

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ ИМ. В.М. ГОРБАТОВА» РАН
(ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)**

УДК 637.5.07:577.112.7:637.52

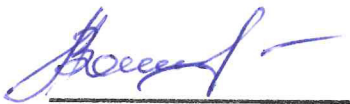
УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБНУ «ФНЦ
пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН
доктор тех.наук, профессор


/ Кузнецова О.А.
«28» октября 2025 г.

ОТЧЕТ

**«Обоснование гигиенических требований безопасности и изучение
пищевой ценности продукции нового вида, полученной из насекомых.
Разработка методов контроля»
по договору № Н-17/306 от 11.07.2025
(промежуточный, этап 1)**

Руководитель НИР,
Руководитель Научно-
исследовательского
испытательного центра, д.т.н


(подпись)

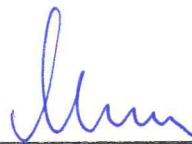
Вострикова Н.Л.

Москва, 2025

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Ответственный исполнитель:

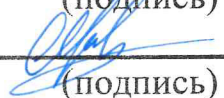
Зав. Лаборатории
«Молекулярной биологии и
бионформатики», к.т.н.



(подпись)

Минаев М.Ю.
(гл.1(1,3), гл.3(3.5))

Зам. руководителя НИИЦ, к.т.н.



(подпись)

Захаров М.А.
(гл.1(4), гл.3(3.3))

Исполнители НИР:

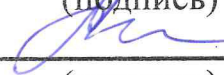
Рук.отдела «Консультационно-
методического обеспечения



(подпись)

Бушнева М.Ю.
(гл.2, гл.3(3.1))

Главный метролог НИИЦ



(подпись)

Медведевских
М.Ю.
(гл.3(3.2,3.4),
приложения)

Младший научный сотрудник
лаборатории

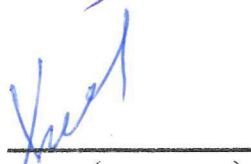
«Научно-методические
работы, биологические и
аналитические исследования»
НИИЦ



(подпись)

Захарова В.А.
(гл.1(2), гл.3(3.1.4))

Младший научный сотрудник
Лаборатории «Молекулярной
биологии и бионформатики»,
к.т.н

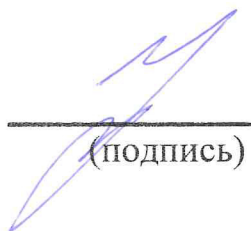


(подпись)

Хвостов Д.В.
(гл.1(1,3). гл.3(3.5))

Научный сотрудник
лаборатории

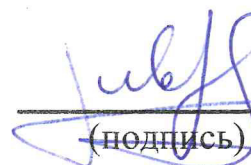
«Научно-методические
работы, биологические и
аналитические исследования»
НИИЦ, к.т.н.



(подпись)

Утьянов Д.А.
(гл.4)

Инженер-исследователь
лаборатории «Научно-
методические
работы, биологические и
аналитические исследования»
НИИЦ



(подпись)

Иванов А.А.
(гл.1(2), гл.3(3.1.4))

Оглавление

Перечень сокращений и обозначений.....	5
Реферат.....	6
Введение.....	7
Глава 1. Состояние вопроса.....	10
1. Применение сырья, полученного из <i>Acheta domesticus</i> в пищевой промышленности.....	10
2. Компонент сверчковой муки – хитин. Методы определения хитина.....	15
2.1 Методы определения хитина.....	18
2.1.1 Хроматографические методы.....	18
2.1.2 Химические методы определения.....	24
2.1.3 Спектральные методы.....	25
2.1.4 Биохимические методы.....	28
2.1.5 Методы определения молекулярной массы.....	29
3. Идентификация типа ткани: современные методы и их сравнительная оценка.....	30
3.1 Международный опыт по применению муки из сверчков в готовой продукции.....	33
3.2 Методы идентификации видов насекомых для применения в пищевой промышленности.....	35
3.3 Анализ ДНК насекомых.....	39
4. Заключение по литературному обзору.....	45
Глава 2. Материалы и методы.....	47
2.1 Материалы для исследований.....	47
2.2 Методы исследований.....	47
Глава 3. Результаты исследований.....	50
3.1 Проведение оценки пищевой ценности и безопасности продовольственного сырья, полученного с использованием насекомых.....	50
3.1.1 Оценка пищевой ценности продовольственного сырья, полученного с использованием насекомых.....	50
3.1.2 Оценка безопасности продовольственного сырья, полученного с использованием насекомых.....	50
3.1.3 Проведение оценки безопасности белка, содержащегося в продовольственном сырье, полученном с использованием насекомых.....	51

3.1.4 Проведение оценки биологической ценности и усвояемости белка, содержащегося в продовольственном сырье, полученном с использованием насекомых	51
3.2 Разработка проекта государственного стандартного образца (ГСО) глюкозамина для постановки количественной методики определения хитина.	53
3.3 Разработка метода определения хитина в пищевой продукции нового вида и продовольственном сырье, полученном из насекомых.....	53
3.3.1 Основные положения валидации разрабатываемых методик.	53
Характеристики методики количественного анализа хитина, оцениваемые при валидации	54
3.3.2 Выбор методики и оптимального протокола подготовки проб	59
3.4 Разработка проекта государственного стандартного образца (ГСО) вида <i>Acheta Domesticus</i> для постановки количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.....	66
3.5 Разработка метода определения и идентификации продовольственного сырья, полученного из насекомых	66
3.5.1 Особенности проведения валидации количественного метода ПЦР	67
3.5.2 Разработка метода определения и идентификации продовольственного сырья, полученного из насекомых	72
4. Основные выводы	89
Список литературы:	91
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	101

Перечень сокращений и обозначений

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ТЗ – Техническое задание

ДДТ – дихлордифенилтрихлорэтан

ГХЦГ – гексахлорциклогексан

МДУ – максимально допустимый уровень

КМАФАнМ – количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

НИР – научно-исследовательская работа

БГКП – бактерии группы кишечных палочек

ГХ – газовая хроматография

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГСО – государственный стандартный образец

ФАО ООН – Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединённых Наций (англ. Food and Agriculture Organization, FAO)

ПЦР – полимеразно-цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени,

ЕС – Европейский Союз

EFSA – Европейское агентство по безопасности продуктов питания (European Food Safety Authority)

ТСХ – тонкослойная хроматография

ИФА – иммуноферментный анализ

ММ – молекулярная масса

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

СТО – стандарт организации

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

СМ НИИЦ – система менеджмента научно-исследовательского испытательного центра

ИК – инфракрасная спектроскопия

ДП НИИЦ – документированная процедура научно-исследовательского испытательного центра

СКОР – аминокислотный скор (от англ. score – счёт) – показатель биологической ценности белка

LOD (limit of detection) – лимит обнаружения

LOQ (limit of quantification) – предел количественного определения

КРАС – коэффициент различия аминокислотного СКОРа

СТАВ – цетилтриметиламмония бромид

Остальные специфические термины и обозначения, используемые в настоящей НИР, представлены в тексте отчёта для лучшего восприятия при прочтении

Реферат

Ключевые слова: БИОМАССА *ACHETA DOMESTICUS*, КОНЦЕНТРАТ БЕЛКА ИЗ *ACHETA DOMESTICUS*, СВЕРЧОК ДОМОВОЙ, БЕЗОПАСНОСТЬ, ХИТИН, МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ, ДНК СВЕРЧКА, ГСО

Отчет составлен на 147 страницах, содержит 19 рисунков, 8 приложений.

В соответствии с ТЗ Договора № Н-17/306 от 11.07.2025в отчетный период были проведены работы:

По оценке пищевой ценности, безопасности продовольственного сырья, полученного с использованием насекомых, оценки безопасности, биологической ценности и усвояемости белка и разработка методов исследования»:

Оценка пищевой ценности продовольственного сырья, полученного с использованием насекомых (объект исследований – биомасса *Acheta Domesticus*; изучаемые показатели: содержание белка, жира, углеводов, влаги, золы).

Оценка безопасности продовольственного сырья, полученного с использованием насекомых (объект исследований – биомасса *Acheta Domesticus*; изучаемые показатели: содержание токсичных элементов – свинца, кадмия, ртути, мышьяка, хрома; содержание пестицидов – ДДТ и его метаболитов, ГХЦГ (сумма изомеров); содержание микотоксинов – афлатоксина В1, Т-2 токсина, зеараленона, фумонизина; содержание радионуклидов – цезия-137, стронция-90; микробиологические показатели безопасности – КМАФАнМ, БГКП, бактерии семейства Enterobacteriaceae, коагулазоположительные стафилококки и *S. aureus*.

Проведена оценка безопасности белка, содержащегося в продовольственном сырье, полученном с использованием насекомых (объект исследований – концентрат белка, выделенного из *Acheta Domesticus*; изучаемые показатели: содержание токсичных элементов – свинца, кадмия, ртути, мышьяка, хрома; содержание пестицидов – ДДТ и его метаболитов, ГХЦГ (сумма изомеров); содержание микотоксинов – афлатоксина В1, Т-2 токсина, зеараленона, фумонизина; содержание радионуклидов – цезия-137, стронция-90; микробиологические показатели безопасности –КМАФАнМ, БГКП, бактерии семейства Enterobacteriaceae, коагулазоположительные стафилококки и *S. aureus*.

Проведена оценка биологической ценности и усвояемости белка, содержащегося в продовольственном сырье, полученном с использованием насекомых (объект исследований – концентрат белка, выделенного из *Acheta Domesticus*; изучаемые показатели: аминокислотный состав, расчет незаменимых аминокислот).

Разработан проекта ГСО вида *Acheta Domesticus* для постановки количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

В рамках разработки метода определения и идентификации продовольственного сырья, полученного из насекомых на 1-м этапе работы: проведен анализ нуклеотидных последовательностей праймеров *in silico* с целью подтверждения их специфичности и пригодности для обнаружения соответствующих видоспецифичных целевых генов и подобраны оптимальные методы пробоподготовки и выделения нуклеиновых кислот.

Разработан проекта ГСО глюкозамина для постановки количественной методики определения хитина.

В рамках разработки метода определения хитина в пищевой продукции нового вида и продовольственном сырье, полученном из насекомых на 1-м этапе работы: проведен подбор оптимального метода исследования и подбор оптимального протокола пробоподготовки.

Введение

В последние десятилетия наблюдается значительный рост интереса к альтернативным источникам пищевого белка, включая насекомых, микроорганизмы и другие нетрадиционные объекты. Этот феномен обусловлен стремлением к устойчивому развитию агропромышленного комплекса, минимизации негативного воздействия на окружающую среду и рациональному использованию природных ресурсов.

ФАО ООН в 2013 году опубликовала исследование под названием «Съедобные насекомые: перспективы продовольственной и кормовой безопасности», в котором проанализированы биохимический состав и экологические аспекты использования насекомых в качестве источника белка. Результаты исследования показали, что насекомые содержат от 13 до 77% белка, что сопоставимо с показателями говядины (19-26%), тилапии (16-19%) и креветок (13-27%). Белки насекомых по своей биологической ценности не уступают белкам животного происхождения, рыбы и морепродуктов, что делает их перспективным объектом для пищевой промышленности.

Производство белка из насекомых обладает рядом существенных преимуществ по сравнению с традиционными источниками. Так, для получения 1 кг белка из насекомых требуется в 500 раз меньше воды и в 10 раз меньше площади сельскохозяйственных угодий, чем для производства аналогичного количества белка из говядины. Кроме того, насекомые выделяют значительно меньше парниковых газов, особенно метана, что делает их использование экологически более оправданным.

Традиционно насекомые в качестве пищевого продукта употребляются в странах Азиатско-Тихоокеанского региона и Южной Америки. В Мексике, Австралии и Китае существуют многовековые традиции использования насекомых в питании. В последние годы наблюдается тенденция к увеличению потребления насекомых в Европейском Союзе, США и Канаде, что обусловлено глобальными экологическими вызовами и необходимостью борьбы с изменением климата.

Однако, несмотря на очевидные преимущества, использование насекомых в качестве пищевых продуктов в различных странах регулируется разными правовыми нормами. В Евразийском экономическом союзе, например, нетрадиционные пищевые продукты, включая продукцию на основе насекомых, подлежат обязательной государственной регистрации. Однако в настоящее время отсутствует четко сформулированная нормативно-правовая база, регламентирующая требования к безопасности такой продукции, что затрудняет процесс её сертификации и внедрения на рынок.

Для обеспечения безопасности потребителей и стимулирования использования альтернативных источников белка необходимо разработать и внедрить комплексные гигиенические требования к качеству и безопасности пищевой продукции, полученной с использованием насекомых. Это включает в себя установление стандартов по микробиологическим, токсикологическим и биохимическим показателям, а также разработку методов контроля и мониторинга качества продукции на всех этапах производственного цикла.

Таким образом, интеграция альтернативных источников белка, таких как насекомые, в систему продовольственного обеспечения является важным шагом на пути к устойчивому развитию и решению глобальных экологических проблем. Однако для успешного внедрения таких инноваций требуется комплексный подход, включающий научные исследования, разработку нормативно-правовой базы и образовательные программы для широкой аудитории.

Данные предпосылки подтверждают актуальность настоящей НИР.

Целью которой является: научное обоснование гигиенических требований безопасности и изучение пищевой ценности пищевой продукции нового вида, полученной с использованием насекомых, разработка метода определения и идентификации продовольственного сырья, полученного из насекомых, и разработка метода определения хитина в пищевой продукции нового вида и продовольственном сырье, полученном из насекомых.

В рамках данного исследования было проведено комплексное научное обоснование гигиенических требований безопасности, направленных на обеспечение соответствия продукции нового вида, полученной с использованием насекомых, установленным стандартам. Кроме того, была осуществлена детальная оценка пищевой ценности данной продукции, что позволило определить её место в системе здорового питания.

Особое внимание было уделено разработке инновационного метода определения и идентификации продовольственного сырья, полученного из насекомых методом ПЦР. Этот метод обеспечивает высокую точность и надежность результатов, что является критически важным для внедрения новых продуктов на рынок.

Дополнительно был апробирован метод количественного определения хитина в продовольственном сырье, полученном из насекомых. Хитин, являясь основным компонентом экзоскелета насекомых, играет важную роль в определении биологической ценности и безопасности данных продуктов.

Глава 1. Состояние вопроса.

1. Применение сырья, полученного из *Acheta domesticus* в пищевой промышленности.

В настоящее время в ЕС разрешены к использованию в пищевой промышленности четыре вида насекомых: мигрирующая саранча (*Locusta migratoria*), домашние сверчки (*Acheta domesticus*), мучные черви (*Tenebrio molitor*) и черви буффало (*Alphitobius diaperinus*). Ещё восемь видов насекомых и продуктов, полученных из них, находятся в стадии рассмотрения EFSA для потенциального одобрения.

При приобретении товаров из ЕС необходимо тщательно изучать состав, указанный на упаковке. Например, личинки жуков *Alphitobius diaperinus* должны быть маркированы как «Личинки жуков *Alphitobius diaperinus* в сушеном/порошкообразном виде».

Ниже представлен обзор основных видов насекомых, одобренных или рассматриваемых к использованию в ЕС:

Alphitobius diaperinus (черви буффало) – представитель семейства *Tenebrionidae*, известный также как малый мучной червь или жук-подстилка. Данные насекомые часто встречаются в зернохранилищах, где наносят ущерб хранимым продуктам, таким как мука, а также в птицеводческих хозяйствах, выступая в роли переносчиков патогенных микроорганизмов. Личинки этого вида одобрены для употребления в пищу в ЕС и используются в качестве корма.

Tenebrio molitor (большой мучной хрущак) – насекомое с полным метаморфозом из отряда жесткокрылых. Его личинки, известные как мучные черви, также разрешены к использованию в пищевой промышленности.

Acheta domesticus (сверчок домашний) – вид насекомых, который в настоящее время рассматривается для включения в перечень разрешенных к использованию в пищевой промышленности.

Locusta migratoria (перелётная саранча) – насекомое, потенциально пригодное для использования в пищевых целях.

В Российской Федерации также можно найти продукты, содержащие насекомых, такие как краситель E120 (Кармин). Кроме того, на территории страны активно развиваются сверчковые фермы, а компания «Биолаборатория», резидент технопарка «Сколково», занимается производством пищевых добавок на основе личинок чёрной львинки (*Hermetia illucens*). Личинки данного вида в основном используются в качестве корма в аквакультуре и животноводстве, однако компания также сотрудничает с пищевыми технологами для изучения возможности их применения в пищевой промышленности. Недавно НИИ хлебопекарной промышленности опубликовал результаты экспериментов по добавлению муки из личинок чёрной львинки в тесто для хлеба. Было установлено, что оптимальное соотношение составляет 95% пшеничной муки и 5% муки из личинок.

Кроме того, в России можно встретить добавку E904 (Шеллак), которая широко используется в кондитерской промышленности. Шеллак представляет собой природную смолу, получаемую из секрета насекомых-червецов семейства *Kerriidae*. Эти насекомые обитают на некоторых тропических и субтропических деревьях в Индии и странах Юго-Восточной Азии.

Несмотря на то, что использование насекомых в пищевой промышленности становится все более распространенным, риски, связанные с этим процессом, остаются недостаточно изученными. На сегодняшний день отсутствуют комплексные научные исследования, посвященные безопасности переработки насекомых и их белков для человеческого организма.

В условиях растущего спроса на белок и усиливающегося негативного воздействия сельского хозяйства на экосистемы, поиск альтернативных, экологически устойчивых источников белка становится приоритетной задачей. Одним из перспективных направлений в этой области является использование съедобных насекомых. Эти организмы обладают высоким содержанием белка (до 70 % от сухой массы) [1] и демонстрируют значительный потенциал в снижении углеродного следа по сравнению с традиционными источниками белка, такими как свинина и говядина [2]. Производство энтомопротеинов

требует значительно меньше энергоресурсов, воды и земельных площадей, что делает его более устойчивым и эффективным с точки зрения экологии.

Несмотря на эти преимущества, насекомые как источник питания остаются новым и непривычным для значительной части населения, что может вызывать у них отторжение и страх. Одним из возможных решений этой проблемы является интеграция муки из насекомых в традиционные продукты питания, такие как хлебобулочные изделия.

Хлебобулочные изделия, благодаря своей высокой энергетической ценности, вкусовым качествам и доступности, пользуются широкой популярностью во всем мире. Их состав, как правило, включает углеводы и жиры, что делает их идеальными кандидатами для обогащения белком. Добавление белка из экологически чистых и недорогих источников, таких как мука из насекомых, может существенно повысить пищевую ценность этих продуктов без значительного увеличения их стоимости.

В рамках исследования, проведенного авторами [3], в рецептуру печенья была интегрирована мука из сверчка *Acheta domesticus* в качестве замены традиционной пшеничной муки. Эта инновация значительно увеличивает содержание белков в готовом продукте. В контексте исследования влияния добавления муки из сверчка на пищевую ценность печенья, следует отметить значительное увеличение содержания белка. В частности, при введении 15% муки из сверчка в рецептуру печенья, уровень белка в конечном продукте возрастает на 48,6% по сравнению с контрольным образцом. Данный факт свидетельствует о высокой биологической ценности данного источника протеинов и его потенциале для обогащения пищевых продуктов функциональными компонентами. В результате проведенного исследования, основанного на дегустации, было установлено, что большинство участников (80%) выразили положительное мнение о печенье, содержащем муку из *Acheta domesticus* (рис.1). Однако анализ гендерных различий выявил значительную разницу в восприятии продукта: женщины проявили более критичное отношение, чем мужчины. Среди женщин 9% выразили недовольство вкусом,

тогда как среди мужчин не было зафиксировано ни одного негативного отзыва. Полученные данные согласуются с результатами исследования, представленного в работе [4]. В этом исследовании мужчины из США и Испании продемонстрировали более благоприятное отношение к печеню с шоколадной крошкой, содержащему 15% муки из сверчка, по сравнению с женщинами. Этот феномен может быть объяснен различными факторами, включая культурные и социальные аспекты восприятия пищевых продуктов.

