

# ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ РЫБЫ И РЫБОПРОДУКЦИИ

Канд. биол. наук Г.В. Репина – Гипрорыбфлот

**Идентификация видов рыбы и рыбной продукции приобретает все большее значение в связи с увеличением объема международной торговли и введением во многих странах мира правил маркировки (Rehbein, 1990; Pineiro, Barros-Velazquez, Sotelo et al., 1998). Для идентификации свежей и необработанной рыбы необходимы морфологические и анатомические характеристики. В обработанном виде рыба и рыбная продукция утрачивают характерные морфологические черты, необходимые для идентификации вида. Однако в соответствии с законодательством продукт должен маркироваться своим официальным названием. Эта мера своевременна не только в целях ограждения потребителя от фальсификации, но и для защиты редких видов, контроля рыбных квот и мониторинга моратория (Bossier, 1999). Во многих странах мира распространена стандартная идентификация пищевой продукции (в частности, рыбы, и рыбной продукции), основанная на применении аналитических методов, широко используемых в клинической биохимии (Gershman, 1985; An, Wei et al., 1989; Колеснов, 1996, 1997; LeBlanc et al., 1994). В настоящее время в пищевой промышленности для идентификации аналогов, полуфабрикатов, готовой продукции используются методы хроматографии, электрофореза в различных средах, ферментный и иммуноферментный анализы. Идентификация может быть проведена на основе анализа белков или ДНК.**

## Хроматографические методы

Ионообменная хроматография может быть использована для определения содержания соевого белка в сырых и готовых мясных продуктах (после ферментативного гидролиза и ультрафильтрации гидролизатов). Метод позволяет определить содержание соевого белка при наличии его в продукте от 30 до 70 %, а содержание мясного белка — при наличии говядины от 2 до 100 % (Agater, Briant et al., 1986). Для определения фальсификации оливкового масла был применен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). На основании определения величин соотношения олеиновой, лауриновой, пальмитиновой и стеариновой кислот для исследуемого образца и стандартных образцов оливкового и косточкового масел показана возможность определения косточкового масла в оливковом при его содержании не менее 25 % (Casadei, 1987). Жидкостная хроматография была также применена для идентификации видов рыб. Были исследованы такие виды, как канальный сомик, треска, удильщик, форель, морской окунь, лосось, акула (Ashoor et al., 1985). О виде идентифицируемой рыбы судили по разнице между временем удерживания основной белковой фракции рыбы и временем удерживания бычьего сывороточного альбумина, применяемого в качестве внутреннего стандарта. Отмечалось успешное использование этой методики для идентификации видов рыбы в рыбных консервах и фаршевых аналогах, в том числе аналогах крабовых палочек. Имеются также данные об иден-

тификации рыбных продуктов с помощью ВЭЖХ саркоплазматических белков (Rehbein et al., 1990). Однако этот подход не получил дальнейшего развития на практике, что, вероятно, связано с трудностями подготовки образца, проведения анализа, стандартизации метода, необходимостью приобретения дорогостоящего оборудования и высокой квалификации оператора.

## Методы ферментного и иммуноферментного анализа

В последние годы возрос интерес к методам определения специфических соединений в продуктах с помощью иммунного анализа. Они специфичны, чувствительны, скоротечны и хорошо подходят для анализа широкого набора экстрактов. Иммунный анализ узаконен для клинических образцов, широко используется в судебно-медицинской практике, а в последние годы стал применяться для пищевых продуктов (Morris, Clifford, 1987; Hitchcock, Crimes, 1983; Morgan, 1985; Hitchcock, 1987). В качестве метки при анализе продуктов питания обычно отдают предпочтение ферментам. Иммуноферментный анализ (ELISA) экономичен по затратам времени, сил, оборудования и материалов. Диапазон соединений, к которым применяется иммунный анализ, довольно широк, он включает все молекулы, обладающие антигенностью. В области пищевых продуктов это макромолекулы (белковые составляющие мяса, сои, пшеницы, обычно присутствующие на уровне 0,1–10 %) и гаптены, попадающие в пищевые продукты извне: микотоксины, анаболики, антибиотики. Ферментный анализ также нашел широкое применение в пищевой промышленности. Для видовой идентификации рыбы и рыбной продукции ферментный и иммуноферментный методы анализа не нашли применения в связи с малой изученностью видовой специфичности отдельных белков рыбы, а следовательно, с отсутствием видоспецифических антител, выпускаемых на коммерческой основе.

