують за допомогою спеціального ППВВ-елемента. Метод базується на відображенні променів на границі розділу двох фаз: фази кристалу порушеного повного внутрішнього відбиття з відносно високим показником заломлення та фази досліджуваного зразку з більш низьким показником заломлення.

Для обох типів желатину (бичачого та свинячого) спектральні характеристики дуже подібні у діапазоні $650-4,000\text{ см}^{-1}$, а основні відмінності між ними виявлені у діапазоні $3,280\text{ до }3,290\text{ см}^{-1}$ та $1,200-1,660\text{ см}^{-1}$. Спектральна область від $3,280\text{ до }3,290\text{ см}^{-1}$ обумовлена водневими зв'язками (N-H) амідної групи. Дискримінантний аналіз амідного зв'язку желатину в даному регіоні дозволяє виявити походження желатину. Це було підтверджено на основі інтенсивності спектрів, що варіюють від одного желатину до іншого. І хоча ця методика добре спрацювала для бичачого та свинячого желатину, даний підхід не в змозі виявити желатин з риби. Крім того, він вимагає обов'язкового залучення статистичних програм, зокрема кластерного аналізу або методу головних компонент [54]. Саме такий підхід надав можливість виявити свинячий і бичачий желатин у змішаних зразках. Останнім часом деякі автори використовували спектроскопічні методи

(наприклад, ІЧПФ) у поєднанні з методом найменших квадратів (PLS) для перевірки наявності або відсутності специфічних аналітів, присутніх у харчових продуктах [55-56].

За звичайних спектроскопічних методів цільова проба може бути кількісно визначена, лише якщо значення інтенсивності безпосередньо пропорційне концентраціям компонентів, що представляють інтерес, при цьому PLS-аналіз також може кількісно виразити цільову пробу в рамках спектра навіть, якщо є нелінійність [56-57]. PLS передбачає миттєвий аналіз всіх спектральних змінних; отже, можна створити кращу модель калібрування для аналізу невідомих зразків [56]. Більше того, чутливість спектроскопічних методів не еквівалентна методам ДНК.

Таким чином, спектроскопія – це просунутий спосіб автентифікації джерел желатину на основі спектральних «відбитків», але, в той же час, який вимагає високої чистоти зразка; і він, на даний час, не в змозі виявляти желатин в складних матрицях [3, 53].

Висновки

Через унікальну структуру молекул, желатин широко застосовується у різних галузях промисловості по всьому світі. Щороку загальний обсяг виробленого желатину становить 326 тис. тонн, з них 46%, отримують з свинячих шкур, 29,4% з шкіри великої рогатої худоби, 23,1% з кісток великої рогатої худоби, 1,5% з інших джерел. З огляду на те, що більшість желатинів бичачого та свинячого походження, а в ряді країн існують обмеження на застосування такої продукції, що зумовлено релігійними та культурними традиціями, актуальним є питання розроблення способів їх детектування.

Однак, на даний час немає одностайної думки про кращий спосіб вирішення цієї задачі. Аналіз методів показав, що кожний підхід має свої переваги і недоліки. Чимало з них поки відпрацьовуються лише у наукових установах, у лабораторних умовах, на унікальному обладнанні.

Найбільш відпрацьованим щодо ідентифікації желатину є метод імуноферментного аналізу. Він забезпечує як якісне, так і кількісне визначення, є відносно дешевим, простим у використанні, межа визначення 5 нг/мл. Однак, поки що не розроблено мультиплексних систем, неможливо проводити детектування у змішаних та складних матрицях, можливо отримання хибно-позитивних або негативних результатів під час дослідження зразків після високотемпературної обробки.

Такий метод аналізу білків як електрофорез у поліакриламідному гелі також не повністю задовольняє всім вимогам для детектування желатину у харчових продуктах. Хоча електрофорез є простим і надійним способом аналізу білків, при дослідженні желатину виникає чимало складнощів. Так, він потребує приготування референсного зразку, складно ідентифікує желатин з тканин близькоспоріднених тварин, досі не встановлено його межу визначення. Проте, при аналізуванні даних електрофорезу спеціальними математичними підходами, зокрема, методом головних компонент, було отримано межу детекції на рівні 5% (за масою), але все ж таки електрофорез не став кількісним способом визначення желатину.

