

**Zestaw do wykrywania i identyfikacji nasion roślin oleistych, w szczególności konopi siewnych i ich produktów ubocznych w produktach spożywczych oraz sposób wykrywania i identyfikacji nasion roślin oleistych, w szczególności konopi siewnych i ich produktów ubocznych w produktach spożywczych.**

Przedmiotem wynalazku jest zestaw do wykrywania i identyfikacji nasion roślin oleistych, w szczególności konopi siewnych i ich produktów ubocznych w produktach spożywczych oraz sposób wykrywania i identyfikacji nasion roślin oleistych, w szczególności konopi siewnych i ich produktów ubocznych w produktach spożywczych.

- 5 Stosowane określenie dla celów niniejszego wynalazku „peptyd” oznacza cząsteczkę zawierającą liniowy układ reszt L-aminokwasowych połączonych ze sobą w szyku liniowym wiązaniem peptydowym. Stosowany tu termin „aminokwas” obejmuje w szczególności 20 naturalnie występujących aminokwasów (tj. alanina, arginina, asparagina, cysteina, fenyloalanina, glicyna, glutamina, histydyna, izoleucyna, kwas asparaginowy, kwas
- 10 glutaminowy, leucyna, lizyna, metionina, prolina, seryna, treonina, tryptofan, tyrozyna i walina), ale także aminokwasy niosące modyfikacje posttranslacyjne, które można znaleźć *in vivo*, takie jak hydroksyprolina, fosfoseryna i fosfotreonina oraz karbamidometylacja i oksydacja; i inne nietypowe aminokwasy, w tym między innymi kwas 2-aminoadypinowy, hydroksylizyna, izodesmozyrna, norwalina, norleucyna i ornityna.
- 15 Sekwencje nr: 1-204 są fragmentami białek nasion gatunków czarnuszka siewna (*Nigella sativa* L.), dynia zwyczajna (*Cucurbita pepo* L.), kapusta rzepek (*Brassica napus* L.), kokos właściwy (*Cocos nucifera* L.), konopie siewne (*Cannabis sativa* L.), len zwyczajny (*Linum usitatissimum* L.), ostropest plamisty (*Silybum marianum* L.), sezam indyjski (*Sesamum indicum* L.), słonecznik zwyczajny (*Helianthus annuus* L.) i wiesiołek dwuletni (*Oenothera biennis* L.)
- 20 (Tabela 1).

Stosowane tu określenie „mieszanka” odnosi się do dowolnej mieszanki, która może zawierać ekstrakt z nasion roślin oleistych i ich produktów ubocznych.

- Stosowane tu określenie „ekstrakt” odnosi się do substancji wytworzonej przez ekstrakcję. Ekstrakt jest ekstraktem z nasion roślin oleistych. Korzystne jest, aby ekstrakt zawierał białka
- 25 wyizolowane z nasion roślin oleistych, takie jak:

- globulina 11S wyekstrahowana z kokosa właściwego (*Cocos nucifera* L.), lnu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.), konopi siewnych (*Cannabis sativa* L.), dyni zwyczajnej (*Cucurbita pepo* L.), kapusty rzepek (*Brassica napus* L.), słonecznika zwyczajnego (*Helianthus annuus* L.),
- 30 • oleozyna wyekstrahowana z kokosa właściwego (*Cocos nucifera* L.), lnu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.), dyni zwyczajnej (*Cucurbita pepo* L.), kapusty rzepek (*Brassica napus* L.), słonecznika zwyczajnego (*Helianthus annuus* L.),
- białko późnej embriogenezy wyekstrahowane z lnu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.), dyni zwyczajnej (*Cucurbita pepo* L.), sezamu indyjskiego (*Sesamum indicum* L.), słonecznika
- 35 zwyczajnego (*Helianthus annuus* L.),

- albumina 2S wyekstrahowana z dyni zwyczajnej (*Cucurbita pepo* L.), słonecznika zwyczajnego (*Helianthus annuus* L.),
- białko 7S podobne do wikiliny wyekstrahowane z konopi siewnych (*Cannabis sativa* L.), dyni zwyczajnej (*Cucurbita pepo* L.), słonecznika zwyczajnego (*Helianthus annuus* L.),
- 5 • dehydrogenaza 11-beta-hydroksysteroidowa wyekstrahowana z dyni zwyczajnej (*Cucurbita pepo* L.), słonecznika zwyczajnego (*Helianthus annuus* L.), sezamu indyjskiego (*Sesamum indicum* L.),
- białko szoku cieplnego wyekstrahowane z dyni zwyczajnej (*Cucurbita pepo* L.), sezamu indyjskiego (*Sesamum indicum* L.),
- 10 • lektyna spokrewniona z jacialną wyekstrahowana z kapusty rzepek (*Brassica napus* L.), słonecznika zwyczajnego (*Helianthus annuus* L.),
- peroksygenaza wyekstrahowana z dyni zwyczajnej (*Cucurbita pepo* L.), sezamu indyjskiego (*Sesamum indicum* L.), słonecznika zwyczajnego (*Helianthus annuus* L.),
- nigellina-1 wyekstrahowana z czarnuszki siewnej (*Nigella sativa* L.),
- 15 • preprosilpepsyna 2 wyekstrahowana z ostropestu plamistego (*Silybum marianum* L.),
- białko zawierające domenę LOV wyekstrahowane z wiesiolka dwuletniego (*Oenothera biennis* L.).