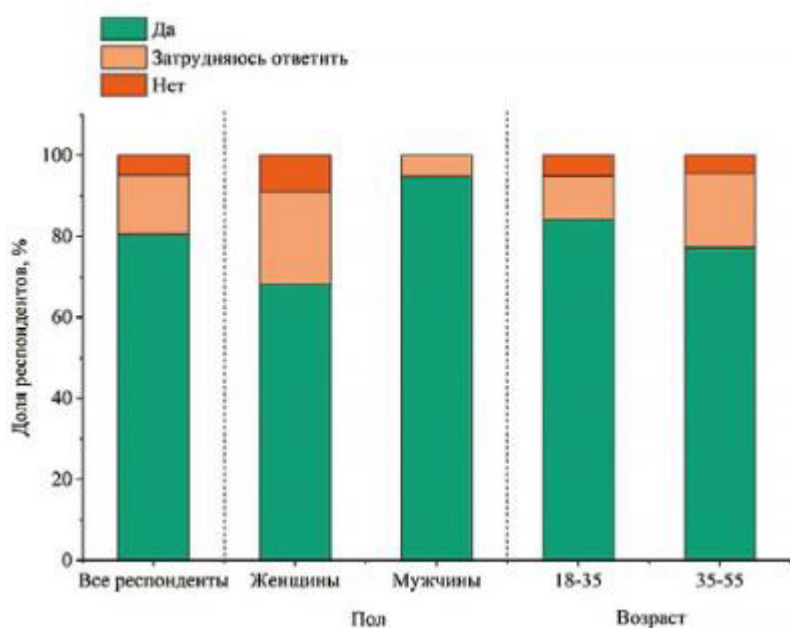


Рисунок 1. Ответы респондентов на вопрос “Понравилось ли вам печенье с добавлением муки из насекомых?” [3*].

В рамках проведенного исследования по оценке потребительских предпочтений в отношении продуктов, содержащих насекомых, была осуществлена дегустация печенья с добавлением 10% муки из домового сверчка (*Acheta domesticus*). Результаты показали, что более 80% участников дегустации дали положительную оценку данному продукту, что свидетельствует о высоком уровне приемлемости насекомых в качестве ингредиента в пищевой промышленности.

*Примечание

Вышеупомянутые исследования проведены на баз ВНИИПД, обладающего производственными возможностями по производству требуемых материалов для реализации настоящей НИР.

Однако при анализе гендерных различий в восприятии продукта было выявлено, что женщины оценили овсяное печенье с добавлением муки из домового сверчка менее положительно, чем мужчины. Данный факт может указывать на существование гендерных стереотипов и предвзятости в отношении продуктов, содержащих насекомых, среди женской аудитории.

Для преодоления предвзятости и расширения рынка потребителей продуктов с насекомыми рекомендуется проведение дополнительных дегустаций, а также активное информирование потребителей о пользе и питательных свойствах таких продуктов. Это позволит повысить осведомленность населения о потенциальных преимуществах включения насекомых в рацион и способствовать формированию более позитивного восприятия данных продуктов.

Применение насекомых в качестве источника белка в различных выпечных изделиях, таких как печенье [5], хлеб [6], кексы [7] и другие, является хорошо изученным и признанным методом, который значительно обогащает питательный состав продукции. Данный методологический подход демонстрирует значительный потенциал в качестве инновационного решения для устранения дефицита белка, что является критически важной проблемой в странах с низким социально-экономическим развитием.

Многие ученые исследуют ряд вопросов, связанных с добавлением насекомых в пищу. Одни изучают изменение пищевой ценности продуктов, микробиологические характеристики, к примеру, в ходе микробиологического анализа [8] муки из домашнего сверчка было обнаружено высокое содержание спорообразующих бактерий. Другие изучают влияние на внешний вид и вкус готовых изделий [9]. Важной задачей является разработка методов переработки насекомых для получения безопасных продуктов. Увеличение доли этой муки в рецептуре печенья приводит к его потемнению, что может негативно сказаться на восприятии продукта потребителями.

При этом стоит также не забывать про аллергенность данной муки.

2. Компонент сверчковой муки – хитин. Методы определения хитина.

Хитин, высокомолекулярный полисахарид, широко распространенный в клеточных стенках грибов, кутикулах нематод и экзоскелетах членистоногих, представляет собой мощный иммуноген. Он вызывает иммунный ответ у различных организмов, которые, в свою очередь, выработали механизмы его нейтрализации. Ключевым компонентом этих механизмов является хитиназа – фермент, катализирующий гидролиз хитиновых структур. Несмотря на то, что не все организмы обладают хитиназой, многие из них синтезируют белки с хитин-связывающими доменами (ChtBD), которые обеспечивают им возможность взаимодействия с хитином и его производными.

Интересно отметить, что некоторые патогенные вирусы, такие как вирус Эбола и вирус гепатита С (ВГС), используют хитин-связывающие домены для модуляции взаимодействия с клетками-хозяевами и инфицирования целевых тканей. Это подчеркивает важность хитина и его производных в биологических процессах и их потенциальное использование в качестве мишеней для разработки противовирусных терапевтических стратегий.

В соответствии с фундаментальным принципом биологической эволюции, хитиновые структуры и хитиназы эндогенного происхождения играют защитную роль, в то время как экзогенные хитиновые структуры и чужеродные хитиназы могут вызывать патологические реакции. Экзогенное воздействие хитина и хитиназ активирует врожденную иммунную систему человека, приводя к высвобождению провоспалительных цитокинов. Эти цитокины, в свою очередь, могут вызывать различные патологические состояния, такие как астма, atopический дерматит и другие хронические воспалительные заболевания. В некоторых случаях хроническое воспаление, вызванное экзогенными хитиновыми структурами, может приводить к развитию тяжелых аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз, системная красная волчанка, а также к онкологическим процессам [10].

Таким образом, хитин и его производные представляют собой не только важный структурный компонент многих организмов, но и ключевой элемент в

регуляции иммунных реакций. Понимание механизмов взаимодействия хитина с иммунной системой открывает новые перспективы для разработки инновационных подходов в медицине, включая создание эффективных методов лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний, а также разработку новых стратегий борьбы с вирусными инфекциями

Есть и положительная роль хитина насекомых. Сверчки, подобно большинству других съедобных насекомых, содержат хитин, который представляет собой уникальную форму пищевых волокон, отличающуюся от традиционных пищевых волокон, присутствующих в растительной пище, таких как фрукты. Хитиновые волокна, обладая специфической молекулярной структурой, оказывают положительное воздействие на микробиом кишечника, способствуя увеличению численности полезных бактерий, известных как пробиотики. Эти микроорганизмы играют ключевую роль в поддержании гомеостаза кишечной микрофлоры, улучшении пищеварения и укреплении иммунной системы.

В свете растущей актуальности применения и влияния модных тенденций в сфере здорового питания, необходимо также обладать методологической базой для эффективного контроля качества продукции. Особое внимание следует уделить вопросам мониторинга аллергенов и идентификации незаявленных компонентов, что является критически важным для обеспечения безопасности потребителей. В рамках данной проблематики, методологический подход должен включать в себя не только современные аналитические техники, но и комплексный анализ производственных процессов, направленный на минимизацию рисков и повышение прозрачности состава продуктов.

В настоящее время исследования свойств хитина и его производных очень обширны, поскольку постоянно появляются новые предложения по его применению.

Обладая уникальным химическим составом и биологическими свойствами, такими как биосовместимость, нетоксичность, биodeградируемость, сорбционность [11] и прочее, хитин широко используют в медицине. В качестве

основных направлений в современной медицине выделяют создание ранозаживляющих покрытий, хирургических нитей, имплантов, систем доставки лекарств [12]. В отдельных отраслях промышленности (очистка вод и почв) используют также промежуточные продукты получения хитина: хитин-люкановый [13], хитин-белковый, хитин-меланиновый [14] и хитин-минеральный комплексы [15]. Отдельного внимания заслуживает хитин как источник сбалансированных минеральных комплексов, предназначенных для восполнения дефицита кальция, магния, цинка, фосфора и других важных для человека элементов [16]. Свойства хитина зависят и от способа его выделения, так, например, использование агрессивных сред может привести к тому, что конечный продукт полностью лишится всей биологической ценности [17].

Хитин является одним из наиболее распространенных в природе полисахаридов. По разным оценкам, ежедневно в природе образуется и разрушается приблизительно 10 млрд тонн данного вещества. Он содержится во внешних покровах членистоногих, роговых частях животных, в водорослях и стенках грибов. По своему строению и биологическим функциям хитин подобен целлюлозе. Однако, в растениях, продуцирующих целлюлозу, хитин обнаружен не был. В максимальных количествах хитин содержится в следующих объектах:

- Ракообразные: панцири креветок, крабов, раков, омаров и лангустов являются обильными природными источниками хитина и широко используются для его получения.

- Грибы: клеточные стенки грибов также содержат хитин, играющий там опорную функцию, как и у ракообразных.

- Насекомые: экзоскелет насекомых, включая саранчу, кузнечиков, сверчков, а также личинок мухи "Черная львинка" содержит значительные количества хитина.

- Другие источники: хитин также обнаруживается в наружном скелете зоопланктона (кораллов, медуз), а также в некоторых моллюсках и губках.

2.1 Методы определения хитина

2.1.1 Хроматографические методы.

Исторически термины "хитин" и "хитозан" сложились, основываясь на главном различии свойств этих полисахаридов, а именно растворимости в разбавленных кислотах. Растворимость этих полисахаридов в слабых и разбавленных кислотах определяется степенью деацетилирования, т.е. содержанием в молекуле свободных аминогрупп. Когда степень деацетилирования менее 50 %, биополимер принято называть хитином. При степени деацетилирования более 50 % (обычно более 60 %) полисахарид становится растворимым в разбавленных растворах органических и неорганических кислот. Такой полисахарид получил название хитозан. Обычно этот термин используется для глубоко деацетилированного хитина, который является растворимым в разбавленной уксусной кислоте [18].

Процесс деацетилирования хитина заключается в замещении ацетильной группы молекулы d-глюкозамина водородом под действием концентрированного раствора минеральных кислот. При полном кислотном гидролизе образуется глюкозамин и эквимолярное количество уксусной кислоты.

Принципиальная схема реакции получения N-глюкозамина из хитина представлена на Рис. 2.

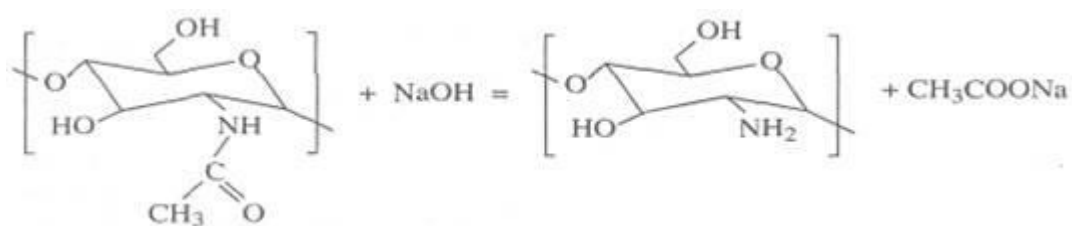


Рисунок 2. Схема реакции гидролиза хитозана.

На описанном свойстве основаны хроматографические методы определения хитина в биологических матрицах, в частности, для определения чистоты полученного из природного сырья хитина.

Методы жидкостной хроматографии

- Обращенно-фазовая жидкостная хроматография

Хитин и хитозан, являясь природными полимерами, не могут быть в явном виде проанализированы методами обращенно-фазовой хроматографии. Тогда как продукт кислотного гидролиза хитозана, N-глюкозамин, может быть количественно определен жидкостной хроматографией с электрохимическим, масс-спектрометрическим, флуориметрическим детектерами.

Определение N-глюкозамина с использованием диодноматричного детектора возможно при условии предварительной дериватизации аналита путем присоединения к атому азота хромофорной группы для получения устойчивого соединения, видимого в УФ области света. В работе [19] описано определение глюкозамина путем дератизации 9-флоренилметоксикарбонилхлоридом (Fmoc-Cl) с образованием N-флоренилметоксикарбонилглюкозамина (Рис.3). Полученный дериват поглощает УФ излучение в диапазоне около 254 нм, что делает возможным его детектирование в области дальнего ультрафиолета. Описан метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с хорошей линейностью, точностью, прецезионностью. Реакция производится в условиях предколоночной дериватизации.

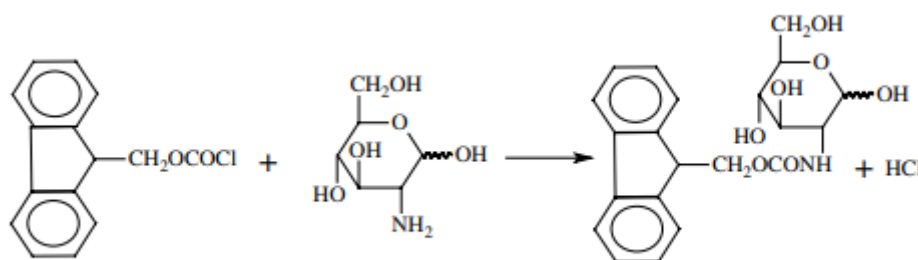


Рисунок 3. Схема получения пригодных для детектирования в ближнем UV диапазоне производных хитина.

Методика подходит для количественного определения D-глюкозамина. Далее производится расчет чистоты хитина с учетом массы взятого для гидролиза образца и степени его деацетилирования.

Другим способом определения глюкозамина с помощью жидкостной хроматографии является введение в молекулу люминисцирующей группы для последующей регистрации на флуоресцентном детекторе. В качестве дериватирующего агента может быть использован фенилизотиоцианат (PTIC) [20], орто-фталевый альдегид (OPA) [21], 1-фенил-3-метил-5-пиразолон (PMP) [22], флоренилметоксикарбонил (FМОС) [23] и др. [24,25].

В работе [26] хроматографический метод с дериватизацией FМОС-Su был оптимизирован с применением сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрического детектирования (UPLC/FLR) для определения содержания *N*-ацетил-*D*-глюкозамина (GlcN), гидролизованного из хитина в насекомых. Метод был применен для оценки количественного содержания хитина в мучных хрущаках *Tenebrio molitor* и домовых сверчках *Acheta domesticus*. Принципиальная схема показана на Рис.4. Метод UPLC/FLR оказался чувствительным и достаточно специфичным для количественной оценки содержания хитина в насекомых.

Следует отметить, что, поскольку *N*-глюкозамин имеет два природных стереоизомера (α и β), взаимопревращение которых в водном растворе предотвратить невозможно, на хроматограммах производных GlcN могут присутствовать два пика, что необходимо учитывать при пересчете GlcN на хитин и последующей оценке содержания его в ХСС.

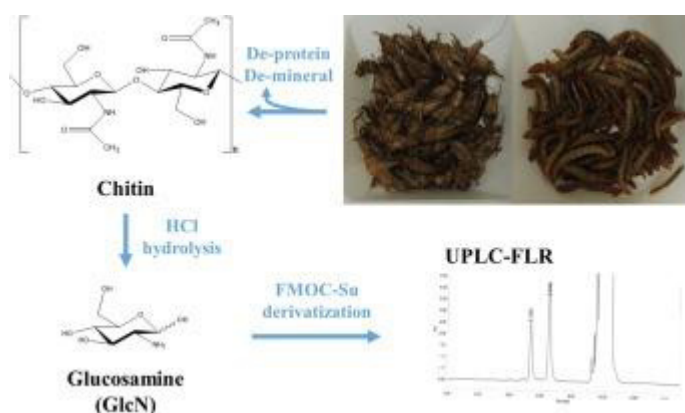


Рисунок 4. Принципиальная схема пробоподготовки хитина перед UPLC/FLR анализом.

Рассмотренные ранее способы детектирования высокоспецифичны, обладают высокой чувствительностью по отношению к производным глюкозамина. Однако, все они требуют предварительной дериватизации аналита, что занимает много времени, требует специального оборудования, навыков и реактивов. Так же, чтобы избежать потерь при расчетах количественного содержания GlcN, необходимо производить определение с использованием внутренних стандартов. ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием – единственный метод, потенциально пригодный для регистрации сигнала глюкозамина без предварительной дериватизации.

Как известно, детектирование с помощью рефрактометра неселективно. Регистрируются все вещества с показателем преломления (RI), отличающимся от RI подвижной фазы. Они, как правило, менее чувствительны, чем УФ-детекторы, но могут быть чрезвычайно полезны для обнаружения неионогенных соединений, не поглощающих в УФ-диапазоне и не флуоресцирующих.

Авторами работы [27] разработан простой воспроизводимый метод определения GlcN в панцирях краба-стригуна обыкновенного *Chionoecetes opilio* – важного продукта промысла ракообразных, широко используемого в пищевой промышленности и в качестве кормовой добавки. Метод модифицирован на основании большого массива литературных данных по жидкостной хроматографии глюкозамина с использованием других методов детектирования. Предел обнаружения в случае применения рефрактометра составил 1 мг/100 мл. Определение содержания хитина в крабах, проведенное в нескольких повторностях, показало содержание его в пределах $8,56 \pm 0,26$ %, относительное стандартное отклонение составляет менее трех процентов, что говорит о высокой точности. Методом стандартных добавок подтверждена высокая повторяемость и воспроизводимость.

- Гель-проникающая (эксклюзионная) хроматография

Для оценки молекулярной массы полимеризации хитозана может быть использован метод эксклюзионной хроматографии. Данным методом производится фракционирование по молекулярной массе, благодаря чему можно

оценить размер молекул и распределение по степени полимеризации. Раствор хитозана в разбавленных кислотах, например уксусной, пропускают через хроматографическую колонку, заполненную пористым материалом. В соответствии с принципом эксклюзионной хроматографии, далее происходит разделение по фракциям, молекулы с наибольшей молекулярной массой не задерживаются на сорбенте и покидают колонку ранее остальных.

Авторами работы [28] описана гель-проникающая хроматография образцов хитозана, охватывающих широкий диапазон степеней ацетилирования. Использование лазерного детектора многоугольного рассеяния света (MALS) позволяет получить распределение молярной массы без предварительной калибровки. Для определения молекулярно-массового распределения молекул используют хроматографическую колонку с высокосшитым поливинилбензолным сорбентом в виде монофенических гранул диаметром 10 мкм. В качестве элюэнта для растворения препарата хитозана используется 3-4% водный раствор уксусной кислоты. Для регистрации хроматографических пиков используется рефрактометрический детектор. Поскольку однозначная идентификация хроматографических пиков при использовании рефрактометра весьма затруднительна, для отнесения хроматографических пиков к полимерным молекулам определенного состава проводят хроматографическое разделение в идентичных условиях, но с применением ультрафиолетового детектора, измеряющего поглощение электромагнитных колебаний при длине волны 235 нм.

- Тонкослойная хроматография

Как известно, ТСХ не обладает высокой специфичностью и, для однозначной интерпретации результатов требует сочетания с другими методами. Однако, быстрота и простота метода оставляет ему возможность занять собственную нишу в области определения хитина и его производных. ТСХ является одним из первых методов, предложенных для анализа GlcN как конечного продукта гидролиза хитина. В 1969 году было показано, что разделение аминопроизводных сахаров на силикагеле затруднительно, но их

дезаминизированные продукты могут быть хорошо разрешены. Так же было показано, что GlcN дает специфическое синее окрашивание при обработке раствором фосфата мочевины [29].

Методы газовой хроматографии

Ранее нами описано, что при деацетилировании хитозана образуется эквимольное количество уксусной кислоты (рисунок 3). На этом принципе основан один из способов определения хитина методом газовой хроматографии, а именно в разделении на хроматографической колонке и последующем количественном определении образующейся уксусной кислоты. Для данных целей могут быть использованы масс-спектрометрический детектор или детектор ионизации пламенем ПИД.

Впервые исследование на эту тему было предложено в 1980 году З. Холан и В. Власковой [30]. Образованная в результате гидролиза уксусная кислота была количественно определена методом газожидкостной хроматографии на набивной колонке с использованием сорбента Порapak – Q с добавлением 3% ортофосфорной кислоты. Уксусная кислота определяется напрямую без предварительной дериватизации.

Использование данной методики позволяет сделать выводы о кинетике протекания деацетилирования хитина, подобрать оптимальные условия протекания реакции и подобрать лучшие реагенты.