Хроматографічні способи ідентифікації желатину є швидкими та чутливими, помірними за вартістю. Межа чутливості для розділення методом вискоефективної рідинної хроматографії становить 0,05% (за масою). Однак, даний метод потребує інтенсивної проби підготовки, не може забезпечити кількісного визначення, потребує серйозної статистичної обробки даних, визначення у складних матрицях поки що лише на стадії досліджень.

Спектроскопічні методи (ІЧ-спектроскопія з перетворенням Фур'є), які базуються на методиці відбитків референтних амінокислот, наявних у желатині та його вторинній структурі, є зручними і для аналізу їм необхідно невелику кількість зразка. Межа виявлення цим способом становить 100 нг/мл. Водночас, для аналізу даної групою

методів необхідно використовувати зразки високої чистоти, що ускладнює або навіть унеможливує роботу зі складним матриксом.

Найбільш перспективними для визначення желатину є молекулярно-генетичні підходи, на основі аналізу ДНК. Межі детекції методом ПЛР, за різними авторами, становлять 0,05-0,015% або 0,0001 пг/мл. Тобто це високочутливий спосіб, який може бути мультиплексним і застосовуватися для зразків після температурної обробки. Він є надійним, ефективним і відтворюваним. Однак, широка варіативність видового походження желатину та його модифікація хімічними способами потребує складного дизайну праймерів, їх постійного оновлення та серйозної експертизи і є досить затратним.

Література

1. Liu D. et al. Collagen and gelatin //Annual review of food science and technology. – 2015. – Т. 6. – С. 527-557.
2. Karim A. A., Bhat R. Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects //Trends in food science & technology. – 2008. – Т. 19. – №. 12. – С. 644-656.
3. Zhang G. et al. Mass spectrometric detection of marker peptides in tryptic digests of gelatin: a new method to differentiate between bovine and porcine gelatin //Food Hydrocolloids. – 2009. – Т. 23. – №. 7. – С. 2001-2007.
4. Yang H. et al. 2Step Optimization of the extraction and subsequent physical properties of channel catfish (*ictalurus punctatus*) skin gelatin //Journal of Food Science. – 2007. – Т. 72. – №. 4.
5. Schrieber R., Gareis H. Gelatine handbook: theory and industrial practice. – John Wiley & Sons, 2007.
6. Cai H. et al. Real-time PCR assays for detection and quantitation of porcine and bovine DNA in gelatin mixtures and gelatin capsules //Journal of Food Composition and Analysis. – 2012. – Т. 25. – №. 1. – С. 83-87.
7. Tukiran N. A. et al. Development of antipeptide enzymelinked immunosorbent assay for determination of gelatin in confectionery products //International journal of food science & technology. – 2016. – Т. 51. – №. 1. – С. 54-60.
8. Azilawati M. I. et al. RP-HPLC method using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate incorporated with normalization technique in principal component analysis to differentiate the bovine, porcine and fish gelatins //Food chemistry. – 2015. – Т. 172. – С. 368-376.
9. Nemati M. et al. Differentiation of bovine and porcine gelatins using principal component analysis //Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2004. – Т. 34. – №.3. – С. 485-492.
10. Hamdan M. H., Righetti P. G. Proteomics today: protein assessment and biomarkers using mass spectrometry, 2D electrophoresis, and microarray technology. – John Wiley & Sons, 2005. – Т. 18.
11. Hermanto S. et al. Differentiation of bovine and porcine gelatin based on spectroscopic and electrophoretic analysis //Journal of Food and Pharmaceutical Sciences. – 2013. – Т. 1. – №. 3.
12. Ibáñez C. et al. Novel MS-based approaches and applications in food metabolomics //TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2013. – Т. 52. – С. 100-111.
13. Gendel S. Development and Validation of a Rapid Qualitative Test Kit for Detection of Raw and Cooked Pork Meat and Gelatin Residues //Paper presented at the IAFP's 12th European Symposium on Food Safety. – 2016.
14. Lin W. F., Hwang D. F. Application of PCR-RFLP analysis on species identification of canned tuna //Food control. – 2007. – Т. 18. – №. 9. – С. 1050-1057.