Poprzez zestaw w niniejszym wynalazku należy rozumieć mieszaninę analityczną (wzorcową) przeznaczoną do stosowania w celu wykrywania, identyfikowania, potwierdzania 20 obecności i ilościowego oznaczania nasion roślin oleistych i ich produktów ubocznych. W optymalnym wykonaniu mieszanka analityczna przeznaczona jest do ustalania składu gatunkowego produktów spożywczych. Mieszanekę analityczną można sporządzić w dowolnej formulacji, takiej jak: proszek, roztwór lub liofilizat oraz do dowolnego sposobu stosowania, takiego jak: wzorzec zewnętrzny, wzorzec wewnętrzny, izotopowo znakowany wzorzec, analog, 25 dodatek wzorca, próba kontrolna. Jednakże preferowaną drogą stosowania mieszanki analitycznej jest izotopowo znakowany wzorzec.

Peptyd w wynalazku może być wykryty za pomocą każdej metody znanej w sztuce. Preferowana jest kombinacja chromatografii cieczowej i spektrometrii mas.

„Chromatografia cieczowa” odnosi się do techniki rozdzielania mieszaniny. Zwykle 30 obejmuje ona przepuszczenie mieszaniny rozpuszczonej w ciekłej fazie ruchomej przez fazę stacjonarną, która oddziela analit do pomiaru od innych cząsteczek w mieszaninach i pozwala na jego izolację. Podczas HPLC (wysokosprawnej chromatografii cieczowej) pod wysokim ciśnieniem wymusza się przejście próbki przez kolumnę wypełnioną cząstkami o nieregularnym lub sferycznym kształcie lub porowatą warstwę monolityczną (faza stacjonarna) za pomocą 35 cieczy (faza ruchoma).

Techniki spektrometrii mas w zakresie wynalazku obejmują w szczególności MALDI-TOF (desorpcja/ionizacja laserem wspomagana matrycą - pomiar czasu przelotu jonów) lub LC-ESI-MS/MS (chromatografia cieczowa - jonizacja przez elektrorozpylanie-spektrometria mas/spektrometria mas).

40 Stosowane w sposobie działania proteolityczne ekstraktu oznaczają ukierunkowaną degradację (trawienia) peptydów.

Zestaw i sposób wykrywania obejmuje 10 następujących gatunków nasion i ich produktów ubocznych: czarnuszka siewna (*Nigella sativa* L.), dynia zwyczajna (*Cucurbita pepo* L.), kapusta rzepak (*Brassica napus* L.), kokos właściwy (*Cocos nucifera* L.), konopie siewne (*Cannabis sativa* L.), len zwyczajny (*Linum usitatissimum* L.), ostropest plamisty (*Silybum marianum* L.), 5 sezam indyjski (*Sesamum indicum* L.), słonecznik zwyczajny (*Helianthus annuus* L.) i wiesiołek dwuletni (*Oenothera biennis* L.).

Falszowanie żywności staje się problemem globalnym, a wzrost produkcji przetworzonej żywności, złożony charakter produktów spożywczych, różnorodny procesy przetwórcze, którym są poddawane, a także wzrost wyrafinowania fałszerstw, utrudniają ich identyfikację, dlatego 10 obecne metody służące ich wykrywaniu są wciąż niewystarczające. Uwierzytelnianie żywności, zwłaszcza produktów przetworzonych, nadal stanowi wyzwanie. Falszowanie żywności podważa zaufanie konsumentów w zakresie jakości żywności oraz szkodzi całemu łańcuchowi dostaw żywności od rolników po sprzedawców detalicznych. Z tego względu, Komisja Europejska 13 marca 2018 r. uruchomiła Centrum Wiedzy o Zafalszowaniach i Jakości Żywności (Knowledge 15 Centre for Food Fraud and Quality). Na polskim rynku, według ostatniego sprawozdania za 2018 rok w sprawie wykonania przez Inspekcję Handlową krajowego planu urzędowej kontroli żywności [UOKiK, Warszawa 2019], najwięcej produktów o niewłaściwej jakości, w tym zafalszowanych, stwierdzono w przypadku: ryb i przetworów rybnych (35,1% nie odpowiadało obowiązującym przepisom prawa lub deklaracji producenta), wyrobów garmazeryjnych (25,3%), 20 miodu pszczelego (23,7%), produktów z chronioną nazwą ChOG, ChNP, GTS (16%), mięsa i przetworów mięsnych (13,7%), wyrobów cukierniczych (13,7%).

W ostatnich latach obserwuje się, zwłaszcza w krajach rozwiniętych, trend żywieniowy dotyczący preferowania konsumpcji produktów pochodzenia roślinnego nad produktami zwierzęcymi. Konsumenty podążający za tym trendem argumentują swoje wybory żywieniowe 25 dbałością o zdrowie, aspektem ekologicznym czy psychologicznym [Božo, J. (2019). *Some Aspects of Modern Nutrition*. In B. S. Karabegović, I. (Eds.), *New Technologies, Development and Application* (pp. 610-616). Springer Nature Switzerland AG, Cham: E-Publishing Inc.]. Rosnące zainteresowanie białkami zastępującymi mięso przekłada się na coraz większą ilość badań produktów ubocznych z przetwarzania oleju, które okazują się dobrym i tanim źródłem 30 białka roślinnego. Otrzymywane preparaty cechują się, poza wartością żywieniową, również bardzo dobrymi właściwościami funkcjonalnymi. Właściwości te decydują o tym, że producenci chętnie wprowadzają na rynek produkt, którego matrycą jest frakcja roślinna. Nasiona oraz oleje roślinne na przestrzeni ostatnich lat znalazły zastosowanie w wielu produktach spożywczych, między innymi, produktach zbożowych, mięsnych, rybnych i cukierniczych.