С развитием техники стали доступны капиллярные колонки, обладающие более высокой, в сравнении с насадочными, эффективностью разделения. Авторами работы [31] газохроматографическая методика определения ацетильных групп в продуктах гидролиза хитозана была модифицирована и реализована с применением капиллярной колонки. В работе был исследован хитин, полученный из мицелия грибов *Humicola lutea*. Прямое определение уксусной кислоты на насадочных колонках было ограничено концентрациями не ниже 0.1 %. Определение более низких концентраций сопровождается нелинейными калибровочными кривыми, трудно идентифицируемыми пиками, неоправданно высоким пределом обнаружения. Использование капиллярной

колонок позволяет, благодаря ее высокой эффективности, производить количественное определение свободной уксусной кислоты в значительно более низких диапазонах, а именно 0.01-0.07% с высокой точностью и воспроизводимостью.

Другим подходом для определения содержания хитина в хитинсодержащем сырье является дериватизация продуктов кислотного гидролиза с целью получения летучих производных. Наиболее пригодными для газохроматографического анализа являются триметилсилильные (TMS) производные глюкозамина. Впервые исследование методом газожидкостной хроматографии TMS производных GlcN описано Т. Бхатти и Р. Чамберсом, авторами работы [32]. TMS производные образуются путем селективного силилирования свободных гидроксильных групп молекулы глюкозамина. Это обеспечивает более высокую летучесть, термическую стабильность и эффективное разделение.

Авторами произведено силилирование с использованием триметилхлорсилана и гексаметилдисилазана в среде пиридина. Образующиеся триметилсилильные производные глюкозамина отличаются высокой летучестью, улучшенной термической стабильностью и меньшей полярностью относительно исходных. Их количественное определение позволяет, как и в предыдущих случаях, давать оценку содержания хитина в исследуемых образцах. Использование внутренних стандартов позволяет повысить точность определения и прецизионность анализа.

2.1.2 Химические методы определения

Химические методы определения хитозана основаны на селективной способности активных групп молекул хитина или хитозана вступать в реакции с органическими веществами, давая в результате специфическое окрашивание. Так, хитозан реагирует с йодом с образованием хитозан-йодного комплекса, тогда как хитин не вступает в данную реакцию [33]. Кроме этого, хитозан окрашивается в красный цвет йодидом калия и разбавленной серной кислотой. Данные о специфической окрашиваемости хитина применимы при

гистологическом анализе хитина. Впоследствии определение хитина с использованием микроскопии описаны для многих организмов, например, в панцире краба *Scilla serrata* [34].

Синий флуоресцентный краситель Calcofluor White (CFW) также известный как флуоресцентный осветлитель M2R или Тинопал UNPA-GX, широко используется для быстрой идентификации хитина, а также хитинсодержащих организмов, таких как водоросли или грибы. Метод основан на селективном связывании CFW с полисахаридами. Например, каплю суспензии клеток или клеточных стенок смешивают с каплей 0,01% CFW и исследуют под флуоресцентным микроскопом. Благодаря присутствию хитина клеточные стенки флуоресцируют (ярко, желто-зеленым). Из-за разницы в толщине стенок в некоторых местах флуоресценция может быть более или менее интенсивной.

2.1.3 Спектральные методы

- ИК спектроскопия

ИК спектроскопия является одним из классических методов идентификации и количественного определения хитина благодаря его характерным спектральным особенностям. Характерные полосы поглощения хитина, такие, как колебания амидной или ацетильной групп позволяют однозначно идентифицировать хитин в биологических матрицах. ИК спектр поглощения хитина и хитозана приведен на Рис. 5.

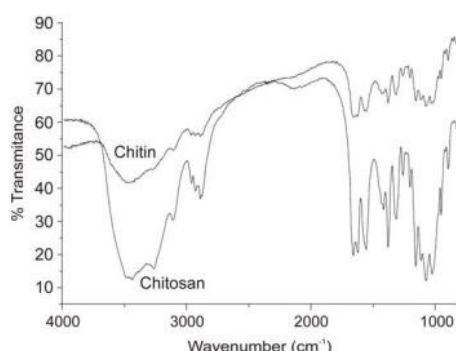


Рисунок 5. ИК-спектр хитина и хитозана, полученных из куколок тутового шелкопряда; диапазон 1400–1700 см⁻¹.

Интенсивность полос поглощения пропорциональна концентрации хитина, что позволяет делать расчет количественного содержания. Так же метод широко применим для определения структурных характеристик, таких, как степень деацетилирования [35,36]. Для регистрации спектров в режиме пропускания требуется суспензия твердых образцов, тогда как для режима нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) образец достаточно поместить непосредственно на кристаллическую призму приставки. Показано, что система НПВО обеспечивает лучшее разрешение пиков для сложных образцов с небольшим содержанием хитина.

ИК-Фурье спектроскопия может быть использована не только для определения очищенных образцов хитина, но и для ХСС с различным его содержанием, например, в различных видах кораллов [37,38]. Для образцов получены данные, не только подтверждающие наличие хитина, но и однозначно указывающие на образование в биологической матрице слоев, где цепи хитина были связаны прочными водородными связями между собой, что, в свою очередь, способствует более плотной пространственной упаковке молекулы хитина.

- Ядерный магнитный резонанс

Использование метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР) при исследовании структуры и свойств хитина дает исчерпывающую информацию. ЯМР позволяет установить и подтвердить химическое строение, степень конформации молекул, подтвердить чистоту образцов. Для исследования хитина одинаково полезны основные разновидности ЯМР, основанные на исследовании ядер водорода и углерода в магнитном поле.

Протонный ЯМР, или ПМР – как метод, фокусирующийся на исследовании ядер водорода, показал свою высокую эффективность в различении хитина от разнообразных образцов биологического происхождения. На рисунке 8 представлены ПМР образцов яичной скорлупы и стандартного образца хитина. Авторами работы [39] показано, что спектральные профили похожи, в обоих случаях присутствует пик, характерный для метильных протонов ацетамидной

группы N-ацелированных моносахаридов, таких, как N-ацетилглюкозамин.

Однако, существенным ограничением для использования метода ПМР является необходимость растворения образца в концентрированной дейтерированной соляной кислоте, которая, безусловно, приводит к разрушению молекулы полимера, а также требует длительного времени пробоподготовки.

^{13}C ЯМР спектроскопия позволяет производить структурный анализ хитина без разрушения молекулы полимера. Однако, требует предварительной очистки хитина от других биомолекул перед анализом. Эффективность данного метода подтверждена в идентификации хитина в различных биологических образцах, таких, как грибы [40], насекомые [41], и др [42].

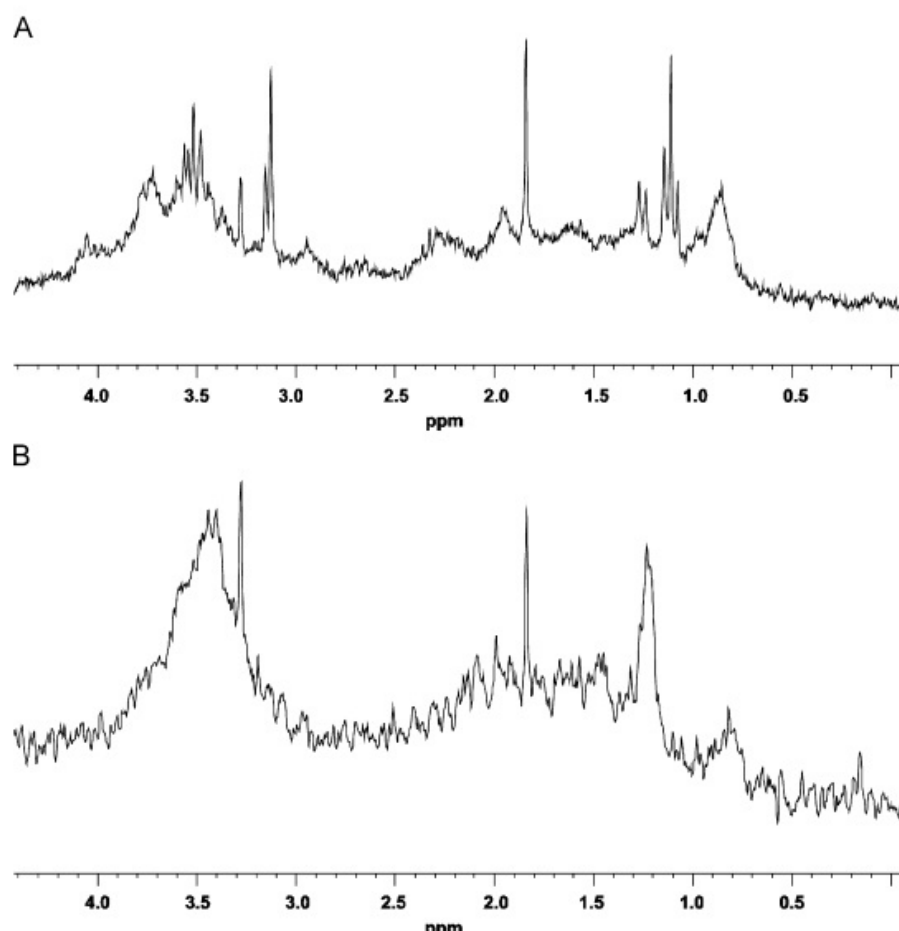


Рисунок 6. ПМР спектр яичной скорлупы А и стандартного образца хитина В.

- Колориметрические методы

Колориметрические методы определения хитина включают использование реагентов, которые вступают в реакцию с хитином или его производными, образуя окрашенные соединения, интенсивность окраски которых измеряется фотометрически для количественного измерения. Поскольку хитин, являясь биополимером, обладает весьма ограниченной растворимостью, применяют, как правило, косвенное определение хитина, а именно продуктов его гидролиза. Для превращения хитина в глюкозамин традиционно используется кислотный либо щелочной гидролиз. Принято считать, что гидролиз концентрированной соляной кислотой проходит наиболее полно, однако соляная кислота высокой концентрации может растворять и полисахариды клеточной стенки исследуемой матрицы, соответственно, для колориметрических методов щелочной гидролиз является предпочтительным.

Существуют различные подходы к колориметрическому определению N-глюкозамина. Среди них предложенные еще в 1933 году реакция, основанная на конденсации продуктов гидролиза с производными пиррола с образованием хромофоров [43].

Колориметрическое определение производных хитина не ограничено конечным количеством качественных реакций, и по сей день исследователями предлагаются новые методы [44]. Однако, в связи с тем, что используемые реагенты могут взаимодействовать с другими компонентами образца, крайне желательна предварительная очистка образца. Поскольку от чистоты определяемого хитина зависит, во многом, результат исследования, применение колориметрических методов в количественном анализе несколько ограничено.

2.1.4 Биохимические методы

- Ферментные методы

Ферментативная идентификация основывается на использовании специфичности хитолитических ферментов к расщеплению исключительно хитина. Хитаназный тест представляет собой ферментативную реакцию эндогидролиза связей, образующих полимерную молекулу хитина из D-

глюкозамина. Идентификация образующегося GlcN может быть использована для подтверждения наличия хитина в различных типах биоматериала [45], а также для подтверждения наличия хитаназы.

Перед стадией ферментативной обработки препарат необходимо тщательно гомогенизировать. В приготовленную тонкую суспензию либо коллоидный раствор добавляют раствор хитаназы, ход ферментативного гидролиза можно отслеживать с помощью оптической либо флуоресцентной микроскопии [46]. Совершенно очевидно, что ход ферментативного гидролиза можно отслеживать по накоплению в реакционной массе GlcN одним из вышеописанных методов.

Лектины – это белки неимунного происхождения, которые селективно связывают углеводороды и некоторые другие виды биополимеров. Существует группа растительных лектинов, называемых хитинсвязывающими, которая включает *Datura stramonium* (DSA), лектин *Lycopersicon esculentum* (LEL), митоген *Phytolacca americana* (PWM), лектин *Solanum tuberosum* (STL), агглютинин *Urtica dioica* (UDA), агглютинин зародышей пшеницы (WGA) и некоторые другие [47].

Для идентификации хитина эти белки необходимо конъюгировать с флуоресцентной меткой либо другим контрастным веществом. Так, WGA позволяет визуализировать локализацию хитина с помощью электронной микроскопии [48]. С другой стороны, хитинсвязывающие лектины могут связывать другие биополимеры. Например, известно, что WGA связывает сильно сиалилированные гликаны. Данный метод позволяет идентифицировать и количественно определять микроорганизмы, продуцирующие либо деградирующие хитин в водных системах с помощью флуоресцентной микроскопии. Недостатком данного метода является то, что WGA другие вещества.

2.1.5 Методы определения молекулярной массы

- Вискозиметрический метод

ММ и молекулярно-массовое распределение относятся к числу важнейших характеристик хитина. Вискозиметрический метод является наиболее простой и

доступный метод определения молекулярной массы полимеров в широкой области значений молекулярных масс. Для определения вязкости раствора полимера измеряют время истечения равных объемов растворителя и раствора образца через капилляр вискозиметра при заданной температуре. Метод пригоден для определения ММ хитозана и его олигомеров [49].

3. Идентификация типа ткани: современные методы и их сравнительная оценка.

Анализ пищевых продуктов является критически важным для верификации их аутентичности, что позволяет предотвратить инциденты, подобные скандалу с кониной в Европе. Более того, данный анализ способствует защите потребителей от продуктов, содержащих потенциально опасные ингредиенты, обусловленные медицинскими противопоказаниями, личными предпочтениями или религиозными и культурными табу [50].

Традиционные методы анализа пищевых продуктов включают иммуноферментные анализы на основе белков, твердофазные ИФА, тесты на основе полосок и культуральные методы для выявления микробного загрязнения. Несмотря на простоту и экономичность, ИФА белков подвержен ложноположительным результатам из-за перекрёстной реакции с нецелевыми белками, что обусловлено зависимостью от специфических антител к целевым тканям или видам [51] различать филогенетически близкие виды в образцах пищевых продуктов, а также не может выявлять видовую принадлежность, если тестируемые продукты не содержат целевую ткань. При анализе высокопереработанных продуктов иммуноанализы часто дают ложноотрицательные результаты вследствие денатурации белков при высоких температурах [52].

Согласно Shrestha et al. [53], уровни целевых белков значительно варьируются в различных тканях, что ограничивает возможности количественного анализа с использованием белковых ИФА.

Параллельно с ИФА развивался и метод ПЦР. Традиционная ПЦР представляет собой циклический процесс, состоящий из этапов денатурации, отжига праймеров и элонгации, в результате которых происходит экспоненциальное увеличение количества целевых нуклеотидных последовательностей после каждого цикла амплификации.

Измерение результатов ПЦР осуществляется с помощью графика амплификации, который демонстрирует динамику изменения интенсивности флуоресцентного сигнала в зависимости от номера цикла. Ключевым параметром на этом графике является точка пересечения (C_p), пороговый цикл (C_t) или цикл количественной оценки (C_q), представляющий собой дробное значение, соответствующее числу циклов, при котором амплифицированный продукт достигает уровня, превышающего фоновый шум и становящегося детектируемым.

Дробное значение C_p , C_t или C_q может быть использовано для абсолютной количественной оценки, основанной на известном количестве анализируемых мишеней, или для относительной количественной оценки, базирующейся на сравнении с эталонными образцами. Данный подход позволяет с высокой точностью и чувствительностью определять концентрацию целевых нуклеотидных последовательностей в исследуемых образцах, что делает ПЦР незаменимым инструментом в современном анализе пищевых продуктов [54].

В данной связи, ПЦР-РВ, представляющая собой высокочувствительный и экономически эффективный метод количественного определения специфических фрагментов ДНК в анализируемых образцах, демонстрирует значительную эффективность в обнаружении как случайных, так и преднамеренных контаминаций биологическими агентами. Этот метод, основанный на амплификации целевых последовательностей нуклеиновых кислот, позволяет не только выявлять наличие вида, но и количественно оценивать их концентрацию, что является критически важным для адекватной оценки рисков и разработки соответствующих мер по предотвращению непреднамеренной и намеренной подмены [55].

Таким образом, использование ПЦР-РВ в системе мониторинга и контроля качества пищевых продуктов представляет собой хорошее решение, способствующее повышению уровня безопасности и доверия к продовольственному обеспечению на глобальном уровне.

Интеграция нетрадиционных источников продовольственного сырья, которые ранее не были широко распространены в Российской Федерации, требует разработки комплексной системы оценки безопасности пищевых продуктов нового типа. Также необходимо создать эффективные механизмы контроля за их оборотом на продовольственном рынке. Многолетний мировой и отечественный опыт мониторинга генно-инженерно-модифицированных продуктов питания показывает, что метод ПЦР-РВ является наиболее целесообразным инструментом для создания системы контроля за продуктами, полученными с использованием насекомых.

ПЦР-РВ, также известная как количественная ПЦР, представляет собой высокочувствительный и специфический метод молекулярной биологии, позволяющий амплифицировать и детектировать специфические фрагменты ДНК или РНК с высокой степенью точности. Этот метод обладает рядом преимуществ, делающих его предпочтительным выбором для идентификации типа ткани.

Во-первых, ПЦР-РВ позволяет проводить анализ на уровне отдельных клеток, что обеспечивает высокую разрешающую способность и точность результатов. Во-вторых, метод обладает высокой чувствительностью, что позволяет детектировать даже минимальные количества целевой последовательности ДНК или РНК, присутствующей в образце. В-третьих, ПЦР-РВ позволяет проводить количественный анализ, что особенно важно для оценки содержания различных типов тканей в сложных биологических образцах.

Кроме того, ПЦР-РВ отличается высокой скоростью проведения анализа, что позволяет существенно сократить время, необходимое для получения результатов. Это особенно важно в условиях, когда требуется оперативная

идентификация типа ткани, например, в медицинских исследованиях или в производстве высокотехнологичных материалов.

Таким образом, метод ПЦР-РВ является наиболее достоверным и точным инструментом для идентификации типа ткани благодаря своей высокой чувствительности, специфичности, разрешающей способности и скорости проведения анализа.

В последние два десятилетия наблюдается значительный рост публикаций, посвященных различным аспектам применения полимеразной цепной реакции (ПЦР) для анализа пищевых продуктов. Это свидетельствует о возрастающем интересе к данному методу и его все более широком использовании в данной области. Авторами [56] рассмотрено применение ПЦР-РВ по технологии TaqMan – это высокоточный молекулярно-генетический метод с высокой специфичностью, чувствительностью и воспроизводимостью. Он позволяет выявлять целевые последовательности ДНК (ДНК-мишени) даже в сложных матрицах, таких как многокомпонентные и технологически обработанные пищевые продукты, в которых присутствуют единичные копии ДНК. Таким образом, TaqMan-ПЦР обеспечивает надежное и эффективное средство для идентификации и контроля за новыми видами продуктов, что критически важно для обеспечения безопасности и качества продовольственного снабжения.

В условиях современного научного прогресса и технологического развития методы идентификации типа ткани играют ключевую роль в различных отраслях промышленности, медицины и биотехнологии. Среди множества подходов, применяемых для этой цели, метод ПЦР-РВ выделяется как наиболее достоверный и точный инструмент.

3.1 Международный опыт по применению муки из сверчков в готовой продукции

3 января 2023 года ЕС принял закон (Implementing Regulation (EU) 2017/2470) [57], позволяющий использовать порошок из домашних сверчков (*Acheta domesticus*) в качестве ингредиента в самых разных продуктах питания.

Инициатива, предложенная компанией Cricket One Co. Ltd, специализирующейся на разведении сверчков, вызвала неоднозначную реакцию в обществе и среди экспертов.

Постановление ЕС охватывает широкий спектр продуктов от хлебобулочных изделий, таких как мультислаковый хлеб, булочки, крекеры и злаковые батончики, до пиццы, полуфабрикатов из картофеля, супов, соусов, шоколада, орехов и даже пива. В список также включены продукты, имитирующие мясо, которые по своим вкусовым и текстурным характеристикам приближены к традиционным мясным изделиям.

Однако включение в этот список аналогов мяса вызвало особую обеспокоенность у представителей веганской и вегетарианской общественности. Тим Де Смет, менеджер по международным коммуникациям V-Label, ведущей мировой торговой марки для веганов и вегетарианцев, считает, что это решение может подорвать доверие потребителей. По его словам, продукты, позиционируемые как аналоги мяса, могут содержать муку из сверчков без явных указаний на это, что может ввести потребителей в заблуждение.

