

ВЛИЯНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА СТРУКТУРУ ДНК В ПРОДУКТАХ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Барышева Е.С., Мликов Е.М., Барышева Д.А., Обьедкова Ю.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Оренбургский государственный университет», Оренбург, Россия, (460018, г. Оренбург, пр. Победы, 13)

В статье представлены результаты исследования влияния пищевых добавок на структуру ДНК в продуктах питания растительного происхождения на примере кетчупов, томатной пасты и консервированных томатов. Работа выполнена с использованием методов электрофореза ДНК в агарозном геле и газовой хромато-масс-спектрометрии. Целью исследования явилось изучение влияния технологического процесса и в первую очередь используемых в нём химических веществ на геномную ДНК в вышеупомянутых продуктах питания. В образце двух групп кетчупов и солёных томатах ДНК не была выявлена. ДНК группы контроля и томатной пасты имела лишь незначительные повреждения. В трёх образцах кетчупов выявлена бензойная кислота в количествах, не превышающих ПДК. В одном из образцов кетчупов обнаружен капсаицин.

Ключевые слова: мутаген, геномная ДНК, повреждения ДНК, электрофорез в агарозном геле, газовая хроматография, пищевые добавки, томаты.

ASSESSING THE IMPACT OF THE PROCESS AND OBTAINED IN THE COURSE OF IT THE FOOD OF PLANT ORIGIN BY GENOMIC DNA

Barysheva E.S., Mlikov E.M., Barysheva D.A., Obedkova Y.A.

Orenburg state university, Orenburg, Russia, (460018, Orenburg, street Pobedi, 13), e-mail: baryshevae@mail.ru

The article presents the results of investigation of the influence of food additives on the structure of DNA in food products of plant origin for example ketchup, tomato paste and canned tomatoes. After performed using methods DNA electrophoresis on agarose gel and gas chromatography-mass spectrometry. The aim of the study was to investigate the influence of the process, first and foremost used therein chemicals to genomic DNA in the above- mentioned foods. In a sample of two groups of tomato ketchup and salt DNA was not detected. DNA of the control group and the tomato paste had only minor damage. In the three samples revealed ketchup benzoic acid in quantities not exceeding the maximum permissible concentration . In one of the samples of ketchup found capsaicin.

Keywords: mutagen, genomic DNA, damage DNA, agarose gel electrophoresis, gas chromatography, nutritional supplements, tomatoes.

Введение

Существует огромное количество химических факторов (в том числе пищевых добавок), потенциально действующих на структуру ДНК, а значит – способных причинить вред человеческому организму и его наследственному материалу. Часть этих веществ способна аккумулироваться в организме, повышая свою концентрацию и тем самым усиливая своё негативное действие на структуру ДНК человека.

Целью данного исследования явилось изучение влияния технологического процесса, и в первую очередь используемых в нём химических веществ, на геномную ДНК в продуктах питания растительного происхождения на примере кетчупов, томатной пасты и консервированных томатов.

Материалы и методы

Для исследования были взяты семь наиболее распространённых на российском рынке марок кетчупов (группы 1–7), шесть из которых были обозначены производителем как «Кетчуп томатный» и один как «Кетчуп лечо». Также рассмотрены одна марка томатной пасты (ГОСТ 3343-89) (группа 8), томаты солёные (ГОСТ 7181-73) (группа 9) и свежие томаты сорта *Solanum lycopersicum*, выступающие в качестве контрольной группы (таблица 1).

Таблица 1. Характеристика исследуемых групп

Номер группы	Объект исследования
1	Кетчуп томатный
2	Кетчуп томатный
3	Кетчуп томатный
4	Кетчуп томатный
5	Кетчуп томатный
6	Кетчуп томатный
7	Кетчуп-лечо
8	Томатная паста (ГОСТ 3343-89)
9	Солёные томаты (ГОСТ 7181-73)
10 (контроль)	Томаты (<i>Solanum lycopersicum</i>)

На этапе пробоподготовки все образцы были подсушены при 40 градусах в течение 6 часов и центрифугированы при 1000 оборотах 1 минут. Образцы свежих и солёных томатов (группы 1 и 10) предварительно гомогенизировались. Это позволило удалить избыток влаги, которая убиралась после центрифугирования, до начала исследования.