35 Produkty mięsne są wzbogacane przez dodatek olejów roślinnych, ale także zmielonych lub całych nasion roślin oleistych lub ich preparatów. Na polskim rynku najczęściej spotyka się produkty z dodatkiem nasion słonecznika, konopi i czarnuszki. Stosuje się różnorodne oleje i preparaty białkowe, takie jak mączki, koncentraty i izolaty, które charakteryzują się doskonałą 40 wartością żywieniową i są stosunkowo łatwostrawne. W ten sposób możliwe jest obniżenie wartości energetycznej produktu, a równocześnie wzbogacenie go w białko, składniki mineralne, witaminy i błonnik pokarmowy pochodzenia roślinnego. Ponadto, nasiona oraz oleje roślinne są bogate w związki bioaktywne (fitosterole, tokoferole, związki fenolowe, biologicznie aktywne białka i peptydy), dzięki czemu wykazują szereg korzystnych cech wpływających na zdrowie człowieka, między innymi obniżają ciśnienie tętnicze krwi, obniżają zawartość cholesterolu we

krwi, regulują poziom glukozy we krwi, poprawiają pracę układu pokarmowego, funkcjonowanie układu nerwowego, a także regulują pracę układu hormonalnego [Hidalgo, F. J., & Zamora, R. (2006). Peptides and proteins in edible oils: Stability, allergenicity, and new processing trends. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.006>;

5 Ozuna, C., & León-Galván, M. F. (2017). Cucurbitaceae Seed Protein Hydrolysates as a Potential Source of Bioactive Peptides with Functional Properties. *BioMed Research International*, 2121878, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2017/2121878>].

Żywność tego rodzaju staje się bardziej konkurencyjna, co przekłada się na aspekt ekonomiczny, a tym samym zyski producenta. Jednakże, zyski wynikające z wdrożonych nowych

10 produktów spożywczych na rynek często powodują jeszcze większą chęć poprawy rachunku ekonomicznego, co wiąże się z fałszowaniem ich składu [Wisniewski, A., & Buschulte, A. (2019). How to tackle food fraud in official food control authorities in Germany. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 14, 319–328. <https://doi.org/10.1007/s00003-019-01228-2>]. A to z kolei wiąże się z ryzykiem nietolerancji pokarmowych i reakcji alergicznych wśród

15 nieświadomych konsumentów. Pomijając fakt fałszowania żywności i straty ekonomiczne z tym związane, należy podkreślić, że sama przewaga diet bazujących na białkach roślinnych może być przyczyną wzrostu występowania nietolerancji i alergii pokarmowych w społeczeństwie w wyniku zachodzenia reakcji krzyżowych u osób z innymi alergiami pokarmowymi [Ozias-Akins, P., & Breiteneder, H. (2019). The functional biology of peanut allergens and possible links to

20 their allergenicity. *Allergy*, 74, 888–898. <https://doi.org/10.1111/all.13719>]. Liczne dane wskazują na powszechne i w ciągu ostatnich 2-3 dekad wzmagające się występowanie alergii pokarmowych. Na alergię pokarmową cierpi do 10% populacji, przy czym niewspółmiernie większa liczba przypadków obserwowana jest w obszarach rozwiniętych, uprzemysłowionych, wzrasta też ilość przypadków alergii u osób dorosłych [Scott H. Sicherer, Hugh A. Sampson,

25 Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management, *J Allergy Clin Immunol* 2018, 141:41-5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.003>].

W związku z powyższym istnieje potrzeba przeprowadzania badań określających dokładne profile białkowe w żywności. Identyfikując specyficzne białka i peptydy można wykrywać

30 zafałszowania żywności, a także zwiększyć jej bezpieczeństwo oraz polepszyć dbałość o zdrowie człowieka [Stoyke, M., Becker, R., Brockmeyer, J., Jira, W., Popping, W., Uhlig, S., & Wittke, S. (2019). German Government Official Methods Board Points the Way Forward: Launch of a New Working Group for Mass Spectrometry for Protein Analysis to Detect Food Fraud and Food Allergens. *An International Journal of Analytical Science*, 102, 5, 1280-1285. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0056>]. Konieczne jest rozwijanie szybkich i dokładnych

35 technik analitycznych do zwalczania oszustw i potwierdzania autentyczności żywności, w tym rozwijanie narzędzi analitycznych do identyfikacji gatunku, zanieczyszczeń żywności, aby zapobiegać, wykrywać i odróżniać celowe i niezamierzone zastępowanie i dodawanie składników, a także aby egzekwować przepisy dotyczące oznakowania, zapewnić

40 bezpieczeństwo i wiarygodność żywności oraz zdrowie konsumentów.