15. Mutalib S. A. et al. Sensitivity of polymerase chain reaction (PCR)-southern hybridization and conventional PCR analysis for Halal authentication of gelatin capsules //LWT-Food Science and Technology. – 2015. – T. 63. – №. 1. – C. 714-719.
16. Lequin R. M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) //Clinical chemistry. – 2005. – T. 51. – №. 12. – C. 2415-2418.
17. Chen J., Kubalak S. W., Chien K. R. Ventricular muscle-restricted targeting of the RXRalpha gene reveals a non-cell-autonomous requirement in cardiac chamber morphogenesis //Development. – 1998. – T. 125. – №. 10. – C. 1943-1949.
18. Venien A., Levieux D. Differentiation of bovine from porcine gelatines using polyclonal anti-peptide antibodies in indirect and competitive indirect ELISA //Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2005. – T. 39. – №. 3. – C. 418-424.
19. Venien A., Levieux D. Differentiation of gelatins using polyclonal antibodies raised against tyrosylated bovine and porcine gelatins //Journal of Immunoassay and Immunochemistry. – 2005. – T. 26. – №. 3. – C. 215-229.
20. Nhari R. M. H. R. et al. Analytical methods for gelatin differentiation from bovine and porcine origins and food products //Journal of food science. – 2012. – T. 77. – №. 1.
21. Doi H. et al. A reliable enzyme linked immunosorbent assay for the determination of bovine and porcine gelatin in processed foods //Journal of agricultural and food chemistry. – 2009. – T. 57. – №. 5. – C. 1721-1726.
22. Asensio L. et al. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) //Food Control. – 2008. – T. 19. – №. 1. – C. 1-8.
23. Lin C. C., Chiou T. K., Sung W. C. Characteristics of gelatin from giant grouper (Epinephelus Lanceolatus) skin //International Journal of Food Properties. – 2015. – T. 18. – №.11. – C. 2339-2348.
24. Wolf C., Lüthy J. Quantitative competitive (QC) PCR for quantification of porcine DNA //Meat science. – 2001. – T. 57. – №. 2. – C. 161-168.
25. Aina M. A. et al. Identification polypeptide biomarkers of porcine skin gelatin by two-dimensional electrophoresis //International Food Research Journal. – 2013. – T. 20. – №. 3. – C. 1395-1399.
26. Zhang Z., Li G., Shi B. I. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes //JOURNAL-SOCIETY OF LEATHER TECHNOLOGISTS AND CHEMISTS. – 2006. – T. 90. – №. 1. – C. 23.
27. Malik A. et al. Simultaneous identification and verification of gelatin type in capsule shells by electrophoresis and polymerase chain reaction //Journal of Pharmaceutical Investigation. – 2016. – T. 46. – №. 5. – C. 475-485.
28. Azira T. N. et al. Use of principal component analysis for differentiation of gelatine sources based on polypeptide molecular weights //Food chemistry. – 2014. – T. 151. – C. 286-292.
29. Cserháti T. et al. Chromatography in authenticity and traceability tests of vegetable oils and dairy products: a review //Biomedical Chromatography. – 2005. – T. 19. – №.3. – C. 183-190.
30. Kupiec T. Quality-control analytical methods: High-performance liquid chromatography //International journal of pharmaceutical compounding. – 2004. – T. 8. – C. 223-227.
31. Ali M. E. et al. Analysis of pork adulteration in commercial meatballs targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome b gene by TaqMan probe real-time polymerase chain reaction //Meat science. – 2012. – T. 91. – №. 4. – C. 454-459.
32. Di Stefano V. et al. Applications of liquid chromatography–mass spectrometry for food analysis //Journal of Chromatography A. – 2012. – T. 1259. – C.74-85.
33. Sander L. C., Wise S. A. Effect of phase length on column selectivity for the separation of polycyclic aromatic hydrocarbons by reversed-phase liquid chromatography //Analytical chemistry. – 1987. – T. 59. – №. 18. – C. 2309-2313.