Новые правила ЕС относительно использования насекомых не требуют особой маркировки, если нет прямых доказательств аллергии на сверчков. Это означает, что потребители вынуждены самостоятельно проверять списки ингредиентов, чтобы выяснить, содержат ли продукты порошок из насекомых.

Для сравнения, в июне 2021 года компания SAS EAP Group получила разрешение на продажу сушёных жёлтых мучных червей (*Tenebrio molitor*) без особых требований к маркировке, при этом было зарегистрировано несколько случаев аллергии. Аналогичные разрешения получили компании Fair Insects B.V. и другие.

Опросы показывают, что большинство людей не готовы пробовать насекомых в пищу. Согласно исследованию Агентства по пищевым стандартам, 67% респондентов заявили, что ничто не заставит их попробовать съедобных насекомых. Лишь 13% согласились бы на это при условии, что насекомые безопасны, а 11% - если они будут выглядеть аппетитно [58].

Неприятие конечным потребителем новых видов источника белка остаются серьёзными препятствиями для популяризации продуктов с насекомыми. Несмотря на экологические преимущества, такие как снижение углеродного следа, многие потребители не готовы изменить свои пищевые привычки.

3.2 Методы идентификации видов насекомых для применения в пищевой промышленности

В зависимости от типа анализируемого вещества метод можно классифицировать как анализ белков/пептидов, сахаридов, других метаболитов и нуклеиновых кислот. Каждая из этих категорий имеет свои преимущества и подходит для различных аналитических целей в зависимости от требований конкретного применения, наличия времени и ресурсов лаборатории, будь то финансовые, кадровые или технологические ресурсы. Помимо этих целевых анализов, используются методы, направленные на обнаружение тел насекомых или их частей с помощью микроскопического анализа. Например, протокол выделения и обнаружения насекомых в кормах для водных животных, основанный на осаждении неполярными растворителями для концентрирования частиц тела насекомых в сочетании со световой микроскопией, позволил успешно идентифицировать фрагменты тела насекомых *H. illucens*, *T. molitor*, *G. assimilis* и *A. diaperinus* [59]. Также используются гистохимические методы; например, *A. domesticus* и *T. molitor* были успешно обнаружены в батончиках [60].

3.2.1 Белки как объекты анализа

К методам идентификации белков относятся такие методы, как масс-спектрометрия и электрофорез, которые позволяют проводить как целенаправленный анализ конкретных белков, так и нецеленаправленное профилирование белков в целом. Масс-спектрометрия всё чаще используется для обнаружения следовых количеств белков и пептидов в продуктах питания. Эти молекулы относительно стабильны при обработке, хотя для анализа могут потребоваться сложные методы разделения белков. Решающее значение для

повышения точности обнаружения имеет расширение базы данных о белках и пептидах съедобных насекомых [61]. В работе Фрэнсиса и др. [62] с помощью жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии был проведён протеомный анализ четырёх видов съедобных насекомых - *T. molitor*, *H. illucens*, *A. diaperinus* и *G. assimilis*. Хотя анализ дал воспроизводимые результаты, эффективность идентификации у разных видов была разной. *T. molitor* и *G. assimilis* были идентифицированы точно, в то время как *H. illucens* идентифицировать достоверно не удалось [61-63].

Антигены могут иметь различную химическую структуру, чаще всего это белки, в том числе гликопротеины или липопротеины, а также полисахариды, которые часто выявляют с помощью иммунохимических методов, таких как ИФА и иммуноблоттинг. В исследовании Karnaneedi et al. электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) и иммуноблоттинг с аллергенспецифическими антителами и сыворотками от пациентов с аллергией на ракообразных использовались для мониторинга потенциальных аллергенов у двух видов насекомых: домашнего сверчка (*A. domesticus*) и черной мухи-солдатика (*H. illucens*). Исследование выявило перекрестную реактивность специфичных для креветок антител к тропомиозину от обоих видов насекомых, что указывает на значительное сходство последовательности и структуры между креветками и насекомыми. Кроме того, у обоих видов были выявлены уникальные аллергены, в том числе гемоцианин, вителлогенин, HSP20, аполипофорин-III и хитинсвязывающий белок, что подчёркивает их аллергенный потенциал [64].

Иммунохимические тесты в основном используются для сравнения аллергенности съедобных видов насекомых в Азии с известными аллергенами. Они реже применяются для специфического анализа отдельных видов с целью выявления уникальных аллергенов, как это было сделано для тутового шелкопряда. Чсон и др. [65] выявили гемолимфатический гликопротеин с молекулярной массой 27 кДа как термостабильный компонент, связывающий IgE, в образцах сыворотки пациентов с аллергией на тутового шелкопряда.

Аналогичным образом Лю и др. [66] использовали вестерн-блоттинг и иммуноферментный анализ для выявления *V. mori* аргининкиназы в качестве основного аллергена. Сыворотки всех десяти протестированных пациентов реагировали на белок массой 42 кДа и неочищенный экстракт тутового шелкопряда. Кроме того, *V. mori* аргининкиназа проявляет перекрестную реактивность с аргининкиназой таракана. Однако для оценки более широкой применимости этого подхода требуются дальнейшие крупномасштабные исследования [65,66]. Коммерческих наборов ELISA для обнаружения насекомых по-прежнему мало на мировом рынке, при этом большинство доступных анализов нацелены на конкретных насекомых-вредителей или аллергены, такие как постельные клопы (*Cimicidae*) или клещи (*Acari*).

3.2.2 Полисахаридные мишени для обнаружения насекомых

Недавно были разработаны инновационные методы специфического обнаружения N-ацетилглюкозамина в хитине и хитозановых полимерах, полученных из отдельных видов насекомых, употребляемых в пищу. Один из таких методов - непрямой сэндвич-анализ с использованием лектинов, связанных с ферментами (ELLA), с агглютинином зародышей пшеницы (WGA), который обладает высокой специфичностью в отношении N-ацетилглюкозамина [67]. Кроме того, с помощью ВЭЖХ был успешно проанализирован углеводный состав личинок мучного хрущака [68].

3.2.3 Метаболиты

Анализ метаболитов направлен на идентификацию малых молекул (<1500 Да), характерных для определённых видов или субстратов. Метаболомика и нецелевой скрининг (NTS) стали мощными инструментами в пищевой науке, в значительной степени опирающимися на передовые аналитические платформы, такие как ГХ и жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения. Эти методы позволяют проводить как целевой, так и нецелевой анализ, часто генерируя молекулярные паттерны без обязательной идентификации или количественного определения конкретных соединений. Они полезны для идентификации видов насекомых, контроля за использованием

запрещённых кормовых субстратов (например, побочных продуктов животноводства) и обнаружения загрязняющих веществ или остатков в продуктах, полученных из насекомых. Хотя эти методы в настоящее время разрабатываются для выявления съедобных насекомых, в будущем их можно будет использовать, например, в качестве метода скрининга благодаря их высокой пропускной способности [69, 70].

Пома и др. [69] обсудили использование метаболомики и неинвазивной токсикологии в традиционных системах питания и рассмотрели стратегии адаптации и внедрения энтометаболомики - применения метаболомики и неинвазивной токсикологии к съедобным насекомым в анализе продуктов питания. С помощью прямого анализа в режиме реального времени с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения (DART-HRMS) удалось различить четыре вида насекомых, каждый из которых имеет уникальный метаболический «отпечаток». *V. mori* характеризовался высоким содержанием линоленовой и хинной кислот, в то время как *H. illucens* отличался преобладанием пальмитиновой и олеиновой кислот. Хемометрический анализ показал, что пролин является ключевой молекулой, отличающей *T. molitor*, а пальмитиновая и линолевая кислоты - наиболее информативными молекулярными характеристиками *A. domesticus* [57, 69].

3.2.4 ДНК как маркер для обнаружения

Методы, основанные на анализе ДНК, включая ПЦР, изотермическую амплификацию и современные технологии, такие как секвенирование нового поколения (NGS), обеспечивают высокую специфичность и точность. Эти методы могут быть использованы для точной идентификации видов насекомых или обнаружения нецелевых видов. Благодаря своей высокой чувствительности и точности, они идеально подходят для контроля со стороны регуляторных органов, а также для обеспечения безопасности пищевых продуктов и кормов. Выбор подходящего метода зависит от конкретных требований к анализу, таких как необходимость рутинного скрининга или проведения более глубокого

исследовательского анализа. Для достижения наиболее точных и надежных результатов рекомендуется использовать комбинацию нескольких методов.

Методы, основанные на анализе нуклеиновых кислот, предлагают широкий спектр проверенных протоколов, подходящих для рутинного анализа. Законодательство многих стран требует точной идентификации видов для предотвращения включения в состав продукции запрещенных, аллергенных или чужеродных видов, которые могут представлять угрозу для здоровья или вводить потребителя в заблуждение. Таким образом, надежные и проверенные молекулярные инструменты, основанные на анализе целевой ДНК, такие как точная ПЦР-амплификация или анализ ДНК-баркодинг, включая секвенирование, играют важную роль в обеспечении соблюдения нормативно-правовых требований, прозрачности рынка и защите прав потребителей.

3.3 Анализ ДНК насекомых

В настоящее время для аутентификации продуктов питания обычно используется ПЦР амплификация определенных фрагментов ДНК. Кроме того, набирают популярность технологии секвенирования, в том числе секвенирование по методу Сэнгера выбранных ампликонов (т. е. ДНК-штрихкодирование) и высокопроизводительное массовое параллельное секвенирование всей ДНК в образце (меташтрихкодирование) [70-74].

Использование ПЦР-методологии для анализа ДНК насекомых

Все три поколения ПЦР - традиционная ПЦР с конечной точкой (пер-вое поколение), количественная ПЦР в реальном времени (кПЦР; второе поколение) и цифровая ПЦР (цПЦР; третье поколение) - в настоящее время применяются как в одноплексном, так и в мультиплексном формате для выявления видов насекомых в продуктах питания и кормах [75-79]. Методы на основе ПЦР нацелены на митохондриальные (мтДНК) или ядерные (ядДНК) генетические маркеры для идентификации видов насекомых, используемых в пищу и в качестве корма, с применением установленных и проверенных протоколов.

В качестве митохондриальных маркеров используются цитохром b (cyt b), цитохромоксидаза I (COI), NADH-дегидрогеназа и 16S рДНК насекомых. Что касается маркеров геномной ДНК (ядНК) – это, например, ген, кодирующий кадгерин и 18S рДНК. [72-75, 80-86].

Выбор подходящего ДНК-маркера – непростая задача, особенно для сильно обработанных матриц или количественных исследований. Более короткие ампликоны позволяют проводить ПЦР-анализ обработанных пищевых продуктов (в которых ДНК фрагментирована), а маркеры мтДНК обычно предпочтительнее из-за их большего количества. Однако несмотря на то, что мтДНК обеспечивает более высокую чувствительность и специфичность, переменное количество копий ограничивает её надёжность при количественном анализе [76,87-89].

кПЦР остается предпочтительным методом идентификации пищевых продуктов и видов благодаря его высокому уровню специфичности, чувствительности и воспроизводимости. Тем не менее, точное количественное определение содержания насекомых в пище или кормах с использованием кПЦР или цПЦР является сложной задачей, поскольку результаты обычно выражаются в соотношениях ДНК к ДНК, которые напрямую не коррелируют с фактической массовой долей целевых видов. Например, определение количества сверчка в макаронных изделиях, приготовленных с применением муки из сверчков, требует преобразования измерений на основе ДНК в отношение массы к массе. Чтобы обеспечить возможность таких преобразований, при разработке метода необходимо использовать эталонные смеси с известным составом (например, с гравиметрически определёнными массовыми соотношениями) для установления надёжных поправочных коэффициентов. Хотя такие эталонные материалы хорошо зарекомендовали себя при количественном определении ГМО и доступны для некоторых продуктов на основе мяса (например, колбас), сертифицированных эталонных материалов для продуктов на основе насекомых в настоящее время нет.

Штрихкодирование ДНК насекомых

Штрихкодирование ДНК – это молекулярный метод, используемый для идентификации и дифференциации видов на основе знания первичной последовательности короткого стандартизированного участка их ДНК. Выбранный участок ДНК амплифицируется с помощью ПЦР, после чего проводится секвенирование и сравнение первичной последовательности с базой данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) или Barcode of Life Data System (BOLD) [90-92]. Цель метода, известного как стандартное ДНК-баркодирование, – идентифицировать конкретный организм на основе первичной последовательности ДНК характерного участка генома (так называемого «ДНК-баркода»). Обычно для этого используется секвенирование по методу Сэнгера. Метабаркодирование, напротив, направлено на идентификацию целых сообществ организмов, присутствующих в образце, путем анализа всей извлеченной ДНК.

Метабаркодирование основано на том же базовом принципе – знании первичной последовательности ДНК-штрихкода. Однако оно предполагает одновременный анализ видового разнообразия многокомпонентной продукции. Консервативный участок генома амплифицируется с помощью ПЦР, а затем секвенируется с помощью NGS, что позволяет проводить высокопроизводительную идентификацию множества таксонов в одном образце. Таким образом, метабаркодирование позволяет охарактеризовать множество биологических видов, присутствующих в данном образце [74,93].

Штрихкодирование ДНК насекомых с помощью секвенирования по Сэнгеру

Штрихкодирование ДНК с помощью секвенирования Сэнгера широко используется в пищевой промышленности, например, для идентификации источника материала в рыбных продуктах, продуктах позвоночных, пищевых продуктах и готовых блюдах в ресторанах [76,94,95]. Например, последовательность COI была успешно использована для мониторинга образцов с рынка, которые были амплифицированы и секвенированы с использованием различных комбинаций праймеров, и полученные последовательности были сравнены с эталонными последовательностями в базах данных (GenBank, BOLD) в работе

Siozios et al. [94,83]. Кроме того, различные фрагменты COI (длиной около 760 п.н.) были использованы для дифференцировки между *A. diaperinus* и *Alphitobius laevigatus* [83]. Вопрос в том, будут ли фрагменты такой длины успешно обнаружены в обработанных пищевых продуктах.

Митохондриальные маркеры очень удобны для штрихкодирования из-за меньшего размера мтДНК (то есть более высокой стабильности в технологических процессах, используемых при приготовлении пищи), её кольцевой структуры и более высокой распространённости в клетках. Однако недостатком по-прежнему является небольшое количество аннотированных эталонных последовательностей насекомых, доступных в базах данных, хотя в последнее время наблюдается стремительный прогресс и последовательности постоянно добавляются. Кроме того, обнаружение ДНК в обработанных пищевых продуктах или кормах происходит лучше, если используются мишени длиной менее 250 пар оснований [85,96,97]. Штрихкодирование ДНК с использованием митохондриальных маркеров также было протестировано и показало свою эффективность при идентификации насекомых-вредителей. Этот метод секвенирования был применён к представителям 19 отрядов насекомых, включающим более 190 видов, отобранный из списков вредителей, составленных учреждениями, занимающимися исследованиями в области безопасности пищевых продуктов и борьбы с вредителями [98]. Была использована комбинация из двух маркеров COI и маркера 16S рРНК, каждый из которых имеет длину менее 200 пар оснований. Эти короткие маркеры позволили успешно идентифицировать виды даже в образцах, подвергшихся термической обработке при температуре 118 °С в течение 18 минут. Чтобы оценить практическую эффективность метода, были протестированы 38 видов насекомых из семи таксономических отрядов: двукрылые, сенокосы, таракановые, жесткокрылые, полужесткокрылые, веерокрылые и чешуекрылые. Метод успешно позволил выявить насекомых, используемых в качестве корма, например обыкновенную комнатную муху. ДНК из всех образцов была успешно амплифицирована и секвенирована, а полученные ДНК-штрихкоды совпали с

морфологической идентификацией в 89 % случаев. В нескольких случаях идентичность последовательности ДНК составляла менее 95 %, в основном из-за отсутствия соответствующих эталонных последовательностей в общедоступных базах данных, таких как GenBank. Одним из примечательных примеров был образец чёрного коврового жука (*Attagenus unicolor japonicus*), который совпал с восточной чешуйницей (*Ctenolepisma villosa*) на 97 %. Это несоответствие, вероятно, было вызвано неправильной маркировкой записи в базе данных GenBank; рассматриваемая последовательность может на самом деле принадлежать виду *Attagenus* [98].

Это затрудняет выбор последовательности для ДНК-штрихкодирования, которая была бы консервативной в области связывания праймеров, но достаточно вариативной в последовательности, ограниченной этими праймерами, чтобы её можно было использовать для точной идентификации видов. Ещё одним ограничением является непригодность этого метода для анализа многовидовых образцов. По этой причине ПЦР в реальном времени остаётся эталонным методом идентификации видов в продуктах питания и кормах [76, 85, 94,96].

Штрихкодирование ДНК может быть эффективным в тех случаях, когда видоспецифичные системы ПЦР не могут амплифицировать целевую последовательность, но неспецифичные системы (нацеленные на другой участок ДНК) подтверждают наличие ДНК насекомого. В таких случаях ампликон, полученный от неизвестного вида, можно секвенировать напрямую или подвергнуть дополнительной ПЦР-амплификации с использованием праймеров для штрихкодирования. В литературе представлен широкий спектр праймеров для штрихкодирования, что позволяет выбирать конкретные сегменты и длину ампликона. Более длинные ампликоны, как правило, повышают точность определения вида. Однако в технологически обработанных продуктах питания и кормах обширная фрагментация ДНК может потребовать амплификации более коротких фрагментов. В случаях, когда ДНК только одного вида является

матрицей для полученного ампликона, поиск с помощью BLAST может точно определить соответствующий вид насекомых [73,76].

Несмотря на значительный прогресс в методах анализа съедобных и кормовых насекомых, количество выявляемых видов остаётся ограниченным из-за нехватки подходящих методов обнаружения. Кроме того, для многих неодобренных видов насекомых, даже тех, чьи ДНК-последовательности известны и внесены в базы данных, не существует надёжных методов обнаружения на основе ПЦР.

Метабаркодинг ДНК насекомых

Метабаркодирование ДНК с использованием метода массового параллельного секвенирования даёт ключевое преимущество, позволяя одновременно идентифицировать несколько видов насекомых с помощью одного аналитического подхода [73,99]. В исследовании Хиллингера и др. [74] метабаркодирование ДНК проводилось с использованием фрагмента митохондриальной 16S рДНК длиной 200 пар оснований, который секвенировался на платформах Illumina. Этот подход оказался эффективным для идентификации более 1000 видов насекомых. Кроме того, была разработана новая универсальная пара праймеров для мтДНК для одноплексного ПЦР-анализа, что повысило точность и применимость метода обнаружения насекомых [74]. Гуисти и др. [100] использовали метабаркодирование участка гена 16S рРНК длиной 200 пар оснований для аутентификации 46 переработанных продуктов на основе насекомых. Анализ показал высокий процент ошибочной маркировки (33 %), на который повлияли платформа электронной коммерции и вид насекомых, в частности *A. domesticus*. Также была выявлена частичная замена ценных видов менее ценными, а также наличие насекомых-вредителей.

Ограничивающим фактором для широкого применения методов метабаркодирования является отсутствие оборудования для секвенирования во многих лабораториях, а также нехватка вычислительных ресурсов, необходимых для обработки больших массивов данных. Кроме того, ощущается нехватка

квалифицированных специалистов в области биоинформатики, а в базах данных последовательностей, особенно для видов насекомых, есть пробелы. Затраты на анализ методом NGS можно существенно снизить, если интегрировать различные приложения в один цикл секвенирования, например совместное секвенирование растений, животных или бактерий. Эта стратегия может побудить большее число лабораторий, особенно тех, которые регулярно анализируют большое количество образцов, инвестировать в оборудование для секвенирования и внедрять методы метабаркодирования [74].

Метабаркодирование ампликона, которое включает высокопроизводительное секвенирование таксономически информативных генетических маркеров, таких как гены COI или 16S рРНК, стало широко используемым подходом для определения видового состава сложных биологических образцов, включая пищевые продукты на основе насекомых [101,102]. Несмотря на свою популярность, этот метод подвержен ошибкам, возникающим на этапе ПЦР-амплификации. Эти погрешности ПЦР обусловлены различиями в аффинности связывания праймера и доступности матрицы, что приводит к неравномерной амплификации целевых последовательностей. Следовательно, это может исказить представление о видах, особенно в образцах, содержащих как распространённые, так и редкие таксоны. Элбрехт и Лиз (2015) [103] наглядно продемонстрировали, что использование универсальных праймеров при метабаркодинге часто приводит к чрезмерному представлению определённых таксонов, что затрудняет точную количественную оценку и даже обнаружение малочисленных видов.