Do identyfikacji nasion i innych składników białkowych w żywności oraz analizy zafałszowań żywności (w tym olejów spożywczych) wykorzystuje się różne techniki analityczne. Na chwilę obecną możliwości identyfikacyjne obejmują głównie detekcję surowców alergicznych, takich jak sezam oraz orzechy (m.in. orzechy włoskie, laskowe, arachidowe,

nerkowca i migdały), przy użyciu metod opartych na wykrywaniu białek i peptydów, markerów DNA lub określonych metabolitów i związków. Uwierzytelnianie olejów roślinnych (głównie oliwy, oleju arachidowego, rzepakowego, sojowego, słonecznikowego i kokosowego) odbywa się głównie w oparciu o analizę kwasów tłuszczowych, tokoferolu, a ostatnio proponowane 5 metody w większości są oparte na metodach przesiewowych z wykorzystaniem chemometrii bez ekstrakcji próbki, takich jak techniki spektroskopowe. Nieukierunkowane analizy wykonywane technikami spektroskopowymi w celu szybkiego wykrycia różnic w lipidach, białkach i węglowodanach nie mają jednak zastosowania w uwierzytelnianiu w produktach przetworzonych wyprodukowanych z wielu składników.

10 Obecność określonych składników białkowych w produktach spożywczych jest sprawdzana za pomocą metod immunochemicznych, takich jak testy ELISA i urządzenia do szybkich testów (lateral flow devices). Jednak w przetworzonej żywności białkowe epitopy mogą ulegać denaturacji lub degradacji, co utrudnia ich wykrycie. W takich przypadkach analiza markerów peptydowych może być bardziej skuteczna, ponieważ pojedyncze peptydy są bardziej 15 stabilne niż całe białko. Dyskutuje się fakt, że białka ulegają degradacji podczas obróbki termicznej stosowanej w trakcie różnych procesów technologicznych podczas przygotowania produktów spożywczych (gotowanie, wędzenie, suszenie, pieczenie, sterylizacja, itp.). Efektem jest zaburzenie lub zniszczenie przestrzennej struktury białka, co wpływa na dostępność epitopów rozpoznawanych przez przeciwciała i/lub prowadzi do degradacji tychże epitopów, a w 20 konsekwencji prowadzi do tego, że białko nie zostanie wykryte w teście i uzyskany zostanie fałszywie negatywny wynik. Z drugiej strony testy immunochemiczne często prowadzą do fałszywie pozytywnych wyników, w skutek wystąpienia reakcji krzyżowych, ryzyko których, w przypadku produktów mięsnych zawierających oprócz wielu składników pochodzenia zwierzęcego często również składniki pochodzenia roślinnego, jest wysokie.

25 Metody wykorzystujące markery DNA, w tym najbardziej popularne oparte na reakcji PCR, opierają się na analizie DNA wyekstrahowanego z produktu spożywczego. Procesy technologiczne stosowane podczas wytwarzania produktów prowadzą również do degradacji DNA, co przejawia się uzyskiwaniem fałszywie negatywnych wyników. Oznaczenia oparte na reakcji PCR wymagają amplifikacji fragmentów DNA. W przypadku produktów przetworzonych 30 istnieje ryzyko, że fragment, który ma być amplifikowany uległ degradacji, w efekcie otrzymuje się wynik fałszywie negatywny. Ponadto, metody genetyczne wymaga zachowania warunków wykluczających zanieczyszczenie próbki w czasie jej pobierania i przygotowywania do analizy. Potrzebne jest dostosowanie pomieszczeń dedykowanych pod poszczególne etapy przygotowania próbki – oddzielne pomieszczenie do izolacji DNA kolejne do amplifikacji. Najczęściej 35 wykorzystywane obecnie metody identyfikacji gatunków oparte na analizie DNA są metodami bardzo wrażliwymi na zanieczyszczenia krzyżowe dające wyniki fałszywie pozytywne. Takich zagrożeń nie obserwuje się w przypadku identyfikacji składników za pomocą technik proteomicznych w oparciu o markery peptydowe.

Rozwiązaniem zaznaczonych niedogodności okazał się sposób według wynalazku, który 40 łączy wysokosprawną chromatografię ciekową z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (UHPLC-Q-TOF-MS/MS), co pozwoliło na zidentyfikowanie specyficznych białek i peptydów unikalnych dla badanych gatunków nasion oleistych, tj. czarnuszka siewna, dynia zwyczajna, kapusta rzepak, kokos właściwy, konopie siewne, len zwyczajny, ostropest plamisty, sezam indyjski, słonecznik zwyczajny i wiesiołek dwuletni, co pozwoliło określić zestaw specyficznych

peptydów zidentyfikowano w makuchach (produkt uboczny tłoczenia oleju na zimno), w białkach wyekstrahowanych z olejów oraz produktach spożywczych wyprodukowanych z dodatkiem analizowanych nasion i ich produktów ubocznych.

**Zestaw do wykrywania i identyfikacji nasion roślin oleistych i ich produktów ubocznych w produktach spożywczych według wynalazku zawiera co najmniej jeden peptyd, korzystnie** peptydy o sekwencji od 1 do 204 określone w Tabeli 1, jakie mogą być stosowane do identyfikacji gatunkowej gatunków nasion roślin oleistych w próbce, w szczególności w mieszkankach wielogatunkowych produktów spożywczych oraz nieoczekiwanie w nierafinowanych olejach, które zawierają niewielkie ilości białka.