Экспериментальная часть работы была проведена в два этапа. Первый этап включал выделение геномной ДНК из исследуемых образцов. Выделение растительной ДНК осуществлялось с применением набора «Проба ЦТАБ» фирмы ООО «ДНК-технология» (г. Москва) по предложенной производителем технологии (МУК 4.2.1913-04).

Изучение ДНК было проведено методом горизонтального электрофореза в агарозном геле [1]. Были использованы электрофоретическая камера «SE-2» производства ООО «НПФ Биоклон» (Россия, Москва) и источник питания «Эльф- 8» производства ООО «НПО ДНК-Технология» (Россия, Москва).

Окрашенная бромистым этидием электрофореграмма визуализировалась трансиллюминатором, изготовленным фирмой Vilber Lourmat (Франция), при длине волны 254 нм.

Фотографии электрофореграмм обрабатывались программой ImageJ (разработчик UnitedStates Department of Healthand Human Services, версия 1.45, 2011 год). Линейные

характеристики электрофореграммы приведены в пикселях, яркость в интенсивности светлой окраски пикселей.

Исследование ДНК производилось непосредственно после её выделения из исследуемого сырья, а выделение сразу после пробоподготовки, то есть длительного хранения образцов или их заморозки не проводилось.

Оценка состояния и концентрации выделенной ДНК осуществлялась путём сравнения исследуемых групп с группой контроля (свежие, не обработанные томаты). ДНК в этой группе была в нативном состоянии, так как не подвергалась действию изучаемых факторов.

При оценке линейных характеристик молекул ДНК учитывалось расстояние, на которое мигрировала ДНК в агарозном геле, количество образовавшихся фракций, протяжённость шмеров.

По яркости люминесценции в ультрафиолете ДНК, окрашенной бромистым этидием, оценивалось её количество.

На втором этапе осуществлён анализ химического состава исследуемых образцов на наличие веществ, классифицированных IARC (International Agency for Research on Cancer): 1 категория – это вещества, классифицированных IARC как канцерогенные для человека; категория 2A – вещества, классифицированных IARC как весьма вероятно канцерогенные для человека; категория 2B – вещества, классифицированных IARC как вероятно канцерогенные для человека [7]; и другие веществ, по имеющимся данным способных повреждать ДНК [2, 4, 5, 6, 9].

Исследование состава проб на наличие перечисленных веществ было проведено с использованием газового хроматомасс-спектрометра GCMS QP-2010 Plus производства фирмы Shimadzu (Япония). Пробоподготовка соответствовала предложенной производителем технологии. При исследовании пробы экстрагировались равным объёмом хлороформа в течение 5 минут при постоянном перемешивании. Экстракты упаривались до двукратного повышения концентрации растворённых веществ (то есть до 50 % исходного объёма).

При определении концентраций веществ было проведено сравнение с контрольным раствором этого же вещества в известной концентрации.

Результаты и обсуждения

На первом этапе работы было проведено выделение ДНК в десяти исследуемых группах.

При этом ДНК была выделена в пяти группах кетчупа из семи (гр. 2,3,4,6,7) в примесных количествах, не доступных для анализа. Шмеры визуально в данных группах не

наблюдались, обработка программой ImageJ дала недостоверные результаты, сравнимые с аппаратной погрешностью. Таким образом, присутствие высокомолекулярной ДНК в этих образцах не подтверждено.

В образце двух групп кетчупов (гр. 1 и 5) и солёных томатах (гр. 9) ДНК не была выявлена.

Контрольная группа и томатная паста (группа 8) дали почти одинаковую картину структуры ДНК: на электрофореграмме выявлено два шмера. Шмеры соответствуют высокомолекулярной и низкомолекулярной фракциям геномной ДНК, разделившимся в процессе миграции молекул. Шмеры образца томатной пасты по длине пройденного пути, следовательно, и по массе молекул ДНК, примерно соответствуют группе контроля, имея недостоверные отличия (таблица 2).