## Электрофоретические методы

Широкое распространение для видовой идентификации рыбы и морепродуктов приобрел метод электрофореза в различных средах. Ассоциацией аккредитованных химиков-аналитиков (АОАС) введен ряд международных стандартов, основанных на применении электрофоретических методик: зонального электрофореза в крахмальном геле, электрофореза в полосках ацетатцеллюлозы, диск-электрофореза в полиакриламидном геле, изоэлектрофокусирования в тонком слое полиакриламидного геля в градиенте pH. Наиболее точной, надежной, быстровоспроизводимой методикой является изоэлектрофокусирование водорастворимых белков светлой скелетной мышечной ткани рыб в тонком слое полиакриламидного геля. В обзорной статье H. Rehbein (1990) обсуждаются возможности применения изоэлектрофокусирования и других электрофоретических методов анализа сырой, сушеной, соленой, копченой, консервированной рыбы и пресервов. На картину расположения белковых полос при изоэлектрофокусировании могут влиять тип мяса рыбы (светлое или темное), ее свежесть, условия морозильного хранения. Для получения однозначных результатов должны использоваться образцы сравнения. Детальное описание методов, используемых для анализа сырья, готовой или консервированной продукции, опубликовал I. Mackie (1980). Изучение влияния на картину расположе-

ния белковых полос ионной силы и pH экстрагирующего буфера, метода окрашивания, градиента pH, локализации образца в филе, времени вылова провели P.M. Toom, C.F. Ward и J.R. Weber (1982).

### Идентификация сырой рыбной продукции

Эта категория продуктов включает сырое рыбное филе и множество типов глубокомороженной продукции: порционные куски филе, рыбные палочки и котлеты. Их видовая идентификация обычно осуществляется изoeлектрофокусированием саркоплазматических белков. Преимущества этого метода перед другими электрофоретическими методами состоят в его лучшей разрешающей способности и воспроизводимости. Для окрашивания белковых полос используются кумасси бриллиантовый голубой, иногда серебро. Образцы для анализа готовят из экстрактов, отжатого сока или кусочков ткани. В последние годы несколько сотен видов океанических рыб были исследованы методом изoeлектрофокусирования. Французский научно-исследовательский институт моря IFREMER издал атлас, который не только содержит рисунки и биологическое описание более 80 видов рыб, но и дает картину распределения белковых полос при изoeлектрофокусировании (Durand, Landrein, Quero, 1985). В большинстве случаев были получены характерные картины распределения полос, однако некоторые близкородственные виды могут давать идентичную или подобную картину распределения полос. В некоторых случаях это зависит от того, идентифицируются отдельные виды или подвиды. Подобные результаты были получены для нескольких тихоокеанских видов *Sebastes*. Очень редко образцы одного и того же вида различались вследствие белкового полиморфизма. Дивергентные картины расположения белковых полос описаны для нескольких видов рыб и моллюсков. На достоверность и воспроизводимость результатов изoeлектрофокусирования влияет множество факторов: цвет мяса рыбы, условия хранения во льду, глубокое замораживание. По цвету филе рыб подразделяют на два типа: имеющие светлое филе (треска, камбала) и красное филе (сардины, макрель, тунец). Ткани рыб второго типа содержат больше миоглобина и большую долю красных мышц. Белые и красные мышцы отличаются по физиологическим функциям и метаболизму. Белые характеризуются высокой активностью гликолитических ферментов и малым содержанием хромопротеинов. Следовательно, при изoeлектрофокусировании белков разного типа мышц картины распределения белковых полос будут различными. Для светлых мышц характерны явно выраженные полосы белков в анодной части гелей. Оба типа мышц дают видоспецифические изoeлектрофореграммы. Однако, как правило, видовая идентификация более надежна при анализе белков светлых мышц. При подготовке пробы к анализу мышечная ткань должна быть свободна от крови, красных мышц и других тканей.

### Охлаждение рыбы во льду

При хранении охлажденной рыбы во льду протеолиз мышечной ткани полностью не заторможен, следовательно, меняется состав саркоплазматических белков. При растапливании льда белки могут быть частично вымыты из тканей. Степень этих процессов зависит от вида рыбы, биологических условий (получение рыбой стресса во время лова). Были получены результаты, свидетельствующие о значительных изменениях в образцах некоторых видов рыб. Однако другие авторы показали, что образцы белковых полос трески остаются стабильными в течение двух недель.

### Влияние замораживания

Саркоплазматические белки мышечной ткани рыб более устойчивы к денатурации при морозильном хранении, чем миоглобулярные белки. Образцы белков из филе трески, которое хранили при

температурах  $-13^{\circ}\text{C}$ ,  $-25^{\circ}\text{C}$ ,  $-60^{\circ}\text{C}$  несколько месяцев, анализировали изoeлектрофокусированием в тонком слое полиакриламидного геля. Картина расположения белковых полос была одинаковой. При анализе филе трески, хранившегося при  $-10^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мес, не было выявлено отдельных выраженных полос; если фарш хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ , лишь несколько полос были ослаблены. При морозильном хранении фарша трески и других галоидных из оксида триметиламина может продуцироваться формальдегид. При накоплении он взаимодействует с саркоплазматическими белками. Модифицированные белки теряют способность к экстракции и при изoeлектрофокусировании выявляется только несколько полос белков в кислой части геля. При не слишком продолжительном хранении (при температуре не выше  $-18^{\circ}\text{C}$ ) затруднений с проведением анализа большинства продуктов не возникает.