34. Yilmaz M. T. et al. A novel method to differentiate bovine and porcine gelatins in food products: NanoUPLC-ESI-Q-TOF-MS E based data independent acquisition technique to detect marker peptides in gelatin //Food chemistry. – 2013. – T. 141. – №. 3. – C. 2450-2458.
35. Ocaña M. F. et al. BSE Control: Detection of gelatine-derived peptides in animal feed by mass spectrometry //Analyst. – 2004. – T. 129. – №. 2. – C. 111-115.
36. Zhang G. F. et al. Identification of marker peptides in digested gelatins by high performance liquid chromatography/mass spectrometry //Chinese Journal of Analytical Chemistry. – 2008. – T. 36. – №. 11. – C. 1499-1504.
37. Widyaninggar A. et al. Differentiation between porcine and bovine gelatin in capsule shells based on amino acid profiles and principal component analysis //INDONESIAN JOURNAL OF PHARMACY. – 2012. – C. 104-109.
38. Raraswati M. A. et al. Differentiation of bovine and porcine gelatins in soft candy based on amino acid profiles and chemometrics //Journal of Food and Pharmaceutical Sciences. – 2013. – T. 2. – №. 1.
39. Rezazadeh M. et al. Pulsed electromembrane extraction for analysis of derivatized amino acids: A powerful technique for determination of animal source of gelatin samples //Talanta. – 2015. – T. 136. – C. 190-197.
40. Tasara T., Schumacher S., Stephan R. Conventional and real-time PCR-based approaches for molecular detection and quantitation of bovine species material in edible gelatin //Journal of food protection. – 2005. – T. 68. – №. 11. – C. 2420-2426.
41. Sun J. et al. Pathway analysis and transcriptomics improve protein identification by shotgun proteomics from samples comprising small number of cells-a benchmarking study //BMC genomics. – 2014. – T. 15. – №. 9. – C. S1.
42. Mohamad, N. A., Mustafa, S., Sheikha, E., Farag, A., Mokhtar, K., Fadhilah, N., Ali, M. E. (2015). Modification of gelatin–DNA interaction for optimised DNA extraction from gelatin and gelatin capsule. J Sci Food Agric.
43. Shabani H. et al. Halal authenticity of gelatin using species-specific PCR //Food chemistry. – 2015. – T. 184. – C. 203-206.
44. Lee J. H. et al. Specific PCR assays to determine bovine, porcine, fish and plant origin of gelatin capsules of dietary supplements //Food chemistry. – 2016. – T. 211. – C. 253-259.
45. Ali M. E., Razzak M. A., Hamid S. B. A. Multiplex PCR in species authentication: probability and prospects—a review //Food Analytical Methods. – 2014. – T. 7. – №. 10. – C. 1933-1949.
46. Rojas M. et al. Application of a real-time PCR assay for the detection of ostrich (*Struthio camelus*) mislabelling in meat products from the retail market //Food Control. – 2011. – T. 22. – №. 3. – C. 523-531.
47. Ali M. E. et al. Nanoparticle sensor for label free detection of swine DNA in mixed biological samples //Nanotechnology. – 2011. – T. 22. – №. 19. – C. 195503.
48. Demirhan Y., Ulca P., Senyuva H. Z. Detection of porcine DNA in gelatine and gelatine-containing processed food products–Halal/Kosher authentication //Meat science. – 2012. – T. 90. – №. 3. – C. 686-689.
49. Eaqub Md. et al. Nanostructured Materials: Bioengineering Platforms for Sensing Nucleic Acids //Reference Module in Materials Science and Materials Engineering. – 2016. – C. 1-26.
50. Schmid F. X. Biological Macromolecules: UVvisible Spectrophotometry //eLS. – 2001.
51. Aitken A., Learmonth M. P. Protein determination by UV absorption //The protein protocols handbook. – 2009. – C. 3-6.
52. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 2007. – T. 1767. – №. 9. – C. 1073-1101.

53. Hashim D. M. et al. Potential use of Fourier transform infrared spectroscopy for differentiation of bovine and porcine gelatins //Food chemistry. – 2010. – T. 118. – №. 3. – C. 856-860.
54. Cebi N. et al. An evaluation of Fourier transforms infrared spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine, porcine and fish gelatins //Food chemistry. – 2016. – T. 190. – C. 1109-1115.
55. Rohman A., Che Man Y. B. Analysis of pig derivatives for halal authentication studies //Food reviews international. – 2012. – T. 28. – №. 1. – C. 97-112.
56. Wise B. M. et al. PLS_Toolbox Version 4.0 for use with MATLAB™ //Eigenvector Research, Inc. – 2006. – T. 3905.
57. Kumar, K., & Mishra, A. K. (2015). Application of Partial Least Square (PLS) Analysis on Fluorescence Data of 8-Anilinonaphthalene-1-Sulfonic Acid, a Polarity Dye, for Monitoring Water Adulteration in Ethanol Fuel. J fluoresc, 25(4): 1055-1061.