4. Заключение по литературному обзору.

В качестве объекта исследования был выбран домашний сверчок (*Acheta domesticus*, подотряд *Orthoptera*, семейство *Gryllidae*), который представляет собой съедобное насекомое с высоким содержанием питательных веществ. Согласно данным научных исследований, сухая масса домашнего сверчка содержит от 49% до 68% белка, от 8% до 29% жира и от 11% до 26% углеводов [104].

Следует отметить, что домашний сверчок разрешён к употреблению в пищу человеком в странах Европейского Союза [57], что свидетельствует о его безопасности и пригодности для использования в качестве пищевого продукта. В последние годы наблюдается значительный интерес к изучению возможностей применения *Acheta domesticus* в качестве ингредиента в различных продуктах питания. Это обусловлено его высоким содержанием белка, который является ключевым компонентом для поддержания мышечной массы и общего здоровья.

Исследования в данной области активно проводятся как на национальном, так и на международном уровнях, что подчёркивает актуальность и значимость данной темы для современной науки и пищевой промышленности [105,106].

Учитывая критическую необходимость строгого контроля за обращением продукции нового типа, полученной из насекомых, особенно в контексте отсутствия валидированных методов ПЦР для ее детекции в пищевых продуктах, представляется целесообразным и необходимым разработать и апробировать протокол анализа, направленный на обнаружение и идентификацию таксон-специфичной ДНК насекомого *Acheta domesticus* в составе пищевых матриц. Данный подход позволит обеспечить высокую точность и надежность выявления потенциального контаминанта, что является ключевым фактором для поддержания высокого уровня безопасности пищевых продуктов и соблюдения регуляторных требований.

Следует также отметить, что в контексте возможного аллергического ответа на продукцию, произведенную из сырья или белка, содержащего хитиновые компоненты, необходимо провести тщательный анализ. Согласно различным источникам, содержание хитина в таких продуктах может достигать до 30% [107], что может представлять потенциальный риск для лиц с повышенной чувствительностью к данному полисахариду.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Материалы для исследований

2.1.1 Биомасса из сверчка домашнего (*Acheta Domesticus*, ОНТО (Россия)).

Способ сушки сырья: конвекционная сушка при 40 ° С. Способ обезжиривания: трёхкратное обезжиривание гексаном с последующим удалением растворителя. Упаковка продукта: вакуумирование (**Приложение 1**, Акт лабораторной выработки выработки), выработанная по ТУ 10.8-001-85266047-2023.

2.1.2 Белок из сверчка домашнего (*Acheta Domesticus*, полученный из п.2.2.1).

Способ сушки сырья: конвекционная сушка при 40 ° С. способ обезжиривания: трёхкратное обезжиривание гексаном с последующим удалением растворителя. Способ выделения белка: щелочная экстракция (**Приложение 2**, Акт лабораторной выработки). СТО ВНИИПД- филиал «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН.

2.1.3 Сверчковая мука из сверчка домашнего (*Acheta Domesticus*), выработанная по ТУ 10.8-001-85266047-2023 (ЕАЭС N RU Д-RU.РА04.В.09546/23).

2.1.4 Сверчковая мука из сверчка домашнего (*Acheta Domesticus*), производство Bugvita (Великобритания).

2.2 Методы исследований

Для исследования использовали общепринятое лабораторное оборудование в соответствии с требованиями нижеуказанных стандартов:

- ГОСТ Р 54951-2012 (ИСО 6496:1999) Корма для животных. Определение содержания влаги
- ГОСТ 13496.15-2016 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения массовой доли сырого жира (с Поправкой)
- ГОСТ 32044.1-2012 (ISO 5983-1:2005) Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение массовой доли азота и вычисление массовой доли сырого протеина. Часть 1. Метод Къельдаля (Переиздание)
- ГОСТ 32933-2014 (ISO 5984:2002) Корма, комбикорма. Метод определения содержания сырой золы (Переиздание)

- ГОСТ Р 53183-2008 (ЕН 13806:2002) Продукты пищевые. Определение следовых элементов. Определение ртути методом атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара с предварительной минерализацией пробы под давлением
- Методические указания по лабораторному контролю качества продукции общественного питания "Порядок отбора проб и физико-химические методы испытаний" (одобрены Министерством здравоохранения СССР 23 октября 1991 г. № 122-5/72) (рекомендованы Министерством торговли СССР 11 ноября 1991 г. № 1-40/3805) (определение углеводов)
- ГОСТ 30178-96 Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов (свинец, кадмий)
- ГОСТ 31266-2004 Сырьё и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения мышьяка
- ГОСТ 34361-2017 Продукты пищевые, продовольственное сырьё, корма для животных. Определение содержания кадмия, свинца, мышьяка, ртути, хрома атомно-абсорбционным методом с электротермической атомизацией
- ГОСТ 10444.15-94 Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ)
- ГОСТ 32064-2013 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий семейства Enterobacteriaceae
- ГОСТ 31878-2012 Корма для животных. Метод обнаружения и подсчета бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий). Метод наиболее вероятного числа (Переиздание)
- ГОСТ 31746-2012 (ISO 6888-1:1999, ISO 6888-2:1999, ISO 6888-3:2003) Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus* (с Поправками)
- ГОСТ 34132-2017 Мясо и мясные продукты. Метод определения аминокислотного состава животного белка
- ГОСТ 23041-2015 Мясо и продукты мясные. Метод определения оксипролина

- МИ 103.5-105-2011 Мясо и мясные продукты. Определение триптофана методом флуоресценции
- ГОСТ 13496.20-2014 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Метод определения остаточных количеств пестицидов (Издание с Изменением N 1)
- ГОСТ 33780-2016 Продукты пищевые, корма, комбикорма. Определение содержания афлатоксина В1 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением очистки на оксиде алюминия
- ГОСТ 34108-2017 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение содержания микотоксинов прямым твердофазным конкурентным иммуноферментным методом (с Изменением N 1) (Т2 токсин, зеараленон, фумозин)
- ГОСТ 32163-2013 Продукты пищевые. Метод определения содержания стронция Sr-90 (Переиздание)
- ГОСТ 32161-2013 Продукты пищевые. Метод определения содержания цезия Cs-137 (Переиздание, с Поправкой)

Согласно Инструкции СМ НИИЦ И-1-9 «Валидация методик идентификации, измерений, испытаний», вышеуказанные стандартные методики были подвергнуты процедуре валидации с целью расширения области применения на анализируемые объекты настоящей НИР. Валидация микробиологических методов проводилась на основании [108].

Работы по валидации методик, применяемых в НИИЦ, проводятся непосредственно после разработки методики в НИИЦ, или после приобретения методики в соответствии с ДП НИИЦ – 004 (первоначальная валидация или валидация при внедрении), а также, при необходимости, в процессе эксплуатации в НИИЦ, с целью расширения области применения методики. Процедура первоначальной валидации призвана продемонстрировать, что метод пригоден для конкретной цели. Процедура сокращенной валидации применяется в отношении метода, подвергнутого валидации ранее, и позволяет продемонстрировать, насколько надежно работает методика.

Глава 3. Результаты исследований

3.1 Проведение оценки пищевой ценности и безопасности продовольственного сырья, полученного с использованием насекомых

3.1.1 Оценка пищевой ценности продовольственного сырья, полученного с использованием насекомых

Оценка пищевой ценности продовольственного сырья, полученного с использованием насекомых (объект исследований – биомасса *Acheta Domesticus*; изучаемые показатели: содержание белка, жира, углеводов, влаги, золы), представлена в **Приложение 3**:

- протоколы исследования биомассы сверчка (сверчковая мука) на базе лаб.№241 УНИИМ–филиала ФГУП Д.И. Менделеева (г.Екатеринбург) о прослеживаемости к ГВЭТ 176-1-2010 по массовой доли азота (белка) (Протокол №254-241/2025 от 25.09.2025) и о прослеживаемости к ГЭТ 173-2017 массовой доли влаги сверчка (Протокол №253-241/2025 от 25.09.2025);

- протокол исследования аккредитованного центра ВНИТЕК–филиала «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН – по определению белка (Протокол испытаний №1355 от 12.08.2025);

- заключение НИИЦ ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН по определению содержания белка, жира, углеводов, влаги, золы (Заключение №1992/1 от 13.10.2025).

3.1.2 Оценка безопасности продовольственного сырья, полученного с использованием насекомых

Оценка безопасности продовольственного сырья, полученного с использованием насекомых (объект исследований – биомасса *Acheta Domesticus*; изучаемые показатели: содержание токсичных элементов – свинца, кадмия, ртути, мышьяка, хрома; содержание пестицидов – ДДТ и его метаболитов, ГХЦГ (сумма изомеров); содержание микотоксинов – афлатоксина В1, Т-2 токсина, зеараленона, фумонизина; содержание радионуклидов – цезия-137, стронция-90;

микробиологические показатели безопасности – КМАФАнМ, БГКП, бактерии семейства Enterobacteriaceae, коагулазоположительные стафилококки и *S. aureus*.

Приложение 4 (Заключение №1992/2 от 13.10.2025).

3.1.3 Проведение оценки безопасности белка, содержащегося в продовольственном сырье, полученном с использованием насекомых

Проведение оценки безопасности белка, содержащегося в продовольственном сырье, полученном с использованием насекомых (объект исследований – концентрат белка, выделенного из *Acheta Domesticus*; изучаемые показатели: содержание токсичных элементов – свинца, кадмия, ртути, мышьяка, хрома; содержание пестицидов – ДДТ и его метаболитов, ГХЦГ (сумма изомеров); содержание микотоксинов – афлатоксина В1, Т-2 токсина, зеараленона, фумонизина; содержание радионуклидов – цезия-137, стронция-90; микробиологические показатели безопасности –КМАФАнМ, БГКП, бактерии семейства Enterobacteriaceae, коагулазоположительные стафилококки и *S. aureus*.

Приложение 5. (Заключение №1992/3 от 13.10.2025).

3.1.4 Проведение оценки биологической ценности и усвояемости белка, содержащегося в продовольственном сырье, полученном с использованием насекомых

Проведение оценки биологической ценности и усвояемости белка, содержащегося в продовольственном сырье, полученном с использованием насекомых (объект исследований – концентрат белка, выделенного из *Acheta Domesticus*; изучаемые показатели: аминокислотный состав, расчет незаменимых аминокислот-аминокислотный скор (АС)). **Приложение 6** (Заключение №1992/4 от 13.10.2025).

Рассчитанный аминокислотный СКОР показал, что лимитирующей аминокислотой определена аминокислота – цистин. Коэффициент различия аминокислотного СКОРа (КРАС,%) показывает среднюю величину избытка аминокислотного СКОРа незаменимых аминокислот по сравнению с наименьшим уровнем СКОРа какой-либо незаменимой аминокислоты. Таким образом, КРАС

показывает избыточное количество незаменимых аминокислот, которые не используются на пластические нужды организма.

Таблица 1. Расчет аминокислотного сора (КРАС) и биологической ценности (БЦ)

Аминокислота	Содержание в белке сверчка (мг/г белка)	Эталон (мг/г белка)*	Аминокислотный скор (%)
Валин	33.78	50	$(33.78/50)*100 = 67.6$
Изолейцин	28.33	40	$(28.33/40)*100 = 70.8$
Лейцин	92.07	70	$(92.07/70)*100 = 131.5$
Лизин	67.48	55	$(67.48/55)*100 = 122.7$
Мет+Цис	$22.05 + 3.73 = 25.78$	35	$(25.78/35)*100 = 73.7$
Треонин	41.73	40	$(41.73/40)*100 = 104.3$
Триптофан	17.65	10	$(17.65/10)*100 = 176.5$
Фен+Тир	$46.04 + 63.81 = 109.85$	60	$(109.85/60)*100 = 183.1$

*Используем эталонный аминокислотный состав ФАО/ВОЗ для сравнения.

Аминокислотный скор (КРАС):

- Валин: 67.6%
- Изолейцин 70.8%
- Лейцин: 131.5%
- Лизин: 122.7%
- Метионин+Цистин: 73.7%
- Треонин: 104.3%
- Триптофан: 176.5%
- Фенилаланин+Тирозин: 183.1%

Лимитирующие аминокислоты: валин и изолейцин.

Биологическая ценность (БЦ):~68 (определяется лимитирующей аминокислотой Валин).

Данный белок имеет хорошую биологическую ценность (~68), но она ограничена первой лимитирующей аминокислотой – валином. Белок богат такими аминокислотами, как лизин, лейцин, триптофан и ароматическими аминокислотами (фенилаланин+тирозин).

3.2 Разработка проекта государственного стандартного образца (ГСО) глюкозамина для постановки количественной методики определения хитина.

Разработка проекта государственного стандартного образца (ГСО) глюкозамина для постановки количественной методики определения хитина.

Приложение 7

3.3 Разработка метода определения хитина в пищевой продукции нового вида и продовольственном сырье, полученном из насекомых

Разработка метода определения хитина в пищевой продукции нового вида и продовольственном сырье, полученном из насекомых. Задачами исследования на 1-м этапе работы был подбор оптимального метода исследования и подбор оптимального протокола пробоподготовки.

В результате выполнения задач первого этапа был подобран оптимальный метод исследования и разработан соответствующий ему протокол пробоподготовки для количественного определения хитина. Поскольку разрабатываемая методика предназначена для применения в области контроля качества и безопасности пищевой продукции, возникает необходимость доказать, что она обеспечивает получение достоверных и воспроизводимых результатов. Эта задача решается в процессе валидации.

3.3.1 Основные положения валидации разрабатываемых методик.

Характеристики методики количественного анализа хитина, оцениваемые при валидации

Предел обнаружения – это минимальное содержание искомого аналита, которое можно обнаружить исследуемым методом, т.е. отличить полезный сигнал от фона. Оценка предела обнаружения по 3S- критерию означает, что в 99 случаях из 100 измеренный аналитический сигнал действительно соответствует искомому компоненту, а не является ложным, источником которого – фон.

В зависимости от того, является ли методика инструментальной или не инструментальной, возможны различные подходы для определения предела обнаружения. Используются следующие (а также другие) подходы.

Визуальная оценка

Визуальную оценку используют как для не инструментальных, так и для инструментальных методов. Предел обнаружения устанавливают путем анализа образцов с известными концентрациями компонента (аналита) и оценкой минимального содержания, при котором анализируемое вещество надежно определяется.

Соотношение сигнал/шум

Этот подход применим только к тем методам, для которых наблюдается шум базовой линии. Для определения соотношения сигнал/шум сравнивают величины сигналов, полученные для контрольного опыта и для образцов с низкими концентрациями анализируемого вещества. На основании полученных данных устанавливают минимальную концентрацию, для которой величина отношения сигнал/шум составляет обычно от 3 до 2.

Использование калибровочной прямой и стандартного отклонения аналитического сигнала

Предел обнаружения может быть выражен как: $C_{об} = 3.3 \delta/S$, (1) где δ – стандартное отклонение сигнала, S – тангенс угла наклона калибровочной прямой. Значение тангенса угла наклона калибровочной прямой вычисляют из калибровочной прямой для анализируемого вещества. Оценка стандартного

отклонения сигнала может быть проведена многими способами, например, следующими.

Использование стандартного отклонения сигнала для контрольного опыта. Измеряют величину аналитического сигнала для необходимого числа образцов, не содержащих анализируемое вещество, и вычисляют стандартное отклонение.

Использование калибровочной прямой. Получают калибровочную прямую для образцов с содержанием анализируемого вещества, близким к пределу обнаружения, и вычисляют ее параметры. В качестве стандартного отклонения в формуле может быть использовано стандартное отклонение свободного члена линейной зависимости.

Представление данных

Представляют значение предела обнаружения с указанием способа, использованного для его определения. Если определение предела обнаружения основывается на отношении сигнал/шум, представляют соответствующие хроматограммы. Если значение предела обнаружения получено путем вычислений или экстраполяции, его оценка должна быть подтверждена анализом необходимого числа образцов с содержанием анализируемого вещества, близким к пределу обнаружения.

В количественном анализе вместо предела обнаружения часто используют понятие **предела количественного определения** $S_{оп}$, который соответствует минимальному содержанию искомого компонента (примеси), определяемого с относительным стандартным отклонением, не превышающим величину 33 % отн. $S_{оп}$ находят по той же формуле, что и $S_{об}$, но вместо холостого опыта проводят многократный анализ матричного, но не содержащего аналит, образца, и полученное стандартное отклонение $S_{вчв}$ используют вместо $S_{х.о.}$ в соответствующей формуле.

Следует отметить, что оценку пределов обнаружения и определения не следует проводить автоматически, т.к. в этом случае необходимы дополнительные исследования. В первую очередь, для корректного проведения холостого опыта (например, учета поверхностных загрязнений образца и

содержания внесенных извне загрязнений), а также выбора опорного высокочистого вещества или матричного материалов, которое должно содержать минимальное количество искомого аналита (компонента).

Прецизионность – общее понятие, отражающее близость результатов измерения друг к другу, включающее повторяемость и воспроизводимость.

Повторяемость – отражает изменчивость результатов в условиях, когда их проводит один аналитик на одном и том же оборудовании через короткие промежутки времени.

Воспроизводимость – максимальная вариация результатов при проведении экспериментов в разных лабораториях, разными аналитиками, на разных приборах.

Правильность анализа (смещение) – степень близости полученного результата измерения к принятому опорному значению

Основные способы оценки правильности:

- сравнение со СО
- сравнение с результатами других методов
- метод «введено- найдено»

Обобщенная характеристика измерения, включающая совместную оценку прецизионности и правильности, называется **точностью**.

Следует отметить, что в отличие от оценки прецизионности процедура подтверждения правильности специфична для каждого вида анализа и каждого объекта исследований.

Селективность методики – это степень пригодности методики для определения конкретных аналитов в смесях и матрицах без помех от других компонентов, обладающих аналогичными свойствами. В некоторых случаях (например, в фармацевтической отрасли) вместо термина «селективность» применяется термин «**специфичность**». Это один из тех показателей, которые подразумевают комплекс предварительных исследований, направленных на очистку аналитического сигнала, включая способы химического преобразования

пробы: сорбцию, экстракцию, хроматографическое разделение, концентрирование и т.д.

Линейность – это способность методики (в пределах диапазона применения) получать результаты испытаний, прямо пропорциональные концентрации (количеству) аналита (компонента) в образце. Линейная зависимость должна быть исследована в пределах диапазона применения методики. Она может быть подтверждена непосредственно путем разбавления исходного раствора и/или с использованием СО, что может быть исследовано при изучении диапазона применения. По полученным данным строят график зависимости сигнала как функции концентрации или количества определяемого компонента (аналита) и визуально оценивают его линейность. Если линейная зависимость наблюдается, то результаты обрабатывают подходящим статистическим методом, например, методом наименьших квадратов.

В обоснованных случаях для получения линейности данные следует подвергнуть предварительному математическому преобразованию. Должны быть определены и представлены: коэффициент корреляции, точка пересечения с осью ординат, тангенс угла наклона прямой и остаточная сумма квадратов отклонений, а также график со всеми экспериментальными данными. Для оценки линейности может понадобиться анализ отклонений экспериментальных данных от прямой. Некоторые аналитические методики, например иммуноаналитические, не показывают линейности ни при каких математических преобразованиях. В таких случаях аналитический отклик должен быть описан подходящей функцией концентрации анализируемого вещества в образце. Для подтверждения линейности рекомендуется использовать не менее 5 концентраций. Другие подходы должны быть обоснованы.

Рабочий диапазон методики описывает интервал, в котором методика позволяет получить результаты с приемлемой неопределенностью. Нижняя граница рабочего диапазона соответствует пределу количественного определения, верхняя граница определяется концентрациями, при которых

начинают наблюдаться такие аномалии, как, например, плато или насыщение, теряется линейность.