### Идентификация продукции из смесей различных видов рыб

Измельченное рыбное филе (фарш) может содержать красные мышцы и небольшое количество крови и почек. Для производства котлет или сурими смешивают фарши нескольких видов рыб. Если смеси приготовлены из фаршей, дающих характерные полосы при изoeлектрофокусировании, идентификация видов возможна. При анализе смесей из фарша трески и сайды порции фарша могут быть определены количественно. Однако пределы варьирования концентрации саркоплазматических белков в зависимости от биологических (нерест) и технологических факторов (промывка) пока не определены.

### Идентификация кулинарных рыбных изделий

В процессе приготовления рыба может быть подвергнута сушке, копчению, жарке, маринованию, стерилизации. Мышечные белки при этом могут быть денатурированы. Имеется два пути анализа таких продуктов: а) денатурированные белки растворяют с помощью мочевины и/или додецилсульфата натрия в присутствии тиоловых соединений типа меркаптоэтанола и затем анализируют; б) используются только некоторые термостабильные саркоплазматические белки (парвальбумины) или миофибриллярные, устойчивые к денатурации (легкие цепи миозина и тропомиозина). Перечень готовой продукции и методы, примененные к анализу этой продукции, приведены Н. Rehbein (1990). Мешающие соединения (липиды, соли) удаляют с помощью ацетона, метанола, дихлорэтана. Электрофорез в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия (SDS-PAGE), редко применяется при анализе сырых продуктов, но для идентификации готовой продукции лучший метод — анализ, основанный на электрофореze структурных белков.

### Идентификация стерилизованной рыбопродукции

Единого метода, применимого ко всей консервированной продукции, не существует. В настоящее время разработаны четыре методики:

1) белки консервированной рыбы расщепляют раствором цианогенбромида в 80%-ной муравьиной кислоте. Полученные пепти-



ды растворяют в мочеине или в воде и разделяют с помощью диск-электрофореза или изоэлектрофокусирования. Отмечено получение видоспецифических образцов гелей;

2) филе рыбы обрабатывают уксусом, затем осушенные белки экстрагируют раствором додецилсульфата натрия в присутствии 2-меркаптоэтанола и экстракт подвергают электрофорезу (SDS-PAGE). Различные виды рыб могут давать очень похожие образцы расположения белковых полос;

3) легкие цепи миозина, устойчивые к термической денатурации, некоторых видов рыб отличаются по молекулярной массе и могут быть разделены в SDS-PAGE. При этом образец должен быть свободен от фрагментов белков, образовавшихся при тепловой денатурации. Метод дает видоспецифические образцы гелей для некоторых видов консервированной рыбы, но широко не используется. Стадия очистки длительная, а различия между образцами гелей многих видов рыбы незначительны;

4) низкомолекулярные саркоплазматические белки (парвальбумины) термостабильны, в светлых мышцах многих видов рыб отмечена их высокая концентрация. Обычно каждый вид рыбы содержит несколько изоформ парвальбуминов, отличающихся по заряду молекул. Парвальбумины должны быть экстрагированы из мяса консервированной рыбы и разделены методом изоэлектрофокусирования с последующим окрашиванием серебром.

Видоспецифические образцы получены для консервированной сельди и шпротов. Но идентификация затруднена, если в качестве образца используется экстракт сырой рыбы.

#### **Идентификация панцирных и моллюсков**

Панцирные и моллюски идентифицируются теми же методами, что и виды рыб. Мышцы рыб содержат креатинкиназу, а беспозвоночных — аргининкиназу. Парвальбумины у беспозвоночных отсутствуют. Мясо омара, венерки и других беспозвоночных содержит кальциевые соединения саркоплазматических белков. Для них характерны низкие величины pH, устойчивость к тепловой денатурации в присутствии кальция. Метод SDS-PAGE дает возможность дифференцировать мясо высокоценной улитки *Helix* и улитки *Achatina*, имеющей низкую пищевую и товарную ценность (Bracchi, 1988). Метод используется как для вареного, так и сырого мяса улиток.

