

Лазарева Екатерина Германовна, м.н.с.,

Гильманов Хамид Халимович, н.с.

ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, г. Москва.

Михайлова Ирина Юрьевна, н.с.

ВНИИПБиВП – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова»
РАН, г. Москва

ПЕРСПЕКТИВЫ ДНК-АУТЕНТИФИКАЦИИ ПИВОВАРЕННОЙ ПРОДУКЦИИ

*Аннотация. Идентификация пивоваренной продукции – достаточно сложная задача, базирующаяся на знаниях поликомпонентного сырьевого состава с учетом концентрационных свойств системы и трансформационных изменений, связанных с технологическим воздействием. Тенденции последних лет к расширению области сырьевых компонентов и ускорению технологических процессов, априори предполагают необходимость развития методологической базы современными аналитическими методами, в том числе молекулярно-генетическими. ДНК-аутентификация марок пива – технологический процесс проверки их подлинности геноидентификацией основного растительного компонента – ячменного солода пивоваренных сортов *Hordeum vulgare*, или его заменителей, а также ключевых ингредиентов – хмеля и дрожжей, посредством молекулярно-генетического анализа остаточных количеств нуклеиновых кислот, экстрагируемых из клеточного дебриса реализуемой готовой продукции. Анализ научно-методических подходов к экстракции остаточных количеств нуклеиновых кислот пивного сырья и, собственно, ДНК-аутентификации пива, являющийся основной целью настоящей работы, указывает на применимость ДНК-технологий для мониторинга контрафактной и фальсифицированной пивоваренной продукции.*

Ключевые слова: солод, хмель, пиво, нуклеиновые кислоты, ДНК-аутентификация.

Lazareva Ekaterina Germanovna, Junior Researcher,

Gilmanov Hamid Halimovich, Researcher

V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of
Sciences, Moscow, Russia

Mikhaylova Irina Yuryevna, Researcher

All-Russian Scientific Research Institute of Brewing, Non-Alcoholic and Wine
Industry – branch of V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

PERSPECTIVES OF BREWING PRODUCTS DNA AUTHENTICATION

*Annotation. Brewing products identification is rather complicated task, based on knowledges of multicomponent raw material composition, taking into account system concentration properties and transformational changes, associated with technological impact. Trends of recent years towards expansion of raw materials field and technological processes acceleration, a priori suggest the need to develop modern analytical methods methodological basis, including molecular-genetic ones. Beer brands DNA authentication is technological process for verifying their authenticity by genoidentification of the main plant component - barley malt from brewing varieties of *Hordeum vulgare*, or its substitutes, as well as key ingredients - hop and yeast, by means of molecular genetic analysis of nucleic acids residual amounts, extractable from cellular debris of sold finished products. Scientific and methodological approaches analysis to extraction of nucleic acids residual amounts of beer raw materials and, in fact, beer DNA authentication, which is the main purpose of this work, indicates DNA technologies applicability for monitoring counterfeit and falsified brewing products.*

Key words: malt, hops, beer, nucleic acids, DNA authentication.

Метод выделения ДНК из пива [1] фактически основан на модификации известного способа экстракции нуклеиновых кислот из вина [2, 3]. Метод включает в себя ступенчатый ферментативный гидролиз полисахаридов и полипептидов растворенного лиофилизата, множественные процедуры осаждения и ресуспендирования нуклеопротеидного комплекса. Предусмотрен этап удаления РНК с последующей экстракцией ДНК органическими растворителями, а также дополнительная очистка ДНК адсорбцией на магнитных частицах.

Молекулярные маркеры, используемые при генотипировании и паспортизации сельскохозяйственных растений [4-6], могут быть применены и при оценке подлинности и места происхождения пищевых систем.

Ряд генетических мишеней, используемых в качестве молекулярных маркеров для геноидентификации сортов пивоваренного ячменя, может быть использован и в целях ДНК-аутентификации коммерческого пива [1]. В частности, из не имеющих корреляционную связь с показателями качества пива:

- полигалактуроназа – фермент, осуществляющий гидролитическое расщепление α -1,4-гликозидных связей в пектинах. В качестве ДНК-мишени выбирается локус его гена (*HvPG1*);

- гордеины – полиморфные белки зерна ячменя, кодируемые 7 локусами *HrdA-G*, локализованными в коротком плече 5-ой хромосомы *Hordeum vulgare*. Данный блок мишеней является приоритетным для молекулярно-генетического анализа;

- амилоза в сорте ваху-ячменя – один из основных полисахаридов, составляющий крахмал. Праймеры, подобранные для амплификации *Ваху*-локуса обладают статусом положительного контроля ввиду генерации специфичного ПЦР-продукта во всех тестированных образцах ячменя и пива;

- α -амилаза – фермент, активирующийся в процессе соложения. Праймеры, разработанные на основании нуклеотидной последовательности локуса гена, кодирующего α -амилазу, инициируют амплификацию ПЦР-продукта у

большинства исследованных сортов ячменя и образцов пива;

- (1-3, 1-4) β -D-глюкан – полисахарид, определяющий твердость зерна ячменя. Процедура амплификация локуса гена *HvCslF6* с подобранной парой праймеров приводит к наработке специфичного ПЦР-продукта с как у ряда американских и австралийских, так и японских сортов пивоваренного ячменя.

Генетическими мишенями [1], имеющими корреляционную связь с показателями качества пива являются:

- протеины Z ячменя – основные белки пива, проявляющий корреляционную связь с показателями качества пива, в частности со стабильностью пены. Причем, протеины Z4 и Z7 могут быть использованы в качестве позитивных и негативных маркеров стабильности пены;

- липоксигеназа – железосодержащие ферменты, катализирующие реакцию диоксигенации к полиненасыщенным жирным кислотам. Дефицитные сорта ячменя с пониженной или утраченной активностью генов *LOX* оказывают положительное влияние на такие показатели качества, как вкус пива и стабильность пены. Соответствующий набор праймеров, приводит к амплификации специфичного ПЦР-продукта у определенных сортов ячменя и образцов пива.