Робастность (или устойчивость) аналитической методики – это «мера ее способности сохранять рабочие характеристики при небольших, но неслучайных изменениях параметров при реализации методики». Этапы анализа, недостаточно тщательное исполнение которых может оказать значительное влияние на результат, должны быть идентифицированы. И для оценки робастности рекомендуется провести «тест на устойчивость», в который включены определение эффекта от каждого изменения условий на результат измерений; ранжирование изменяемых параметров по влиянию на характеристики методики; проверку по статистическим критериям для оценки статистической значимости наблюдаемых эффектов.

Оценку робастности проводят на стадии разработки методики с учетом типа изучаемой методики. Эта оценка должна доказать надежность результатов анализа при небольших изменениях параметров методики. Если на результаты анализа влияют условия его проведения, то эти условия должны быть стандартизированы и в текст методики вносят соответствующие предостережения. Типичные примеры изучаемых параметров: устойчивость во времени аналитических растворов; время экстракции. В случае жидкостной хроматографии: рН подвижной фазы; состав подвижной фазы; колонки (различные серии и/или поставщики); температура; скорость подвижной фазы.

Неопределенность измерений

При оценке неопределенности при валидации количественных методик обязательно следует учитывать факторы – подготовка образцов и особенности метода – это существенные источники ошибок. Неопределенность метода следует оценивать с учетом следующих документов:

ГОСТ Р ИСО 21748-2012 Статистические методы. Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений

ГОСТ 34100.1-2017 Неопределенность измерения. Часть 1. Введение в руководства по выражению неопределенности измерения

ГОСТ 34100.3-2017 Неопределенность измерения. Часть 3. Руководство по выражению неопределенности измерения

ГОСТ 34100.3.1-2017 Неопределенность измерения. Часть 3. Руководство по выражению неопределенности измерения. Дополнение 1. Трансформирование распределений с использованием метода Монте-Карло

ГОСТ 34100.3.2-2017 Неопределенность измерения. Часть 3. Руководство по выражению неопределенности измерения. Дополнение 2. Обобщение на случай произвольного числа выходных величин

CAC/GL 54-2004 Методические указания по неопределенности измерения QUAM2012.P1. EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Third Edition.

3.3.2 Выбор методики и оптимального протокола подготовки проб

На основании проведенного литературного обзора (глава 2.2.) и серии апробационных экспериментов для количественного определения хитина в муке из *Acheta domesticus* был выбран комбинированный подход, использующий два метода хроматографии: **ВЭЖХ-МС/МС для анализа глюкозамина и N-ацетилглюкозамина и ВЭЖХ-УФД для анализа уксусной кислоты.**

Данный выбор был сделан по следующим причинам:

1. Комплексность и прямой расчет. Метод позволяет детектировать все три ключевых компонента, образующихся при кислотном гидролизе хитина. Последующий пересчет их концентраций с учетом молекулярных масс мономерных звеньев обеспечивает максимально точный и прямолинейный расчет содержания хитина, в отличие от методов, основанных на определении только одного маркера.

2. Высокая селективность и чувствительность. Использование тандемной масс-спектрометрии (МС/МС) в режиме MRM исключает влияние матричных эффектов и позволяет однозначно идентифицировать и количественно

определять глюкозамин и N-ацетилглюкозамин даже в сложных биологических матрицах с очень низкими пределами обнаружения (LOD 0.02-0.03 мг/л). Это критически важно для анализа образцов с потенциально низким содержанием хитина.

3. Отказ от дериватизации. В отличие от многих хроматографических методов, описанных в обзоре, разработанная методика не требует стадии предварительной дериватизации аналитов. Это значительно ускоряет пробоподготовку, снижает стоимость анализа, минимизирует потенциальные потери аналита и источники погрешности.

4. Учет разложения аналита. Методика включает уникальную коррекцию на разложение глюкозамина в процессе гидролиза с использованием коэффициента стабильности ($1,846 \cdot t(h)$), что повышает точность и достоверность конечного результата.

5. Валидируемость. Метод демонстрирует экспотенциальные градуировочные характеристики ($R^2 > 0.99$), низкие LOD/LOQ и хорошую воспроизводимость, что соответствует требованиям к валидации аналитических методик.

Сравнительный анализ апробированных методов определения хитина

В ходе отработки методики были проанализированы и апробированы ключевые методы, описанные в литературном обзоре. Ниже представлена таблица, наглядно показывающая их основные недостатки, которые привели к выбору альтернативного подхода.

Таблица 2. Сравнительный анализ апробированных методов определения хитина.

Апробированный метод	Ключевой принцип	Выявленные в ходе апробации недостатки / "узкие места"
ВЭЖХ-УФД с дериватизацией (ультрафиолетовый детектор, напр., FMOС-С1)	Определение глюкозамина после его дериватизации в УФ-активное производное.	Трудоемкость и время: процесс дериватизации длителен и требует точного контроля условий.

Апробированный метод	Ключевой принцип	Выявленные в ходе апробации недостатки / "узкие места"
		<p>Потери аналита: возможны неполное протекание реакции или разложение деривата, что требует использования внутреннего стандарта и усложняет расчеты.</p>
<p>ВЭЖХ-РИД (рефрактометрический детектор)</p>	<p>Прямое определение глюкозамина без дериватизации.</p>	<p>Низкая селективность: детектор реагирует на все соединения в пробе, что приводит к наложению пиков в сложной матрице (например, муке).</p> <p>Низкая чувствительность: высокие пределы обнаружения (порядка 1 мг/100 мл) не подходят для точного анализа образцов с низким содержанием хитина.</p>
<p>Газовая хроматография</p>	<p>Определение уксусной кислоты или силилированных производных глюкозамина.</p>	<p>Сложная пробоподготовка: Для анализа глюкозамина обязательна стадия силилирования. Прямое определение уксусной кислоты на насадочных колонках недостаточно чувствительно.</p> <p>Риск погрешности: высокие температуры в инжекторе могут приводить к разложению аналитов.</p>
<p>Колориметрические методы</p>	<p>Фотометрическое измерение окрашенного комплекса, образующегося с продуктами гидролиза хитина.</p>	<p>Низкая специфичность: реагенты могут взаимодействовать с другими компонентами образца, что требует его тщательной предварительной очистки.</p> <p>Полуколичественный результат: метод больше подходит для оценочного, а не для точного количественного анализа.</p>
<p>ИК-спектроскопия</p>	<p>Измерение интенсивности характеристических полос поглощения хитина.</p>	<p>Проблемы с матрицей: наличие других биополимеров (белков, липидов) мешает точному количественному</p>

Апробированный метод	Ключевой принцип	Выявленные в ходе апробации недостатки / "узкие места"
		<p>определению. Требуется высокоочищенный образец хитина.</p> <p>Сложность калибровки: создание достоверной калибровочной модели для разнородных образцов затруднительно.</p>

Вывод по отработке метода:

Проведенный анализ и апробация показали, что ни один из рассмотренных методов не является идеальным для решения задачи точного, селективного и воспроизводимого количественного определения хитина в сложной биологической матрице (муке из сверчков). Их ключевые ограничения – необходимость дериватизации, низкая селективность или чувствительность, сложность пробоподготовки – были успешно преодолены в разработанной комбинированной методике **ВЭЖХ-МС/МС + ВЭЖХ-УФД**, что и обусловило ее окончательный выбор.

Определение хитина основано на хроматографическом детектировании компонентов хитина – глюкозамина, N-ацетилглюкозамина (ВЭЖХ-МС/МС) и уксусной кислоты (ВЭЖХ-УФД) с последующим пересчетом на основное вещество.

В методике использовались следующие реактивы:

Для поведения градуировки хроматографической системы:

D-(+)-Гидрохлорид глюкозамина, CAS: 66-84-2;

N-ацетилглюкозамин, CAS:7512-17-6;

Уксусная кислота, CAS: 64-19-7;

Для предварительно пробоподготовки:

Соляная кислота, CAS: 7647-01-0;

Гидроксид натрия, CAS: 1310-73-2;

Гексан, CAS: 110-54-3

Хитин, CAS: 1398-61-4.

Протокол подготовки пробы.

На 1 этапе пробоподготовки образцы муки, полученной из сверчка домашнего (*Acheta Domestica*), подвергались депотеинизации. Удаление белков проводилось путем обработки 1М NaOH в колбах для встряхивания соотношением твердое вещество/растворитель 1:20 (масса/объем) при 80°C в течение 1 ч. Щелочную обработку проводили несколько раз (9–13 раз) с промежуточной фильтрацией до тех пор, пока фильтрованный раствор NaOH не становился бесцветным, чтобы гарантировать, что все белки растворены. К концу последовательных обработок был получен осадок хитина светло-коричневого цвета. Осадок хитина тщательно промывали дистиллированной водой до нейтрального pH, сушили при 60°C в течение 12ч. и взвешивали. Конечный продукт хранили в эксикаторе при комнатной температуре до дальнейшего анализа.

На 2 этапе пробоподготовки проводили кислотный гидролиз биомассы сверчка (муки) и белка, полученных из сверчка домашнего (*Acheta Domestica*). Каждый биологический образец в количестве 20,0 мг переносили в термостойкие стеклянные стаканы, содержащие 10 мл 6М HCl. Полученную смесь гомогенизировали и обрабатывали ультразвуком в течение 15 минут для улучшения, проводимого гидролиза образца. Кислотный гидролиз проводили путем выдержки реакционной смеси в термостате при 110°C в течение 4 ч. После реакции стаканы охлаждали до комнатной температуры под вытяжным шкафом. Полученный гидролизат разбавляли деионизованной водой, фильтровали через мембранные фильтры 0,2 мкм PTFE и использовали для последующего хроматографического анализа.

Хроматографический анализ.

После этапа кислотного гидролиза полученный гидролизат анализировали на содержание компонентов: глюкозамина, N-ацетилглюкозамина и уксусной кислоты.

Определение глюкозамина и N-ацетилглюкозамина

Глюкозамин и N-ацетилглюкозамин анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС, а уксусную кислоту анализировали с помощью ВЭЖХ-УФД. Количество гидролизованного хитина из биологических образцов рассчитывали согласно формуле 1 и 2, принимая во внимание концентрацию составляющих хитина и вес экстрагированного хитина насекомых из каждого биологического источника.

$$\text{Хитин в образце (\%)} = 100 * \frac{[\text{глюкозамин} (\frac{\text{мг}}{\text{мл}})] + [\text{ацетат} (\frac{\text{мг}}{\text{мл}})] + [N\text{-ацетилглюкозамин} (\frac{\text{мг}}{\text{мл}})]}{\text{Количество внесенного образца} (\frac{\text{мг}}{\text{мл}})} \quad (1)$$

$$\text{Хитин с учетом коэффициента извлечения} = \left[\text{Содержание хитина в анализируемом материале} \right] * \frac{\left[\text{Масса выделенного хитина после экстракции} \right]}{\left[\text{Масса выделенного хитина до экстракции} \right]} \quad (2)$$

Определение глюкозамина и N-ацетилглюкозамина проводилось на системе МС/МС Фильтрованный гидролизат высушивали с помощью N₂ для устранения HCl, которая может влиять на удерживание и рН подвижной фазы, и повторно растворяли в соотношении 1:1 (об./об.) ацетонитрил + 0,1% муравьиная кислота и деионизованная H₂O + 0,1% муравьиная кислота. Каждый образец разбавляли (в 50 раз) в деионизованной воде и вводили в систему ВЭЖХ-МС/МС Agilent 1200 (Agilent Technologies Inc., Калифорния, США) с tandemным труквадрупольным масс-спектрометром Agilent 6410 (Agilent Technologies Inc., Калифорния, США).

Условия хроматографического ВЭЖХ-МС/МС и ВЭЖХ УФД анализа:

Аналитическая колонка – Cogent Diamond Hydride 100 Å (150 мм x 2,1, 4 мкм);

Диапазон измерений стандартов – 1–10 мг/л;

Состав подвижной фазы – растворитель А (20% ультрачистая вода + 0,1% муравьиная кислота) и растворитель В (80% ацетонитрил + 0,1% муравьиная кислота);

Градиент подвижной фазы – 20–70% А (0–5 мин), 70% А (5–7 мин), 70–20% А (7–8 мин), 20% А (8–15 мин);

Скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/мин;

Температура термостата колонки – 30°C;

Количественное определение – по протонированным ионам в режиме MRM

Режим ионизации – электроспрей;

Характеристические MRM, m/z – глюкозамин (180 → 162 и 180 → 72) и N-ацетилглюкозамин (222 → 138), в режиме положительных йонов;

Время удерживания, мин. – глюкозамин (3,9) и N-ацетилглюкозамин (1,4).

Определение уксусной кислоты

Концентрацию уксусной кислоты определяли путем введения фильтрованного неразбавленного гидролизата в систему ВЭЖХ Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher, Agawam, США), оснащенные УФ-видимым детектором 3000 (UVD) (Thermo Scientific).

Условия хроматографического ВЭЖХ-УФД анализа:

Аналитическая колонка – Aminex HPX-87H Column 300x7.8mm;

Диапазон измерений стандартов – 0,25–10 мг/л;

Состав подвижной фазы – 0,01M H₂SO₄;

Способ элюирования – изократический;

Скорость потока подвижной фазы – 0,6 мл/мин;

Температура термостата колонки – 50°;

Характеристическая длина волны, нм – 210;

Время удерживания, мин. – 15,5.

Образцы хроматографировали в трех повторностях и выражали как среднее значение ± стандартное отклонение. Нормальность и однородность дисперсий проверяли с помощью тестов Шапиро-Уилка и Левена соответственно. С помощью t-критерия Стьюдента оценивали статистические различия между двумя группами.

Содержание хитина в испытуемых образцах получали, используя следующие формулы:

$$[\text{глюкозамин}]_c = [\text{глюкозамин}]_{\text{измеренное значение}} * \frac{100}{100 - 1.846 * t(h)} \quad (3)$$

Чтобы учесть разложение мономера в процессе гидролиза, молярная концентрация глюкозамина, измеренная в гидролизованных образцах, была скорректирована с учетом угла наклона уравнения линии тренда превращения мономера, т.е. $X = 1,846 * t(h)$ коэффициент стабильности глюкозамина с учетом времени гидролиза.

Количество гидролизованного хитина (мг/мл) определяли на основе аналитически определенных молярных концентраций глюкозамина, ацетата и N-ацетилглюкозамина в гидролизате. Преобразование в массу осуществляли с учетом соответствующих молекулярных масс мономерного звена, присутствующих в хитиновой цепи, т.е. 161,15, 42,04 и 203.19.

$$\text{Гидролизированный хитин} \left(\frac{\text{мг}}{\text{мл}} \right) = [\text{глюкозамин}] * 161.15 + [\text{ацетат}] * 42.04 + [\text{N-ацетилглюкозамин}] * 203.19 \quad (4)$$

Градуировочные характеристики:

Метод	Компонент	R ² (N = 15)	LOD (мг/л)	LOQ (мг/л)
ВЭЖХ-	Глюкозамин	0,991	0,02	0,08
МС/МС	N-ацетилглюкозамин	0,999	0,03	0,1

Линейная зависимость установлена в диапазоне от 0,5 до 10 мг/л.

3.4 Разработка проекта государственного стандартного образца (ГСО) вида *Acheta Domesticus* для постановки количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Разработка проекта государственного стандартного образца (ГСО) вида *Acheta Domesticus* для постановки количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени представлена **Приложение 8**.

3.5 Разработка метода определения и идентификации продовольственного сырья, полученного из насекомых

Разработка метода определения и идентификации продовольственного сырья, полученного из насекомых (вид насекомых – *Acheta Domesticus*). Задачи

исследования на 1-м этапе работы: анализ нуклеотидных последовательностей праймеров *in silico* с целью подтверждения их специфичности и пригодности для обнаружения соответствующих видоспецифичных целевых генов; подбор оптимальных методов пробоподготовки и выделения нуклеиновых кислот.

3.5.1 Особенности проведения валидации количественного метода ПЦР

При оценке характеристик метода ПЦР следует указать аналиты, матрицы и концентрации, для которых может быть использован ПЦР метод.

От метода экстракции, независимого от матрицы, к которой он должен быть применен, требуется, чтобы он давал ДНК в достаточном количестве, структурной целостности и чистоте, чтобы можно было провести надлежащую оценку рабочих характеристик последующих этапов метода (например, адекватной амплификации ДНК на этапе ПЦР).

В ПЦР-анализе в реальном времени значения C_t могут быть использованы для оценки эффективности и чувствительности ПЦР.

При проверке чувствительности количественного метода ПЦР должна быть получена линейная зависимость C_t в виде логарифмической функции от матричной концентрации во всем диапазоне метода. Следует указать коэффициент корреляции, Y -пересечение и наклон линии регрессии. % остатка для каждого из калибраторов предпочтительно должен составлять $\leq 30\%$.

Эффективность может быть проверена, например, путем настройки серии разведений матричной ДНК и определения значения C_t (порогового числа циклов, при котором измеренный сигнал флуоресценции пересекает заданное пользователем пороговое значение) для каждого разведения. В идеальной ситуации, когда эффективность амплификации составляет 100%, двукратное уменьшение количества матричной ДНК, добавленной в ПЦР, приведет к увеличению значения C_t на единицу. Следовательно, если ДНК разбавлена в 10 раз, теоретическая разница в значениях C_t между разбавленной и неразбавленной ДНК должна составлять приблизительно 3,32. Теоретические цифры могут быть недостижимы в реальных ситуациях. Значительные

отклонения от этой зависимости могут указывать на то, что извлеченная ДНК содержит ингибиторы ПЦР, что раствор ДНК не является однородным или количество ДНК настолько низкое, что стохастическое изменение количества ДНК в реакциях дает ненадежные количественные оценки. Это также относится к реакциям ПЦР с конечной точкой, проводимым с использованием флуоресцентных зондов.

При подтверждении диапазона действия методики следует продемонстрировать, что взаимосвязь между реакцией и концентрацией является непрерывной, воспроизводимой и должна быть линейной после соответствующего преобразования. Диапазон устанавливается путем подтверждения линейности и правильности результатов ПЦР при применении к образцам, содержащим количества аналита в пределах или в крайних пределах указанного диапазона процедуры.

ДНК, используемую в качестве калибратора, желательно выбирать с установленной прослеживаемостью.

Уникальные характеристики количественной ПЦР накладывают особые ограничения на нижний предел динамического диапазона количественной ПЦР. При количественной ПЦР распределение значений измерений для холостых проб не является гауссовым и обычно соответствует распределению Пуассона. Это связано с трудностью определения значений LOD и LOQ из-за ненормального распределения значений в этом диапазоне. Рекомендации по расчету характеристик методики ПЦР приведены в ISO 16393:2018(E) «Molecular biomarker analysis – Determination of the performance characteristics of qualitative measurement methods and validation of methods»:

- Обязательный показатель. Предел обнаружения (LOD) и предел количественного определения (LOQ)
- Рекомендуемый показатель. Вероятность обнаружения (POD) – Вероятность положительного результата анализа качественным методом для данной матрицы при данной концентрации в одной лаборатории

Рекомендуемый показатель. Средняя вероятность обнаружения в разных лабораториях. Вероятность положительного результата анализа качественным методом для данной матрицы при заданной концентрации в нескольких лабораториях

Рекомендуемый показатель. Нижний доверительный предел (LCL) – нижнее значение диапазона, содержащего истинное значение измеряемой величины с заданной вероятностью

Рекомендуемый показатель. Верхний доверительный предел (UCL) – верхнее значение диапазона, содержащего истинное значение измеряемой величины с заданной вероятностью

В случае оценивания относительного стандартного отклонения повторяемости, полученное значение для этапа ПЦР должно быть менее либо равно 25% во всем динамическом диапазоне метода.

В случае оценивания относительного стандартного отклонения воспроизводимости, полученное для этапа ПЦР должно быть ниже 35% на большей части динамического диапазона, за исключением предела количественной оценки, где оно может быть выше.

Специфичность метода должна быть продемонстрирована путем предоставления экспериментальных данных. Демонстрационные испытания должны включать анализ проб, содержащих смесь целевой ДНК (мишени) и нецелевой ДНК, где действительно испытываются пределы обнаружения (если это соответствует динамическому диапазону). Поскольку метод должен быть избирательным для ДНК-мишени, он должен давать положительный результат только при использовании пищевой матрицы, содержащей ДНК-мишень. Праймеры и зонды должны были быть проверены в соответствующих базах данных последовательностей на предмет возможных гомологий с другими последовательностями, потенциально присутствующими в определенных матрицах, в соответствии с предполагаемым использованием. После такой оценки следует экспериментально продемонстрировать специфичность.