#### **Образцы сравнения (референс-образцы)**

Для более надежной идентификации видов рекомендуется проводить анализ образцов одновременно с аутентичными образцами (референс-образцами). Полезность атласа с фотографиями изоэлектрофореграмм для разных видов рыб ограничивается необходимостью в точно такой же процедуре анализа. На картину распределения полос могут влиять размеры геля, химический состав амфолинов, природа гелеобразующей среды (агароза или полиакриламид), способы нанесения образца и окрашивания. Референс-образец готовят из целой рыбы, идентифицированной по морфологическим и анатомическим признакам. Идентифицированный материал должен иметь маркировку с указанием латинского названия вида. Сертифицированный материал разрезают на куски или куски филе, упаковывают в полиэтиленовые пакеты, чтобы избежать обезвоживания, и хранят при температуре не менее  $-18^{\circ}\text{C}$  до приготовления экстракта. В каждом пакете — филе трех-четырех рыб данного вида. Во время перевозки оттаивание референс-материала недопустимо. При соблюдении указанных условий референс-образец может храниться в упакованном виде без значительных потерь белковых полос на электрофореграмме в течение года. Экстракты мяса рыбы хранятся в холодильнике менее двух дней. G. Neti, H. Rehbein (1988) использовали в качестве референс-материала сухой порошок мышечной ткани рыб, который затем экстрагировали буфером низкой ион-

ной силы. Электрофоретические образцы экстрактов порошков соответствовали образцам кислых белков экстрактов сырых мышц и могли быть использованы как референс-материал. Сухие порошки сохраняли экстрагируемость при хранении при комнатной температуре в течение нескольких месяцев.

Видовая идентификация, основанная на анализе белка, — наиболее пригодный и широко используемый метод. Видоспецифические образцы обычно получают с помощью изоэлектрофокусирования. В большинстве случаев изоэлектрофокусирования достаточно для получения однозначного ответа. Однако при исследовании близкородственных видов необходим дополнительный анализ: или в более узком диапазоне pH, или с применением методики двухмерного электрофореза.

Межлабораторные исследования показали, что картина распределения белковых полос на изоэлектрофореграммах аутентичных видов может быть использована для идентификации неизвестных или сомнительных образцов (Lundstrom, 1980). Семи участникам теста было разослано восемь неизвестных образцов в двух экземплярах для идентификации по фотографии полиакриламидного геля, содержащего стандартные профили белков 14 видов рыб. Двое участников правильно идентифицировали 16 образцов, двое других представили 15 правильных ответов. Трое участников правильно определили 14 образцов. Общее среднее число правильных определений — 93 %.

В последние годы фирмой Amersham Pharmacia Biotech разработана автоматизированная система «PhastSystem», позволяющая выполнять различные варианты электрофоретических методик при автоматическом внесении образцов, в программируемых условиях проведения анализа, фиксации, окрашивания и отмывки гелей и компьютерной обработкой электрофоретической информации. Для оценки технических характеристик системы и воспроизводимости результатов были проведены межлабораторные исследования. 116 комплектов-тестов были разосланы владельцам системы в разных странах. Все гели, присланные из 87 лабораторий, были сканированы и оценены. Для измерения точности и воспроизводимости системы была определена молекулярная масса трех случайно выбранных полос белка (те же самые полосы для каждого геля) с помощью калибровочной кривой, построенной на основе набора белков-маркеров с известной молекулярной массой, которые были внесены в каждый гель. Средние величины молекулярных масс трех белковых полос были 87,0; 45,6 и 16,8 кД со стандартными отклонениями соответственно 3,7; 1,4 и 0,5. Коэффициент вариативности составлял 3–4 % для диапазона молекулярных масс 17–87 кД. Коэффициент вариативности вполне приемлем для биохимических анализов.

Альтернативой методам идентификации на основе анализа белка является идентификация на основе анализа ДНК. Результативность этих методов незаменима при анализе продукции, прошедшей тепловую обработку, консервирование или копчение, в том числе икорной. В критической обзорной статье P. Bossier (1999) проведен сравнительный анализ методик, основанных на полимеразной цепной реакции (PCR), таких, как определение последовательности нуклеотидов, информативной для судебной медицины; выявление полиморфизма фрагментов ограниченной длины; конформационного полиморфизма одноцепочной ДНК; полиморфизма ДНК случайно амплифицированной длинными или короткими праймерами; полиморфизма длины амплифицированных фрагментов. Аутентификация морепродуктов по ДНК может быть проведена с помощью широкого набора методик. В настоящее время для многих видов рыб, а также икры осетровых получены идентификационные образцы (DeSalle, Birstein, 1996). Однако для одной лаборатории нереально охватить все коммерчески важные виды и подвиды рыб, поэтому становится актуальным создание международного банка данных. Для этой цели наиболее пригодны методики, основанные на анализе ДНК.