Таблица 2. Характеристика выделенной ДНК исследуемых групп

Название образца	Характеристики шмеров ДНК		
	Параметр	Высокомолекулярный	Низкомолекулярный
Контрольная группа	Начало (пиксель)	256	745
	Конец (пиксель)	433	925
	Длина (пиксель)	177	180
	Яркость	44	69
Томатная паста (группа 8)	Начало (пиксель)	242	783
	Конец (пиксель)	424	1001
	Длина (пиксель)	182	218
	Яркость	43	74

ДНК, выделенная из томатной пасты, мигрировала несколько дальше, что может свидетельствовать о минимальном повреждении её структуры, но при этом из неё было выделено большее количество ДНК, о чём свидетельствовала большая яркость её шмеров. Это может объясняться меньшим содержанием воды в томатной пасте, по сравнению с контрольной группой.

На втором этапе работы по изучению химического состава исследуемых образцов на наличие веществ, классифицированных IARC методом газовой хроматомасс-спектрометрии, были получены следующие результаты. Веществ, внесённых IARC в списки опасных и потенциально опасных, в исследованных нами продуктах питания не обнаружено.

В трёх образцах кетчупов из семи (образцы 1, 3 и 6) была выявлена бензойная кислота (так же известна как пищевая добавка E210) в количествах, не превышающих ПДК (таблица 3).

Таблица 3. Концентрации бензойной кислоты (E210) в исследуемых группах

Название образца (группа)	Концентрация добавки E210, %
Кетчуп томатный (группа 1)	0,004
Кетчуп томатный (группа 3)	0,065
Кетчуп томатный (группа 6)	0,008

В соответствии с гигиеническими нормами (ГН-98) допустимое суточное потребление (ДСП) E210 составляет 5 мг на кг вес тела в сутки, а ПДК в продуктах, изготовленных из томатов (кроме соков) 1 г на кг продукта, то есть 0,1 % [9].

В исследуемой группе номер 7 (кетчуп-лечо) обнаружено вещество капсаицин (рисунок 4). Капсаицин является протоалкалоидом, благодаря наличию в боковой цепи атома азота он относится к группе соединений, давно известных своей высокой биологической активностью и широко используемых в фармакологии.

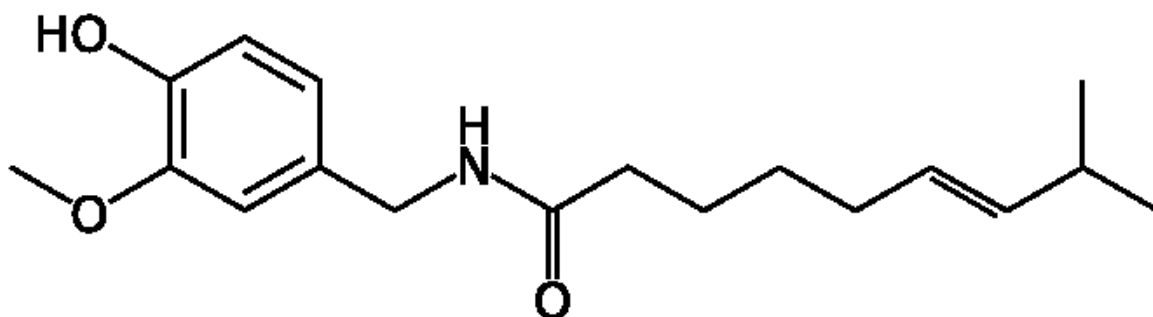


Рисунок 4. Схема молекулы капсаицина

Стоит отметить, что этот образец кетчупа, в отличие от прочих, был «Кетчуп-лечо», а не «Кетчуп томатный». Капсаицин является фактором, повреждающим раковые клетки. Его защитное действие основано на нарушении структуры митохондрий раковых клеток, приводящем к их апоптозу [3]. По отношению к митохондриям здоровых клеток капсаицин негативного воздействия не оказывает. Это объясняется существенными различиями структуры митохондрий в здоровых клетках организма и перерождённых клетках злокачественных новообразований, таких как раковые опухоли. Предполагается, что употребление пищи, содержащей капсаицин и другие ванилоиды, снижает риск развития раковых заболеваний.