Для анализов, селективных по ДНК-мишени. Экспериментальные доказательства избирательности для ДНК-мишени должны включать:

Анализы по крайней мере десяти образцов из разных партий или партий пищевых продуктов или ингредиентов, в которых отсутствуют последовательности ДНК-мишеней, хотя образцы должны содержать ДНК, специфичную для таксона. Все эти анализы должны дать отрицательный результат.

Следует протестировать соответствующее количество проб ДНК из каждого источника.

Для каждой пробы ДНК следует проанализировать две повторные пробы, которые должны дать результаты в пределах C_t равном 0,5.

Для анализа последовательностей ДНК, специфичных для таксономической группы. Экспериментальные доказательства избирательности таксона должны включать:

Анализы по меньшей мере десяти образцов из разных партий или партий пищевых продуктов или ингредиентов, полученных из организмов, принадлежащих к интересующему таксону, но классифицированных в разных категориях таксонов. Все эти анализы должны дать положительный результат. Например, если специфичность таксона предположительно соответствует виду растения, такому как кукуруза, пробы могут соответствовать сортам кукурузы с различным генетическим происхождением.

Анализы по меньшей мере десяти проб из разных партий или партий аналогичных пищевых продуктов или ингредиентов, полученных из организмов, не принадлежащих к интересующему таксону, которые могут присутствовать в соответствующих пищевых матрицах. Все эти анализы должны дать отрицательный результат. Например (и продолжая предыдущий пример), если первые десять анализов были применены к различной кукурузной муке, во второй группе анализов может быть уместно провести анализ пшеничной/соевой/рисовой муки.

Следует протестировать соответствующее количество проб ДНК из каждого источника.

Для каждой пробы ДНК следует проанализировать две повторные пробы, которые должны дать результаты в пределах C_t равном 0,5.

Результаты испытаний должны четко указывать на то, что никаких существенных показаний приборов или химических влияний не наблюдается.

Правильность

Правильность любого метода должна определяться путем сравнения результатов, полученных в ходе анализа эталонного материала, с известным или присвоенным значением для этого эталонного материала. Следует учитывать влияние матрицы проб, особенно когда матрица проб отличается от матрицы эталонного материала.

Значение правильности $\pm 25\%$ в отношении этапа ПЦР должно быть приемлемым во всем динамическом диапазоне.

Особенности проведения валидации качественного метода ПЦР

По своей природе качественные результаты испытаний относятся к идентификации выше/ниже предела обнаружения. Как и предел обнаружения для количественных методов, предел обнаружения для качественного метода может быть определен как концентрация, при которой положительно определенная проба дает положительный результат по крайней мере в 95% случаев. Это приводит к частоте ложноотрицательных результатов 5% или менее. Это также выражается в виде соотношения или процента.

Показатель ложноположительных результатов – это вероятность того, что известная отрицательная испытательная проба была классифицирована методом как положительная.

Показатель ложноотрицательных результатов – это вероятность того, что известная положительная испытательная проба была классифицирована методом как отрицательная.

Для удобства эти показатели могут быть выражены в процентах.

Чтобы продемонстрировать показатель ложноотрицательных результатов для качественного анализа, необходимо проанализировать серию проб с постоянной известной концентрацией положительно определенного материала в пуле отрицательно определенного материала и оценить результаты. Важно отметить, что концепция доверительных интервалов и статистической неопределенности также должна применяться к риску ложноположительных и (или) ложноотрицательных результатов. Желаемый уровень достоверности определяет размер и количество пулов, которые необходимо испытать.

Показатель ложноположительных результатов

Это вероятность того, что известная отрицательная испытательная проба была классифицирована методом как положительная. Для удобства этот показатель может быть выражен в процентах:

$$\begin{aligned} \% \text{ ложноположительных результатов} &= \\ &= 100 \times \frac{\text{количество неправильно классифицированных известных отрицательных проб}}{\text{общее количество известных отрицательных проб}} \end{aligned}$$

Показатель ложноотрицательных результатов

Это вероятность того, что известная положительная испытательная проба была классифицирована методом как отрицательная. Для удобства этот показатель может быть выражен в процентах:

$$\begin{aligned} \% \text{ ложноотрицательных результатов} &= \\ &= 100 \times \frac{\text{количество неправильно классифицированных известных положительных проб}}{\text{общее количество известных положительных проб}} \end{aligned}$$

Поскольку существуют различные определения, используемые для показателей ложноположительных и ложноотрицательных результатов, в отчете о валидации следует уточнить, какое из них было использовано.

3.5.2 Разработка метода определения и идентификации продовольственного сырья, полученного из насекомых

Анализ нуклеотидных последовательностей праймеров *in silico* с целью подтверждения их специфичности и пригодности для обнаружения

соответствующих видоспецифичных целевых генов; подбор оптимальных методов пробоподготовки и выделения нуклеиновых кислот.

Анализ сходимости нуклеотидной последовательности гена цитохром оксидазы (COI) митохондриального генома *Acheta domesticus*.

Ген цитохром оксидазы (COI) широко используется для видовой идентификации животных в качестве ДНК матрицы с использованием как методологии анализа нуклеотидной последовательности (секвенирование по Сэнгеру), так и с использованием ПЦР в реальном времени.

Полногеномных референтных сборок митохондриальной ДНК *Acheta domesticus* в базе данных также всего 2: GenBank: OK504623.1 и GenBank: MZ440654.1, схожие по гену COI на 100% (Рис.7)

The screenshot shows the GenBank search results for sequences producing significant alignments. Two sequences are selected:

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Acheta domesticus breed Farm mitochondrion .complete genome	Acheta domesticus	990	990	100%	0.0	100.00%	15784	OK504623.1
Acheta domesticus mitochondrion .complete genome	Acheta domesticus	990	990	100%	0.0	100.00%	16071	MZ440654.1

Рисунок 7. Продукт сиквинса базе данных GenBank полногеномных референтных сборок митохондриальной ДНК *Acheta domesticus*.

Всего последовательностей гена цитохром оксидазы (COI) *Acheta domesticus* с более чем 500 п.н. в базе данных NCBI – 72.

The screenshot shows the NCBI search results for COI sequences in *Acheta domesticus*. The search parameters are:

- Molecule type: dna
- Query Length: 536
- Other reports: [Distance tree of results](#), [MSA viewer](#)

The search results show 72 sequences selected. The interface includes a search bar with 'to' indicators and buttons for 'Filter' and 'Reset'.

Рисунок 8. Скриншот поискового запроса в базе данных NCBI, показывающий количество нуклеотидных последовательностей цитохром оксидазы (COI) целевого организма.

Сравнение всех этих последовательностей гена цитохром оксидазы (COI) показывает уровень сходимости в пределах 98%, что обычно характерно для одного вида. При сравнении участка размером 536 п.н. это 9 мисматчей на участок с их локализацией преимущественно на 3` конце.

Acheta domesticus voucher INV06916 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
Sequence ID: [OR974760.1](#) Length: 658 Number of Matches: 1

Range 1: 2 to 537 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
941 bits(509)	0.0	527/536(98%)	0/536(0%)	Plus/Plus

Рисунок 9. Скриншот поискового запроса в базе данных NCBI, показывающий уровень сходимости целевого участка в пределах вида.

Данное расположение внутривидовых мисматчей и их количество позволяют гарантировать теоретический показатель точности (правильности) разработанной праймерной тест-системы.

Показатель специфичности праймерной тест-системы определяется высокими значениями уровня близкородственной дивергенции. Сверчок домашний является представителем семейства Настоящие сверчки (Gryllidae). Это семейство включает в себя 2 подсемейства: *Brachytrupinae* и *Gryllinae* и 3 рода: *Anurogryllus*, *Acheta*, *Gryllus*. Род *Acheta* представлен единственным и искомым видом *Acheta domesticus*.

Поиск по базе NCBI показал наличие 210 нуклеотидных последовательностей гена цитохром оксидазы (COI) близкородственных *Acheta domesticus* видов.

Molecule type: dna
Query Length: 536
Other reports: [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) ?

Alignments to: [] to [] [] to [] [] to []
[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 500 ?

select all 210 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Рисунок 10. Скриншот поискового запроса в базе данных NCBI, показывающий количество нуклеотидных последовательностей цитохром оксидазы (COI) *Acheta domesticus* видов.

Уровень сходимости искомого участка ДНК находился в пределах 81,75%-88,56%, что говорит о высоком уровне межвидовой дивергенции внутри одного семейства.

Данный этап исследования подтверждает возможность использования данного участка ДНК в качестве исходной матрицы для разработки видоспецифической тест-системы для идентификации ДНК *Acheta domesticus*.

В качестве внутреннего положительного контроля (ВПК), позволяющего определить чистоту выделенной ДНК (отсутствие ингибиторов ПЦР), а также чистоту биомассы сверчка домашнего от примеси посторонних видов насекомых (близкородственных сверчков) можно использовать как классическую тест-систему на 18S эукариот, так и разработать специфическую на семейство *Gryllidae* пару праймеров и зонд на основе 18S рДНК матрицы. Уровень дивергенции коротких участков 18S рДНК двух основных родов настоящих сверчков не превышает 2%.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Gryllus assimilis isolate BYU_ACOR016 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Gryllus assimilis	141	141	100%	4e-34	100.00%	1825	AY521869.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gryllus bimaculatus mRNA, GBcontig27936	Gryllus bimaculatus	141	141	100%	4e-34	100.00%	641	AK281075.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gryllus sp. DNA30 from Brazil small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Gryllus sp. DNA30	141	141	100%	4e-34	100.00%	668	QM501904.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acheta rufopictus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Acheta rufopictus	141	141	100%	4e-34	100.00%	650	KR904150.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gryllus bimaculatus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Gryllus bimaculatus	141	141	100%	4e-34	100.00%	596	KR904029.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gryllus assimilis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Gryllus assimilis	141	141	100%	4e-34	100.00%	1859	KM853171.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acheta domestica 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Acheta domestica	141	141	100%	4e-34	100.00%	1867	KM853300.1
<input checked="" type="checkbox"/> A domestica 18S rRNA gene and internal transcribed spacer 1	Acheta domestica	141	141	100%	4e-34	100.00%	1959	X95741.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acheta domestica 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Acheta domestica	141	141	100%	4e-34	100.00%	644	AF514506.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gryllus bimaculatus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Gryllus bimaculatus	141	141	100%	4e-34	100.00%	651	AF514509.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acheta domestica 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Acheta domestica	141	141	100%	4e-34	100.00%	650	KR904025.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gryllus bimaculatus mRNA, GBcontig10876	Gryllus bimaculatus	137	137	100%	2e-32	98.72%	119	AK264015.1

Рисунок 11. Скриншот поискового запроса в базе данных NCBI, обосновывающий целевой участок для дизайна ВПК.

Подбор видоспецифических праймеров для идентификации ДНК *Acheta domesticus*

Для подбора праймеров в программе Primer-BLAST использовались подходы по [109], а именно:

- **Нуклеотидная последовательность** праймеров должна быть высокоспецифична матрице ДНК, чтобы обеспечить амплификацию чистого монопродукта в результате ПЦР без амплификации неспецифичных фрагментов ДНК.
- **Оптимальная длина** праймера-от 16 до 25 нуклеотидов. Более короткие праймеры могут слабо связываться с матрицей из-за малого количества образующихся водородных связей.
- **Соотношение АТ и GC нуклеотидов** в последовательности праймера должно быть близко к 1:1. Большое количество АТ-оснований приводит к снижению температуры плавления праймеров, а большое количество GC-оснований – к её увеличению.
- **Последние три нуклеотида 3'-конца** праймера должны быть обязательно полностью комплементарны матрице ДНК.
- **Нуклеотидная последовательность** праймеров не должна содержать повторяющиеся элементы и палиндромы, поскольку это может привести к неизбирательному отжигу и, как следствие, к получению неспецифичного продукта.
- **Область отжига** праймеров должна происходить на консервативном участке матрицы ДНК, то есть располагаться вне зон точечных мутаций, делеций или инсерций.
- **Желательно**, чтобы на 3'-конце был гуанин или цитозин, поскольку они образуют три водородные связи с молекулой матрицы, делая гибридизацию более стабильной.

С помощью поиска в базе данных NCBI был выбран наиболее изменчивый участок гена цитохром оксидазы (COI) в пределах двух близкородственных родов семейства Настоящие сверчки.

Gryllus veletis voucher 08BBORTH-0312 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial

Sequence ID: [KM533172.1](#) Length: 626 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 560 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
677 bits(750)	0.0	486/560(87%)	3/560(0%)	Plus/Plus
Query 19	CTGGAATAGTAGGTACCTCTTTAAGTATCTTAATTCGAACGGAAC TAGGACAACCAGGTT	78		
Sbjct 1	CTGGAATAGTAGGCACATCATTAAAGTATTTAATTCGAACGGAAC TAGGACAACCAGGTT	60		
Query 79	ATTTAATTGGAGATGATCAAACATATAATGTTATCGTAACTGCACATGCATTGTGCATAA	138		
Sbjct 61	ATTTAATTGGAGACGATCAAACCTATAATGTTATCGTAACTGCACATGCATTGTGCATAA	120		
Query 139	ttttttCATGGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTCGGAAATGATTAGTACCCCTAA	198		
Sbjct 121	TTTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATCGGAGGATTTGGAAATGATTAGTACCCCTAA	180		
Query 199	TATTAGGTGCACCCGATATAGCCTTTCTCGAATAACAATATAAGATTTGACTTTTAC	258		
Sbjct 181	TATTAGGAGCTCCAGATATAGCATTTCACGAATAAATAACATAAGATTTGACTCTTAC	240		
Query 259	CACCTCACAACCTTTTATAACAGAGAATAGTCGAAAATGGTGCAGGACAGGAT	318		
Sbjct 241	CCCCATCATTAAACCCTTTTATAACAGAGAATAGTTGAAAATGGTGCAGGAACAGGAT	300		
Query 319	GAACAGTTTATCCACCTTTATCAACAGGAATCGCCACGCCGAGCATCTGTTGATTTAG	378		
Sbjct 301	GAACAGTTTATCCACCTCTATCAACAGGAATTGTCACGCTGGAGCATCTGTTGATTTAG	360		
Query 379	CCATTTTTTCATTACACTTAGCTGGAATTTATCAATTTCTGGGAGCCGTTAATTTTATTA	438		
Sbjct 361	CCATCTTCTCCTACATTTAGCAGGAATTTCTCAATTTCTAGGAGCTGTAATTTTATTA	420		
Query 439	CAACTATAATCAATATACGAGCACCTGGGATGTCATTAGATCAAACCCATTATTTGTAT	498		
Sbjct 421	CTACTATAATTAATATGCGAGCACAGGAATATCACTAGACCAAACACCATTTATTTGTTT	480		

Рисунок 12. Скриншот поискового запроса в базе данных NCBI, наиболее изменчивого участка гена-мишени.

Далее этот участок ДНК всех близкородственных видов был выровнен в программе CLC Sequence Viewer 7 с целью выявления видоспецифических мисматчей.

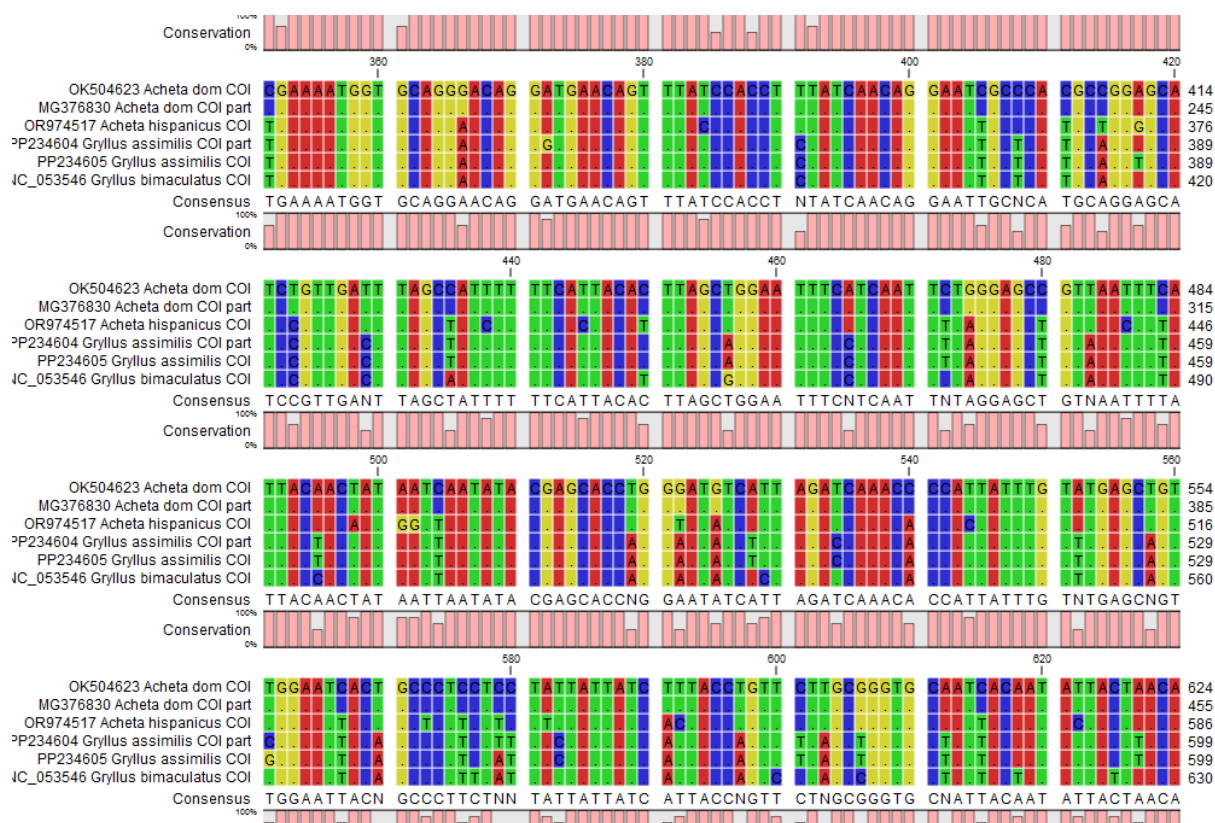


Рисунок 13. Выравнивание нуклеотидных последовательностей участка гена цитохром оксидазы (COI) различных видов сверчков, относящихся к семейству *Gryllidae*.

В программе Primer-BLAST одним из условий автоматического подбора праймеров был последовательный перебор участков ДНК, оканчивающихся на видоспецифические мисматчи, например мисматчи 405,411, 435, 480, 489 и т.п. (рис.14).

В итоге была подобрана оптимальная по всем заданным условиям пара видоспецифических праймеров.

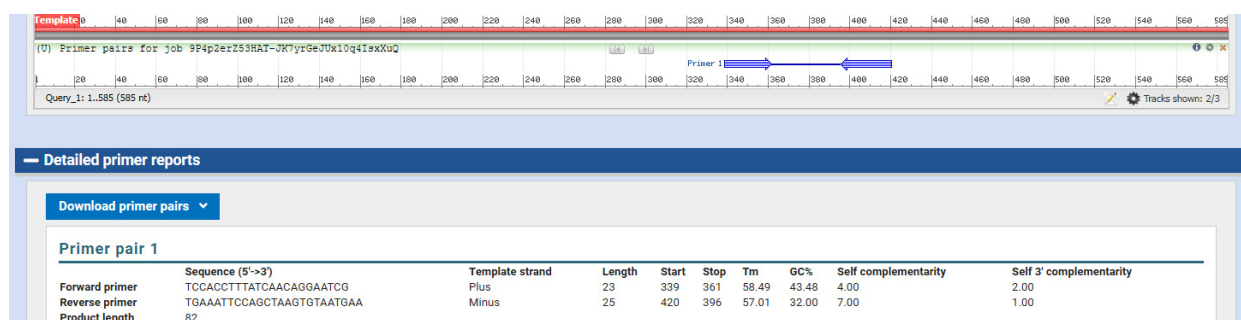


Рисунок 14. Скриншот окна программы Primer-BLAST с подобранной парой праймеров.