Белковые ингибиторы протеолитических ферментов играют важную роль в формировании гомеостатических реакций у растений. Подобранные праймеры к локусу гена ингибитора трипсина (*Itr1*) приводят к амплификации специфичного ПЦР-продукта у ряда сортов ячменя и образцов пива.

Микросателлиты – широко распространенные молекулярные маркеры, пригодные и для идентификации *Hordeum vulgare* [7] Процедура геноидентификации осуществляется с помощью ПЦР с последующей интерпретацией полученных результатов методом горизонтального или вертикального гель-электрофореза, а также фрагментарным анализом ДНК капиллярным гель-электрофорезом.

Также высокой идентификационной способностью обладают SNP-маркеры, используемые для геноидентификации сортов пивоваренного ячменя [8]. Сама процедура геноидентификации осуществляется разновидностью аллель-специфичной ПЦР с последующей интерпретацией полученных результатов методом горизонтального гель-электрофореза или методом анализа кривых плавления с высокой разрешающей способностью.

Известно влияние хмеля и дрожжей на показатели качества пива. Так, хмель придает пиву горечь, аромат и стабильность пены, при этом дополнительно обладает дезинфицирующим эффектом [9].

Наборы праймеров, инициирующие амплификацию специфичных ПЦР-продуктов соответствующих локусов генов хмеля и дрожжей, позволяют идентифицировать или дифференцировать образцы коммерческого пива [1].

Метагеномный анализ позволяет определить видовое разнообразие дрожжей в исследуемых образцах пива без необходимости выделения и культивирования микроорганизмов [10], и является одним из перспективных подходов к ДНК-аутентификации пива.

Выводы. Анализ научно-методических подходов к экстракции остаточных количеств нуклеиновых кислот пивного сырья и, собственно, ДНК-аутентификации пива указывает на применимость молекулярно-генетического анализа в вопросах мониторинга контрафактной и фальсифицированной пивоваренной продукции. ДНК-технологии способствуют определению подлинности и места происхождения продукции пивоваренной промышленности. Системы молекулярного маркирования, пригодные для идентификации основного растительного компонента пива или его заменителей, а также ключевых ингредиентов, способны обеспечить прослеживаемость всего жизненного цикла продукта [11, 12].

Список литературы

1. Nakamura S., Tsushima R., Ohtsubo K. A novel method for the preparation of template DNA for PCR from beer to detect materials and to develop DNA markers to evaluate the quality of beer. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013, vol. 77, no. 4, pp. 820-831. DOI: 10.1271/bbb.120969.
2. Nakamura S., Haraguchi K., Mitani N., Ohtsubo K. Novel preparation method of template DNAs from wine for PCR to differentiate grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar. *J. Agric. Food Chem.* 2007, vol. 55, no. 25, pp. 10388-10395. DOI: 10.1021/jf072407u.
3. Oganesyants L.A., Vafin R.R., Galstyan A.G., Semipyatniy V.K., Khurshudyan S.A., Ryabova A.E. Prospects for DNA authentication in wine production monitoring. *Foods and Raw Materials.* 2018. Vol. 6. No. 2. P. 438–448. DOI: 10.21603/2308-4057-2018-2-438-448.
4. Vafin R.R., Rzhanova I.V., Askhadullin D.F. Identification of *Triticum aestivum* L. genotype by allelic versions of waxy-genes and HMW glutenin subunits // *Ecology, Environment and Conservation.* 2015. Vol. 21, No. Suppl. Nov. P. 137-143.
5. Абдулина И.Р., Вафин Р.Р., Зайнуллин Л.И., Алимова Ф.К. Выявление аллельного варианта Wx-A1G Waxy-гена у генотипов яровой пшеницы отечественной селекции // *Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки.* 2012. Т. 154. № 4. С. 158-163.
6. Абдулина И.Р., Вафин Р.Р., Ржанова И.В., Гараева А.Л., Асхадуллин Д.Ф., Асхадуллин Д.Ф., Василова Н.З., Зайнуллин Л.И., Алимова Ф.К. Молекулярная идентификация генотипов яровой пшеницы по аллельным вариантам Waxy-генов. *Фундаментальные исследования.* 2013, № 1-1, С. 13-17.
7. Tomka M., Urminská D., Chňapek M., Gálová Z. Potential of selected SSR markers for identification of malting barley. *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.* 2017, vol. 6, no. 6, pp. 1276-1279. DOI: 10.15414/jmbfs.2017.6.6.1276-1279.
8. Chiapparino E., Lee D., Donini P. Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR. *Genome.* 2004, vol. 47, no. 2, pp. 414-420. DOI: 10.1139/g03-130.
9. Kovacevic M., Kac M. Solid-phase microextraction of hop volatiles – potential use for determination and verification of hop varieties. *J. Chromatogr. A.* 2001, vol. 918, no. 1, pp. 159-167.
10. Sobel J, Henry L, Rotman N, Rando G. BeerDeCoded: the open beer metagenome project. *F1000Res.* 2017;6:1676. Published 2017 Sep 11.

doi:10.12688/f1000research.12564.2.

11. Хуршудян С.А., Галстян А.Г. Мониторинг качества винодельческой продукции. Контроль качества продукции. 2017, № 8, С. 12-13.

12. Хуршудян С.А., Галстян А.Г. Качество пищевых продуктов. Термины, определения и противоречия. Контроль качества продукции. 2018, № 1, С. 48-49.