Капсаицин является сильным раздражающим веществом, именно он обуславливает вкус жгучего перца рода *Capsicum* (содержание до 0,03 % от массы плода) [10]. В исследуемом образце данное вещество выявлено в количествах на два порядка меньше, чем в его природном источнике, что свидетельствует о безопасности для человека.

На основании проведенной работы были сделаны следующие выводы:

1. ДНК в продуктах питания, в частности в кетчупах и соленых томатах, сильно повреждена, или отсутствует. Это может быть следствием термической обработки растительного сырья, интенсивной механической обработки, вызвавшей разрушение крупных высокомолекулярных полимеров, которыми являются хромосомы.
2. Однако факт обнаружения ДНК в томатной пасте, прошедшей не менее интенсивную механическую обработку, чем кетчупы, позволяет предположить, что снижение концентрации ДНК в данных продуктах питания связано с обилием пищевых добавок и малым количеством натуральных компонентов, что в свою очередь может снижать питательность кетчупов для человека.
3. Содержание пищевой добавки E210 (бензойной кислоты) в рассмотренных образцах соответствовало требованиям ГН-98.
4. Веществ, внесённых IARC в списки опасных и потенциально опасных, в исследованных образцах не было обнаружено.
5. В рассмотренном образце кетчупа-лечо присутствуют вещества растительного происхождения (капсаицин), оказывающие разрушающее действие по отношению к раковым клеткам и защитное по отношению к клеткам организма человека соответственно. Однако эти вещества не препятствуют повреждению наследственного материала клетки как таковому, а лишь помогают организму бороться с возникающими раковыми клетками, повреждая их митохондрии.

Список литературы

1. Маддалена Кверчи, Марко Джермини и Ги Ван ден Эде. Анализ образцов пищевых продуктов на присутствие генетически модифицированных организмов, Люксембург: Бюро официальных изданий ЕЭС, 2007.
2. Beral V., Herman C., Kay C., Hannaford P., Darby S., Reeves G. Mor tality associated with oral contraceptives use: 25 year follow up of cohort of 46000 // Brit. Med. J. 1999. Vol. 318. P. 96-101.
3. Dr Timothy Bates, How spicy foods can kill cancers, BBC, 09.01.2007.
4. Jiang J, Huo K, Wu Z, Chen S, Pu S, Yu Z, Liu X, Chu PK., Silicon-induced DNA damage pathway and its modulation by titanium plasma immersion ion implantation, Biomaterials, 2008 Feb;29(5):544-50. Epub 2007 Nov 5.
5. Johnson B.F., GMO foods and crops: Africa's choice, New Biotechnology 27, 609-613, 2010.

6. Justin M. Chalker and Benjamin G. Davis, Chemical mutagenesis: selective post-expression interconversion of protein amino acid residues, *Current Opinion in Chemical Biology* 2010, 14:781-789.
7. IARC Monographs, Volumes 1–109, 2012.
8. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, France, 2006.
9. Гигиенические нормативы ГН 1.1.725-98 "Перечень веществ, продуктов, производственных процессов, бытовых и природных факторов, канцерогенных для человека" (утв. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 23 декабря 1998 г. N 32).
10. Mechuselie Kehie, Suman Kumaria, In vitro plantlet regeneration from cotyledon segments of *Capsicum chinense* Jacq. cv. Naga King Chili, and determination of capsaicin content in fruits of in vitro propagated plants by High Performance Liquid Chromatography, *Scientia Horticulturae*, Volume 164, 17 December 2013, Pages 1–8.

Рецензенты:

Завалева С.М., д.б.н., профессор, профессор кафедры общей биологии ОГУ, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Оренбургский государственный университет», г. Оренбург.

Сафонов М.А., д.б.н., доцент, профессор, заведующий кафедрой общей биологии, экологии и методики обучения биологии, ФГБОУ ВПО Оренбургский государственный педагогический университет, г. Оренбург.