10

Zastosowanie zestawu **do wykrywania i identyfikacji nasion roślin oleistych w szczególności konopi siewnych i ich produktów ubocznych w produktach spożywczych i identyfikacji obecności nasion roślin oleistych i ich produktów ubocznych w produktach spożywczych według wynalazku** obejmuje następujące kroki:

- 15 • izolację peptydów z ekstraktu z produktów spożywczych lub z ekstraktu z oleju poprzez poddanie ekstraktu z produktów spożywczych lub z oleju obróbce proteolitycznej polegającej na trawieniu białek przez enzymy proteolityczne; korzystnie przy użyciu roztworu wodorowęglanu amonu zawierającego 0,083 µg/µl trypsyny w proporcji od 1:20 do 1:50 enzymu do ilości białek i inkubację w temperaturze od 35 do 56 °C , korzystnie w temperaturze
- 20 37°C przez co najmniej 6, korzystnie 18 godzin;
- analizę uzyskanych peptydów z ekstraktu z oleju lub ekstraktu z produktów spożywczych przy wykorzystaniu znanej metody wykrywania peptydów, korzystnie kombinacji chromatografii cieczowej i spektrometrii mas pod kątem występowania co najmniej jednego peptydu stanowiącego sekwencję wybraną z grupy sekwencji: Sekwencja nr: 19, Sekwencja nr: 20,
- 25 Sekwencja nr: 21, Sekwencja nr: 22, Sekwencja nr: 23, Sekwencja nr: 24, Sekwencja nr: 25, Sekwencja nr: 26, Sekwencja nr: 27, Sekwencja nr: 28, Sekwencja nr: 140, Sekwencja nr: 141, Sekwencja nr: 142, Sekwencja nr: 143, Sekwencja nr: 144, wymienionych w Tabeli 1 we wspomnianym ekstrakcie poddanym obróbce proteolitycznej, tak, że porównuje się czas retencji, masę peptydu oraz fragmentacyjne widma mas peptydu obecnego w ekstrakcie z
- 30 czasem retencji, masą peptydu i fragmentacyjnym widmem mas peptydu o sekwencji z grupy sekwencji od Sekwencja nr: 19, Sekwencja nr: 20, Sekwencja nr: 21, Sekwencja nr: 22, Sekwencja nr: 23, Sekwencja nr: 24, Sekwencja nr: 25, Sekwencja nr: 26, Sekwencja nr: 27, Sekwencja nr: 28, Sekwencja nr: 140, Sekwencja nr: 141, Sekwencja nr: 142, Sekwencja nr: 143, Sekwencja nr: 144;
- 35 • wykrycie, że co najmniej jeden gatunek nasion lub jego produkty uboczne jest obecny w wspomnianym ekstrakcie, jeśli co najmniej jeden peptyd o sekwencji z grupy sekwencji o numerze Sekwencja nr: 19, Sekwencja nr: 20, Sekwencja nr: 21, Sekwencja nr: 22, Sekwencja nr: 23, Sekwencja nr: 24, Sekwencja nr: 25, Sekwencja nr: 26, Sekwencja nr: 27, Sekwencja nr: 28, Sekwencja nr: 140, Sekwencja nr: 141, Sekwencja nr: 142, Sekwencja nr: 143,
- 40 Sekwencja nr: 144; wymienionych wyżej został zidentyfikowany w ekstrakcie.

Korzystnie, gdy peptydy stosuje się do określania obecności nasion roślin oleistych i ich produktów ubocznych w jedno- i wieloskładnikowych produktach spożywczych, zarówno surowych jak i poddanych procesom technologicznym w czasie wytwarzania produktu

spożywczego, takim jak m.in. mielenie, homogenizacja, gotowanie, pieczenie, suszenie, wędzenie, grillowanie, pasteryzacja, sterylizacja.

Korzystnie, gdy mieszkankę ekstraktów uzyskuje się w procesie ekstrakcji produktu spożywczego roztworem wodorowęglanu amonu, zwłaszcza w stężeniu 50-100 mmol/l oraz w 5 przypadku produktów zawierających oleje ekstrakcji zimnym acetonem.

Korzystnie, gdy próbkę poddaje się redukcji mostków disiarczkowych z 5  $\mu$ l ditiotreitolu (DDT, odczynnik Clelanda), a po inkubacji termicznej powstałe reszty cysteinowe alkiluje się jodoacetamidem.

Korzystnie, gdy proces obróbki proteolitycznej obejmuje co najmniej jedną proteazę, 10 korzystnie: trypsynę i/lub chymotrypsynę i/lub elastazę i/lub endoproteinazę Glu-C, endoproteinazę Asp-N i/lub endoproteinazę Lys-C i/lub endoproteinazę Pro-C.

Wynalazek dotyczy także zestawu do określania obecności konopi siewnych i ich 15 produktów ubocznych w produktach spożywczych i nierafinowanych olejach zawierających co najmniej jeden peptyd o sekwencji wybranej z grupy sekwencji: Sekwencja nr: 19, Sekwencja nr: 20, Sekwencja nr: 21, Sekwencja nr: 22, Sekwencja nr: 23, Sekwencja nr: 24, Sekwencja nr: 25, Sekwencja nr: 26, Sekwencja nr: 27, Sekwencja nr: 28, Sekwencja nr: 140, Sekwencja nr: 141, Sekwencja nr: 142, Sekwencja nr: 143, Sekwencja nr: 144; określonych w Tabeli 1.

