

Anna Łuciuk

Praca doktorska pt.: „Zastosowania chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas do uwierzytelniania ryb i produktów rybnych”

Streszczenie

Falszowanie żywności stanowi obecnie duży problem, zarówno gospodarczy, jak i społeczny. Falszerstwa żywności powodują skutki nie tylko ekonomiczne, niejednokrotnie wiążą się również z zagrożeniem zdrowia a nawet życia konsumentów, w wyniku ekspozycji na alergeny i toksyny. W przypadku ryb i produktów rybnych falszowanie żywności obejmuje zastępowanie jednych gatunków ryb innymi, tańszymi, wprowadzanie dodatków takich jak fosforany i białka roślinne, wprowadzanie w błąd, co do miejsca połowu ryb lub reżimu hodowli, modyfikację metod obróbki technologicznej. Identyfikacja gatunków ryb jest szczególnie trudna, ze względu na wysoką liczbę gatunków i ich bliskie związki filogenetyczne. Ponadto, podczas obróbki technologicznej usuwane są cechy morfologiczne, które są zwykle wykorzystywane do identyfikacji gatunku ryby (głowa, ogon, płetwy grzbietowe, brzuszne, łuski, skóra). Poza tym, liczba zidentyfikowanych białek zgłoszonych w bazach danych dla ryb jest znacznie niższa w porównaniu z białkami ssaków, co utrudnia identyfikację markerów peptydowych, które mogą być wykorzystane do identyfikacji ryb.

Środkiem do zapewnienia bezpieczeństwa i jakości żywności, ochrony konsumentów, zapewnienia zgodności składu produktów z informacjami zawartymi na etykiecie produktu oraz zapewnienia przestrzegania prawa oraz regulacji dotyczących żywności jest jej uwierzytelnianie. Dlatego potrzebne jest opracowanie dokładnych, rzetelnych i czułych metod analitycznych identyfikacji gatunków ryb, pozwalających na wykrywanie fałszerstw i egzekwowanie prawidłowego oznakowania produktów.

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie, czy nieukierunkowana analiza proteomiczna przy użyciu chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrem mas o wysokiej rozdzielczości (LC-MS) może być z powodzeniem stosowana do uwierzytelniania gatunków ryb. Badania były ukierunkowane zwłaszcza na poszukiwanie i identyfikację markerów peptydowych różnicujących gatunki ryb, charakterystycznych dla danego gatunku, w tym markerów odpornych na procesy obróbki termicznej. Zastosowano także metody chemometryczne wspomagając identyfikację markerów oraz opracowano modele

predykcyjne. Następnie, w celu oceny przydatności opracowanych metod, analizie poddano komercyjnie dostępne produkty rybne oraz przygotowane mieszanki ryb.

Jako materiał badawczy wykorzystano pięć gatunków ryb, które podzielono na dwie grupy: morszczuk i mintaj oraz panga, sola i limanda. Powyższe gatunki zostały wybrane, ponieważ Państwowa Inspekcja Sanitarna wskazała, że w Polsce są one najczęściej zastępowane. Dodatkowo są to gatunki, których sprzedaż w Polsce jest wysoka.

W ramach prowadzonych prac eksperymentalnych, wykonane zostały trawienia trypsyną białek ryb mrożonych oraz poddanych obróbce termicznej – pieczeniu, oraz produktów rybnych dostępnych w sprzedaży i przygotowanych mieszanek ryb. Następnie, wykonane zostały analizy proteomiczne z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z wysokorozdzielczym spektrometrem mas typu kwadrupol – analizator czasu przelotu jonów (LC-QTOF-MS) w trybie skan MS oraz MS/MS.

Kompleksowa obróbka zebranych danych z wykorzystaniem między innymi oprogramowania do analiz proteomicznych oraz narzędzi chemometrycznych, pozwoliła na zidentyfikowanie szeregu markerów peptydomicznych odpornych na działanie temperatury, które różnicują gatunki ryb. W przypadku badań prowadzonych dla mintaja i morszczuka, po szczegółowej weryfikacji danych, zidentyfikowano 22 peptydy różnicujące specyficzne dla mintaja i 17 peptydów różnicujących specyficznych dla morszczuka. Na ich podstawie zbudowana została baza danych specyficznych markerów peptydowych. Następnie, opracowaną bazę wykorzystano do autentykacji produktów rybnych zawierających jako główny składnik filety morszczuka lub mintaja.

W przypadku analiz prowadzonych dla pangii, soli i limandy, zastosowano podejście oparte na profilowaniu, gdzie dane proteomiczne traktowane były jako „cechy”, a następnie opracowano odpowiednie modele statystyczne: PCA i OPLS-DA, z wykorzystaniem wielowymiarowej analizy danych. Poza tym, podobnie jak dla morszczuka i mintaja, opracowane zostały bazy danych zawierające różnicujące markery peptydomiczne dla soli, pangii i limandy. Analizy próbek testowych, pozwoliły na pozytywną weryfikację opracowanych modeli statystycznych, jak i weryfikację poprawnego działania opracowanych baz danych.

Podsumowując, wykazano, że nieukierunkowane analizy proteomiczne LC-MS przy użyciu wysokorozdzielczego spektrometru mas typu QToF może być z powodzeniem stosowana do uwierzytelniania gatunków ryb. Zidentyfikowano markery peptydowe charakterystyczne dla morszczuka i mintaja, w tym markery odporne na procesy obróbki

termicznej, i pomyślnie zweryfikowano ich przydatność do uwierzytelniania ryb. Wykorzystanie modelowania chemometrycznego przy użyciu PCA i OPLS-DA pozwoliło na opracowanie modelu predykcyjnego do uwierzytelniania soli, pangii i limandy. Peptydy różnicujące zostały zebrane w bazach danych, aby umożliwić szybkie wdrożenie opracowanej metody przez laboratoria kontroli żywności do rutynowych badań ryb.