Korzystnie, gdy zestaw zawiera co najmniej dwa lub więcej peptydów wybranych z grupy 20 sekwencji: Sekwencja nr: 19, Sekwencja nr: 20, Sekwencja nr: 21, Sekwencja nr: 22, Sekwencja nr: 23, Sekwencja nr: 24, Sekwencja nr: 25, Sekwencja nr: 26, Sekwencja nr: 27, Sekwencja nr: 28, Sekwencja nr: 140, Sekwencja nr: 141, Sekwencja nr: 142, Sekwencja nr: 143, Sekwencja nr: 144.

Korzystnie, gdy zestaw zawiera peptydy o Sekwencja nr: 19, Sekwencja nr: 20, Sekwencja 25 nr: 21, Sekwencja nr: 22, Sekwencja nr: 23, Sekwencja nr: 24, Sekwencja nr: 25, Sekwencja nr: 26, Sekwencja nr: 27, Sekwencja nr: 28, Sekwencja nr: 140, Sekwencja nr: 141, Sekwencja nr: 142, Sekwencja nr: 143, Sekwencja nr: 144.

Korzystnie, gdy peptydy stosuje się do określania obecności nasion roślin oleistych i ich 30 produktów ubocznych w jedno i wieloskładnikowych produktach spożywczych, zarówno surowych jak i poddanych procesom technologicznym w czasie wytwarzania produktu spożywczego, takim jak m.in. mielenie, homogenizacja, gotowanie, pieczenie, suszenie, wędzenie, grillowanie, pasteryzacja, sterylizacja.

Dzięki zestawowi peptydów według wynalazku możliwe jest wykrywanie i identyfikacja 35 nasion roślin oleistych i ich produktów ubocznych w produktach spożywczych, z dużą czułością i ekscyponalną selektywnością, przy wykorzystaniu do detekcji gatunku spektrometrii mas i specyficznych dla gatunku peptydów o zdefiniowanej sekwencji według wynalazku. Przedłożony zestaw peptydów jest efektywnym narzędziem analitycznym do wykrywania zafalszowań żywności i uwiaryzelniania żywności narażonej na zafalszowania. Efektywnie przyczyni się do 40 ochrony interesów producentów, dostawców oraz konsumentów, ekonomicznych i zdrowotnych oraz skutecznej kontroli produktów przez organizacje odpowiedzialne za kontrolę produktów trafiających na rynek a także do skutecznego egzekwowania przepisów prawa dotyczącego jakości i znakowania produktów żywnościowych.

Opis rysunków

**Rysunek 1.** Porównanie profili białkowych z białek wyekstrahowanych acetonem z 10 rodzajów olei tłoczonych na zimno. Ścieżki: S – słonecznik; Se - sezam; P - dynia; C - kokos; E - wiesiołek; H - konopie; N - czarnuszka; L – siemię lniane; R - rzepak; M - ostropest.

**Rysunek 2.** Widok 3D chromatogramów uzyskanych techniką LC-Q-TOF-MS/MS z białek wyekstrahowanych z olejów tłoczonych na zimno pozyskanych z 10 badanych gatunków nasion roślin oleistych: czarnuszka siewna, dynia zwyczajna, kapusta rzepak, kokos właściwy, konopie siewne, len zwyczajny, ostropest plamisty, sezam indyjski, słonecznik zwyczajny, wiesiołek dwuletni. Pojedyncze chromatogramy z drugiego wymiaru są umieszczane jeden koło drugiego w przestrzeni trójwymiarowej; czas retencji w I kolumnie jest zaznaczany na osi X, czas retencji w II kolumnie na osi Y, a intensywność sygnału na osi Z.

**Rysunek 3.** LC-QTOF-MS/MS spektra specyficznych gatunkowo markerów peptydowych otrzymanych z globuliny 11S wyekstrahowanej z: (A) kokosa właściwego; (B) konopi siewnych.

**Rysunek 4.** LC-QTOF-MS/MS spektra specyficznych gatunkowo markerów peptydowych otrzymanych z wyekstrahowanych białek; (A) oleozyna z dyni zwyczajnej; (B) oleozyna z lnu zwyczajnego; (C) nigellina z czarnuszki siewnej.

#### Przykłady wykonania

Próbka ekstraktu (około 5 mg) z wycieków nasion roślin oleistych (produkt uboczny tłoczenia na zimno) i ekstraktu z nierafinowanego oleju została rozpuszczona w roztworze wodorowęglanu amonu (100 mmol/l) i poddana redukcji mostków disiarczkowych z 5  $\mu$ l ditiotreitolu (DDT, odczynnik Clelanda). Po inkubacji termicznej powstałe reszty cysteinowe były alkilowane jodoacetamidem, a następnie poddane całkowitemu trawieniu trypsyną. Produkty trawienia trypsyną uzyskane z nasion roślin oleistych były następnie analizowane za pomocą LC-ESI-MS/MS (chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas z zastosowaniem jonizacji poprzez elektrorozpylanie) celem charakterystyki składu. Na Rysunku 1 przedstawiono porównanie profili białkowych z białek wyekstrahowanych acetonem z badanych gatunków olei tłoczonych na zimno.

Szczegółowy protokół obejmował homogenizację próbki (0,3 g) w 1 ml roztworu wodorowęglanu amonu (100 mmol/l) przy użyciu homogenizatora T25 Ultra-Turrax (IKA Labortechnik, Staufen, Germany) przy obrotach 9500 rpm przez 2 $\times$ 20 s, a następnie 13,500 rpm przez 30 s. Uzyskany homogenat suszono w temperaturze 37°C w próżni przy użyciu koncentratora miVac Duo (Genevac Ltd., Suffolk, UK). Wysuszoną próbkę (około 5 mg) rozpuszczano w 100  $\mu$ l wodorowęglanu amonu o stężeniu 100 mmol/l i poddawano redukcji mostków disiarczkowych z 5  $\mu$ l ditiotreitolu (DDT, odczynnik Clelanda). Próbki inkubowano w temperaturze 56 °C przez 1 h z zastosowaniem termobloku. Po inkubacji termicznej powstałe reszty cysteinowe alkilowano z zastosowaniem 20  $\mu$ l jodoacetamidu i inkubowano przez 30 min w ciemności w temperaturze pokojowej. Pozostały jodoacetamid neutralizowano przez dodanie 20  $\mu$ l ditiotreitolu (DDT, odczynnik Clelanda) i inkubację w temperaturze pokojowej przez 30 min. Trawienie białka prowadzono przy użyciu roztworu wodorowęglanu amonu zawierającego 0,083  $\mu$ g/ $\mu$ L trypsyny. Próbki inkubowano w temperaturze 37°C przez 18 godzin. Po zakończonej inkubacji produkty trawienia tryptycznego oczyszczano przy użyciu gotowych zestawów Sep-Pak C18 Plus (masa sorbentu 360 mg/0.7 mL) firmy Waters (Milford, MA, USA) zgodnie z instrukcją producenta. Oczyszczone produkty trawienia tryptycznego suszono w temperaturze

37°C w próżni przy użyciu koncentratora miVac Duo (Genevac Ltd., Suffolk, UK) a następnie rozpuszczano w 0,5-1 ml 5% roztworu acetonitrylu zawierającego 0,1% kwasu mrówkowy i poddawano analizie LC-MS/MS.

W czasie analizy LC-ESI-MS/MS 10 µL roztworu peptydów tryptycznych wstrzykuje się na kolumnę do chromatografii cieczowej, takiej jak chromatografia oddziaływań hydrofobowych, RP-HPLC (wysokosprawna chromatografia cieczowa z układem faz odwróconych), chromatografia jonowymienna, chromatografia wykluczania i chromatografia powinowactwa wykorzystując Agilent 1290 HPLC. Spektrometr mas Q-TOF (Agilent) jest podłączony do HPLC w celu dokładnego pomiaru masy. Urządzenie zbiera i rejestruje dane w trybie jonów dodatnich. Kalibracja przyrządu przeprowadzana jest przy użyciu mieszaniny związków o zdefiniowanych masach (Agilent LC/MS tuning mix).

W przypadku identyfikacji peptydów specyficznych dla gatunków nasion oleistych stanowiących przedmiot wynalazku analizy prowadzono przy pomocy chromatografu cieczowego Agilent Technologies 1290 Infinity sprzężonego z spektrometrem mas wysokich rozdzielczości Agilent Technologies 6550 iFunnel QTOF LC-MS wyposażonego w źródło jonów ESI Agilent Technologies Jet Stream. Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie Agilent RRHD Eclipse Plus column (2.1x 150 mm 1.8 µm). Jako fazę ruchoma stosowano 0.1% kwas mrówkowy w wodzie (A) i w acetonitrylu (B). Zastosowano elucję gradientową: 0–2 min, 3% B; 2–40 min, 35% B; 40–45 min, 40% B; 45–50 min, 90% B; 50–55 min, 90% B, kondycjonowanie kolumny 3% B przez 5 min, szybkość przepływu fazy ruchomej 0.3 ml/min. Objętość nastrzyku wynosiła 10 µl, temperatura kolumny 40°C. Zbierano jony dodatnie w trybie skan MS oraz MS/MS w zakresie mas m/z od 100 do 3000. Parametry pracy MS: temperatura gazu rozpylającego 250°C, przepływ gazu rozpylającego 14 L/min, ciśnienie nebulizatora 35 psi, temperatura gazu osłonowego 250°C, przepływ gazu osłonowego 11 L/min, napięcie kapilary 3500 V. Monitorowano dwa jony referencyjne: m/z 121.0509 oraz m/z 922.0098.

Następnie analizowano partie ekstraktów z wycieków gatunków nasion roślin oleistych, aby potwierdzić specyficzność tych peptydów. Stosując opisany wyżej sposób działania, z powodzeniem zidentyfikowano specyficzne peptydy dla gatunków nasion (ze ściśle zdefiniowaną odrębną masą cząsteczkową i sekwencją aminokwasów).

Podobnie analizowano partie ekstraktów białek z olejów tłoczonych na zimno uzyskanych z badanych gatunków nasion roślin oleistych oraz produktów wyprodukowanych z dodatkiem nasion roślin oleistych lub ich produktów ubocznych, aby potwierdzić obecność specyficznych peptydów w olejach oraz specyficzność gatunkową tych peptydów.

Analizy te wykazały, że spektrometria mas może być zastosowana do identyfikacji specyficznych peptydów nasion konopi siewnych (*Cannabis sativa* L).

Dzięki sposobowi wykrywania według wynalazku wszystkie ze specyficznych peptydów dla nasion roślin oleistych można jednoznacznie wykryć w ekstraktach z nasion roślin oleistych, ich produktów ubocznych oraz mieszankach analitycznych do wykrywania, identyfikowania, potwierdzania obecności i ilościowego oznaczania nasion roślin oleistych i ich produktów ubocznych w oparciu o skład peptydowy. W Tabeli 1 przedstawiono zestawienie specyficznych markerów peptydowych dla gatunków czarnuszka siewna, dynia zwyczajna, kapusta rzepek,

kokos właściwy, konopie siewne, len zwyczajny, ostropest plamisty, sezam indyjski, słonecznik zwyczajny, wiesiołek dwuletni.

Niniejszy wynalazek dostarcza skuteczny test do identyfikacji i potwierdzenia obecności gatunków nasion roślin oleistych w produktach spożywczych, zwłaszcza w mieszaninach 5 zawierających wiele gatunków. Rysunek 2 prezentuje widok 3D chromatogramów uzyskanych techniką LC-Q-TOF-MS/MS z białek wyekstrahowanych z olejów tłoczonych na zimno pozyskanych z 10 badanych gatunków nasion roślin oleistych: czarnuszka siewna, dynia zwyczajna, kapusta rzepak, kokos właściwy, konopie siewne, len zwyczajny, ostropest plamisty, sezam indyjski, słonecznik zwyczajny, wiesiołek dwuletni.

10 Niniejszy wynalazek dostarcza również czuły test identyfikacyjny, do udokumentowania obecności specyficznych peptydów nasion roślin oleistych w mieszankach analitycznych wytwarzanych z ekstraktów z nasion roślin oleistych lub syntetycznych peptydów.

Peptydy specyficzne dla nasion roślin oleistych zidentyfikowano najpierw ze względu na ich specyficzne masy i charakterystykę sekwencji aminokwasowych, które można użyć jako 15 markery peptydowe dla gatunku. Stosując metodę LC-MS/MS, osiągnięto wysoki poziom swoistości wykrywania przyłączeniu (1) sygnałów MS/MS, (2) pomiarów masy w wysokiej rozdzielczości i (3) czasów retencji chromatograficznej. Zatem wykazano, że powyższe peptydy są specyficzne dla gatunków nasion roślin oleistych, co potwierdzono dla różnych prób 20 wytłoków, nierafinowanych olejów i przetworzonych produktów spożywczych. LC-QTOF-MS/MS spektra specyficznych gatunkowo markerów peptydowych otrzymanych z globuliny 11S wyekstrahowanej z: (A) kokosa właściwego; (B) konopi siewnych przedstawiono na Rysunku 3. Rysunek 4 przedstawia spektra specyficznych gatunkowo markerów peptydowych otrzymanych z wyekstrahowanych białek; (A) oleozyna z dyni zwyczajnej; (B) oleozyna z lnu zwyczajnego; (C) nigellina z czarnuszki siewnej.

**Tabela 1.** Zestawienie specyficznych markerów peptydowych dla gatunków czarnuszka siewna, dynia zwyczajna, kapusta rzepek, kokos właściwy, konopie siewne, len zwyczajny, ostropest plamisty, sezam indyjski, słonecznik zwyczajny, wiesiołek dwuletni.

Gatunek	Masa (Da)	Intensywność	Czas retencji (min)	Specyficzna sekwencja aminokwasowa peptydu	Seqwencja nr:
<b>Globulina 11S</b>					
Konopie siewne (Cannabis sativa L.)	3131.41	1.67E+07	25.50	VECEGGMIESWNPNEHQFCAGVALLR	<b>19</b>
	1777.82	8.88E+06	15.78	FYIAGNPHEDFPQSR	<b>20</b>
	1693.82	5.54E+07	20.07	AMPEDVIANSYQISR	<b>21</b>
	2097.02	3.69E+07	30.92	GFSVNLIQEAFNVDSETAR	<b>22</b>
	1667.74	8.10E+06	8.88	TAVYGDQNECQLNR	<b>23</b>
	2538.22	2.14E+07	29.65	GVLGTLFPGCAETFEEAQVSVGGGR	<b>24</b>
	2332.16	7.49E+05	21.77	NAMYAPHYNINAHSIYAIR	<b>25</b>
	1126.49	4.66E+06	3.53	LEACEPDHR	<b>26</b>
	1599.88	3.75E+07	20.73	QQQALTVPQNFVVK	<b>27</b>
2467.12	2.10E+07	20.13	FYIAGNPHQEFPQSMMTQQGR	<b>28</b>	
<b>Białko 7S podobne do wikiliny</b>					
Konopie siewne (Cannabis sativa L.)	2069.13	1.22E+06	40.65	TLFLPQYLDSELTIFIR	<b>140</b>
	2031.03	9.23E+05	22.58	EILSSQQEGPIVYIPDSR	<b>141</b>
	1430.76	1.88E+05	26.85	GPELAAAFGLSLER	<b>142</b>
	2132.00	7.38E+05	32.00	NNYGWSIALDEFSYSPLR	<b>143</b>
	2069.13	1.13E+06	40.62	TLFLPQYLDSELTIFIR	<b>144</b>