Данная пара праймеров была выровнена в программе Primer-BLAST на 71 последовательность (список) гена цитохром оксидазы (COI) *Acheta domesticus* для подтверждения отсутствия значимых мисматчей внутри вида, что будет характеризовать показатель точности разрабатываемой методики (теоретически обоснованный показатель).

Список нуклеотидных последовательностей гена цитохром оксидазы (COI) *Acheta domesticus* для выравнивания подобранных праймеров:

1. >[PX022376.1](#) *Acheta domesticus* isolate Ad1.9 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds; mitochondrial
2. >[MN176150.1](#) *Acheta domesticus* isolate Cri_EG cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
3. >[MN176149.1](#) *Acheta domesticus* isolate Cri_CC2 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
4. >[MN176148.1](#) *Acheta domesticus* isolate Cri_CC1 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
5. >[LR585071.1](#) *Acheta domesticus* mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit 1, strain RI_001
6. >[MG382780.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG20089-B12 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
7. >[MG381903.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19856-H06 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
8. >[MG381526.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG20089-F08 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
9. >[MG381272.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19856-D11 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
10. >[MG379696.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG20089-F09 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
11. >[MG379028.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19856-F05 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial

- 12.>[MG377921.1](#) Acheta domesticus voucher BIOUG20089-H11 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 13.>[MG377577.1](#) Acheta domesticus voucher BIOUG19856-F08 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 14.>[MG377428.1](#) Acheta domesticus voucher BIOUG20089-F12 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 15.>[MG376830.1](#) Acheta domesticus voucher BIOUG19856-B08 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 16.>[MG375158.1](#) Acheta domesticus voucher BIOUG19856-H07 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 17.>[MG374536.1](#) Acheta domesticus voucher BIOUG19856-B11 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 18.>[MG373872.1](#) Acheta domesticus voucher BIOUG20089-H09 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 19.>[MG373845.1](#) Acheta domesticus voucher BIOUG19856-H05 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 20.>[MG458975.1](#) Acheta domesticus voucher FDA:CFSAN OR35-001 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 21.>[KR919588.1](#) Acheta domesticus voucher BIOUG19558-F09 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 22.>[KR919579.1](#) Acheta domesticus voucher BIOUG19855-H10 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 23.>[KR919573.1](#) Acheta domesticus voucher BIOUG19556-B09 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 24.>[KR919557.1](#) Acheta domesticus voucher BIOUG19558-B12 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 25.>[KR919489.1](#) Acheta domesticus voucher BIOUG19558-F06 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 26.>[KR919474.1](#) Acheta domesticus voucher BIOUG19556-F06 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial

- 27.>[KR919440.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19557-D08 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 28.>[KR919397.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19855-B10 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 29.>[KR919396.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19558-D10 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 30.>[KR919373.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19557-D05 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 31.>[KR919351.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19557-B12 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 32.>[KR919343.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19558-F11 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 33.>[KR919314.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19855-D11 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 34.>[KR919311.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19557-F06 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 35.>[KR919276.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19855-D06 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 36.>[KR919265.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19557-D10 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 37.>[KR919250.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19855-B02 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 38.>[KR919237.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19557-D12 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 39.>[KR919232.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19855-B08 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 40.>[KR919192.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19556-H10 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 41.>[KR919156.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19558-H09 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial

- 42.>[KR919146.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19558-H07 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 43.>[KR919139.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19556-B06 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 44.>[KR919138.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19556-F05 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 45.>[KR919132.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19556-H07 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 46.>[KR919075.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19556-F09 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 47.>[KR919058.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19556-F08 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 48.>[KR919057.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19557-F11 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 49.>[KR919056.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19855-F09 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 50.>[KR919052.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19556-B12 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 51.>[KR919020.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19556-D08 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 52.>[KR919002.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19557-D06 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 53.>[KR918996.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19556-D09 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 54.>[KR918991.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19556-D07 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 55.>[KR918978.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19855-B06 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 56.>[KR918945.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19558-D11 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial

- 57.>[KR918861.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19558-D12 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 58.>[KR918860.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19558-B11 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 59.>[KR918857.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19556-H08 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 60.>[KR918851.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19855-F06 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 61.>[KR918841.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19556-F10 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 62.>[KR918837.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19558-D09 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 63.>[KR918836.1](#) *Acheta domesticus* voucher BIOUG19557-H07 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 64.>[OK504623.1](#) *Acheta domesticus* breed Farm mitochondrion, complete genome
- 65.>[MZ440654.1](#) *Acheta domesticus* mitochondrion, complete genome
- 66.>[MZ197987.1](#) *Acheta domesticus* cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) gene, partial cds; tRNA-Leu gene, complete sequence; and cytochrome c oxidase subunit 2 (cox2) gene, partial cds; mitochondrial
- 67.>[JX897403.1](#) *Acheta domesticus* isolate Adom cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 68.>[JF419327.1](#) *Acheta domesticus* isolate Ach-dom-4 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 69.>[HM422223.1](#) *Acheta domesticus* voucher BC ZSM ORT 00280 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 70.>[OR974811.1](#) *Acheta domesticus* voucher INV06947 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- 71.>[OR974760.1](#) *Acheta domesticus* voucher INV06916 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial

В результате анализа подобранных праймеров был выявлен 1 мисматч в обратном праймере в 2 из 71 имеющейся в базе данных последовательностей (рис.15).

>OR974811.1 Acheta domesticus voucher INV06947 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial

```
product length = 82
Forward primer 1 TCCACCTTTATCAACAGGAATCG 23
Template       340 ..... 362

Reverse primer 1 TGAAATCCAGCTAAGTGTAAATGAA 25
Template       421 ...G..... 397
```

>OR974760.1 Acheta domesticus voucher INV06916 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial

```
product length = 82
Forward primer 1 TCCACCTTTATCAACAGGAATCG 23
Template       340 ..... 362

Reverse primer 1 TGAAATCCAGCTAAGTGTAAATGAA 25
Template       421 ...G..... 397
```

Рисунок 15. Скриншот окна программы Primer-BLAST с указанием найденных мисматчей.

Мисматч приходится на 4 нуклеотид в 5' последовательности обратного праймера, а именно A/G, что не должно сказаться на эффективности реакции в случае обнаружения именно такой последовательности.

Для теоретического обоснование специфичности подобранных праймеров их нуклеотидная последовательность была выровнена на участок ДНК близкородственных видов (Рис.16а и 16б).

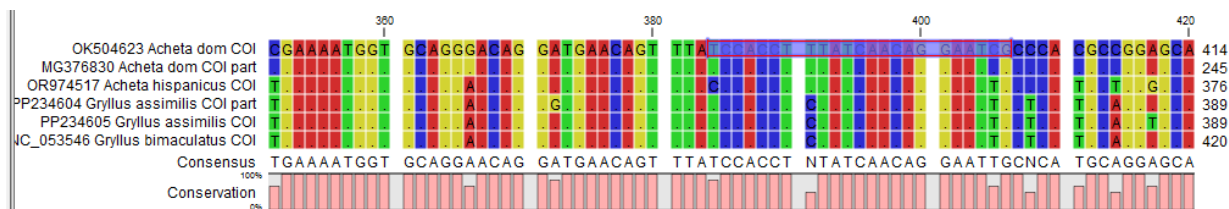


Рисунок 16а. Выравнивание прямого праймера на нуклеотидные последовательности участка гена цитохром оксидазы (COI) различных видов сверчков, относящихся к семейству *Gryllidae*.

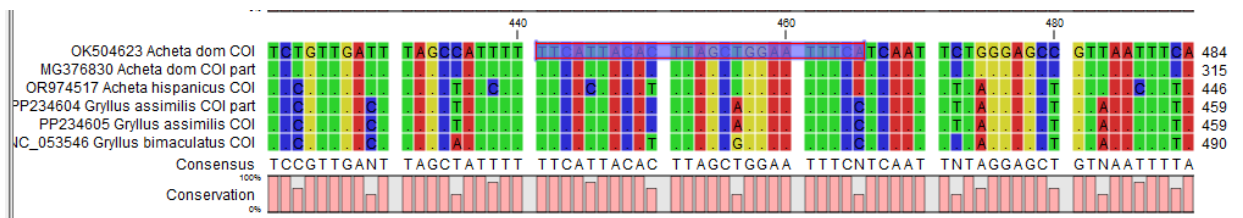


Рисунок 16б. Выравнивание обратного праймера на нуклеотидные последовательности участка гена цитохром оксидазы (COI) различных видов сверчков, относящихся к семейству *Gryllidae*.

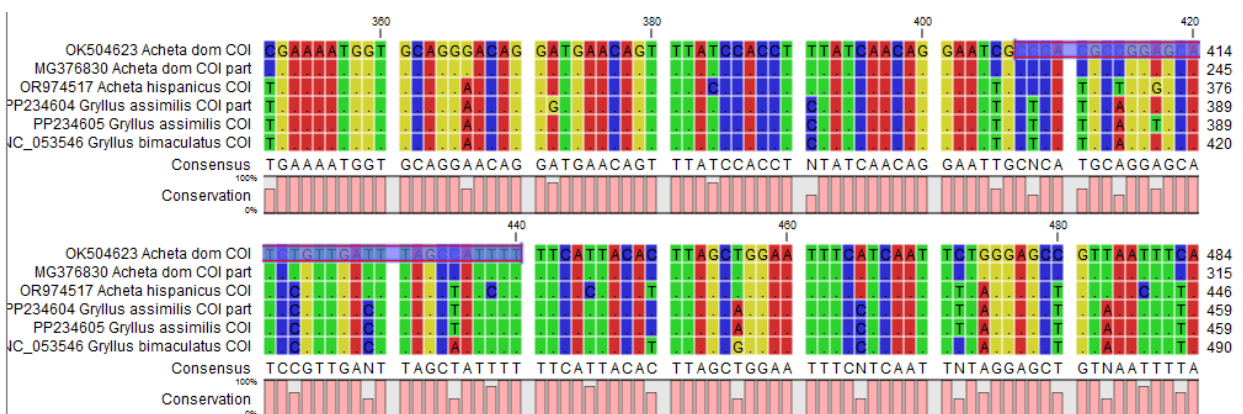


Рисунок 17. Выравнивание межпраймерной последовательности на нуклеотидные последовательности участка гена цитохром оксидазы (COI) различных видов сверчков, относящихся к семейству *Gryllidae* с целью дизайна Такман зондов для повышения специфичности реакции

Из рис. 16 и 17 видно, что специфичность праймерной системы будет обеспечиваться прямым праймером, который имеет тугоплавкий видоспецифический мисматч на его 3'конце. Так, например, расчетная температура плавления прямого праймера при заданных параметрах реакционной смеси составляет 61,8 °С. Наличие же указанного мисматча понижает температура плавления прямого праймера до 55,4 °С, т.е. на 6,4 °С согласно программе OligoAnalyzer. Данные параметры термодинамики плавления прямого праймера позволят заданную специфичность реакции при температуре отжига реакции в амплификаторе в диапазоне 59-61 °С.

Прямой праймер образует единственно возможную вторичную структуру (шпильку) (рис.18) с расчетной температурой плавления 42,5 °С, что также не должно сказываться на эффективности ПЦР.

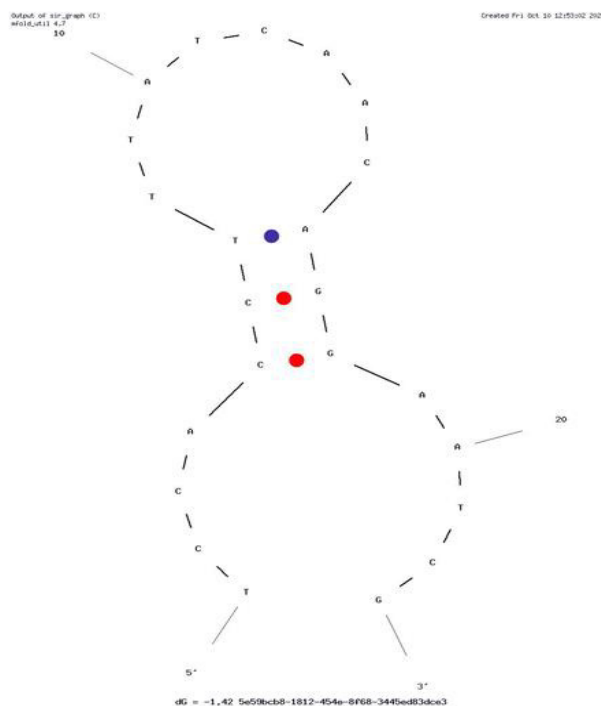


Рисунок 18. Вторичная структура прямого праймера.

Расчетная температура плавления обратного праймера при заданных параметрах реакционной смеси составляет 60,7 °С. При наличии всего двух легкоплавких мисматча при температуре отжига реакции в 60 °С праймер будет дополнять специфичности в дополнении к прямому праймеру.

Значимых вторичных структур обратный праймер не образует. Гетеродимеров оба праймера при температуре отжига реакции более 59°С не образуют.

Такман зонд подбирался вручную с наличием двух тугоплавких мисматчей в первой половине его нуклеотидной последовательности (рис.14)

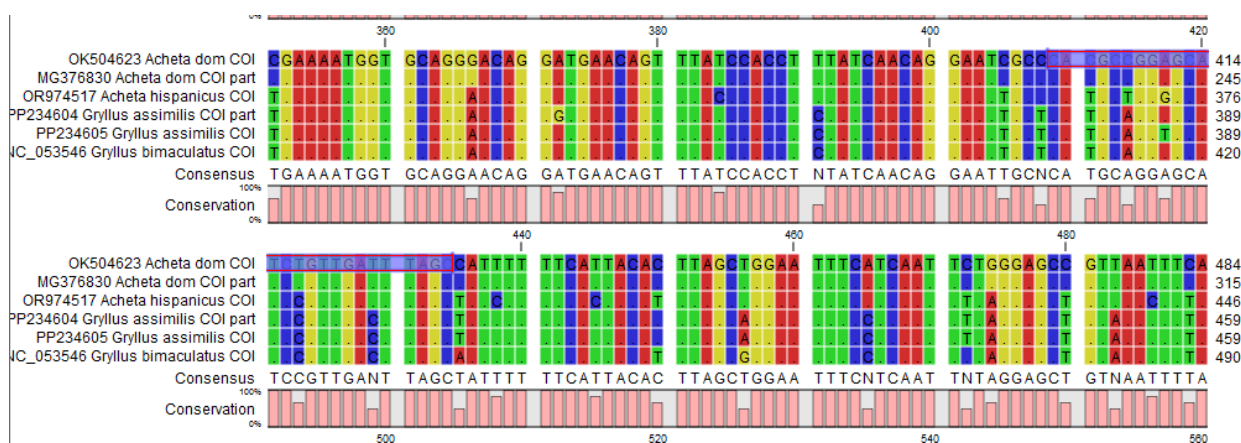


Рисунок 19. Выравнивание Такман зонда 5'- R6G- CAC GCC GGA GCA TCT GTT GAT TTA GCC -BHQ2 -3' на нуклеотидные последовательности участка гена цитохром оксидазы (COI) различных видов сверчков, относящихся к семейству *Gryllidae*.

Расчетная температура плавления выбранного Такман зонда составляет 69,4 °С, что более чем на 7 °С превышает максимальную температуру плавления праймеров и удовлетворяет требованиям к дизайну зондов для ПЦР в реальном времени. Значимых вторичных структур с праймерами и шпилек зонд не образует.

Подбор оптимальных методов выделения ДНК из насекомых

Конечной целью экстракции ДНК является получение ДНК с высокой молекулярной массой и без примесей. Разрушение клеточных и ядерных мембран является первым необходимым этапом для получения очищенной ДНК. Для этого были использованы детергенты (поверхностно-активные вещества), такие как додецилсульфат натрия (SDS) и СТАВ. В прошлом СТАВ всегда использовался для извлечения ДНК растений и грибов и в настоящее время этот протокол часто используется у насекомых и ракообразных для извлечения ДНК [110]. СТАВ может удалять возможные полисахариды, которые могут соединяться с ДНК. Авторы [111] показали, что этап инкубации СТАВ может улучшить качество ДНК, особенно пластидной ДНК и в случае амплификации длинных участков ДНК. Метод экстракции с использованием ионообменной

смолы Chelex-100 часто используется для выделения ДНК из небольшого количества клеток путем обработки кипячением и одновременной защиты ДНК от воздействия кипячения специальными полимерными частицами [112]. Анализируя различные литературные источники, метод СТАВ обеспечивает более высокую чистоту образца ДНК при выделении образцов, законсервированных в 75% и 95% этаноле. Два метода на основе Chelex-100 и SDS потребляют меньше времени по сравнению с методом СТАВ, поскольку обычная стадия фенол-хлороформ не используется.

Для ускорения методологии выделения ДНК на основе СТАВ можно использовать различные средства автоматизации процесса с использованием силики или магнитных частиц для осаждения на них высокомолекулярной ДНК из лизата после обработки его хлороформом (наборы выделения ДНК «СОРБ-ГМО-Б» (ЦТАБ+сорбент) и «ГМО-МагноСорб-Автомат KF», ООО «Синтол»).

4. Основные выводы

В условиях экспоненциального роста мирового населения наблюдается острая необходимость в разработке альтернативных источников белка, способных удовлетворить растущие потребности в пище. В этом контексте насекомые, благодаря своему богатому химическому составу и высокому содержанию белка, рассматриваются как перспективный объект для дальнейших исследований и потенциального применения в пищевой индустрии. Несмотря на очевидные преимущества, на текущий момент их интеграция в массовый пищевой сектор остается ограниченной. Одним из перспективных подходов к решению данной проблемы является инкорпорирование насекомых в традиционные продукты питания, такие как мучные кондитерские изделия. Этот метод представляет собой инновационное решение, которое может значительно расширить ассортимент доступных белковых источников и способствовать повышению питательности продукции. Однако прежде всего необходимо создать надежные инструменты контроля таких продуктов в том числе и обосновать безопасность применяемых источников белка. В связи с чем на 1 этапе настоящей НИР были:

1. Изучены современные аспекты применения сырья из *Acheta domesticus* в пищевой промышленности, а также проанализированы существующие международные практики и нормативная база.

2. Проведены комплексные исследования по оценке пищевой ценности и безопасности продовольственного сырья, полученного из насекомых. В рамках этой работы оценены показатели безопасности, биологической ценности и усвояемости белка.

3. Разработаны и валидированы современные аналитические методы для контроля качества и подлинности нового вида пищевой продукции:

- Апробирован точный метод количественного определения хитина в биомассе сверчка и в пробах белка, полученного из сверчковой муки.

- Выбраны и оптимизированы протоколы подготовки проб для обеспечения точности и воспроизводимости методики.

- Проведен анализ нуклеотидных последовательностей праймеров *in silico* с целью подтверждения их специфичности и пригодности для обнаружения соответствующих видоспецифичных целевых генов и подобраны оптимальные методы пробоподготовки и выделения нуклеиновых кислот.

4. Для обеспечения метрологического обеспечения разработанных методик разработаны проекты ГСО:

- ГСО глюкозамина для количественного анализа хитина.

- ГСО вида *Acheta Domesticus* для постановки ПЦР-анализа.

Таким образом, в ходе работы создана комплексная научно-методическая база, позволяющая оценивать качество, безопасность и проводить идентификацию продовольственного сырья из насекомых, что необходимо для его внедрения в пищевую промышленность и контроля.

Список литературы:

1. Amoah, I., Cobbinah, J.C., Yeboah, J.A., Essiam, F.A., Lim, J.J., Tandoh, M.A., Rush, E. (2023). Edible insect powder for enrichment of bakery products. A review of nutritional, physical characteristics and acceptability of bakery products to consumers. *Future Foods*, 8, Article 100251. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2023.100251>.
2. Полубесова, М.А., Мечтаева, Е.В., Мещеряков, А.А., Чернов, А.Д., Журавлева, А.З., Ситнов, В.Ю. (2024). Альтернативные источники белка: основные характеристики, экологичность и безопасность. *Пищевая промышленность*, 1, 39-46. <https://doi.org/10.52653/PPI.2024.1.1.007>.
3. Полубесова М.А., Мечтаева Е.В., Чернов А.Д., Кузнецова К.Г., Журавлева А.З., Ситнов В.Ю., Кузнецова О.А. Влияние добавления муки из сверчка домашнего (*Acheta domesticus*) на характеристики овсяного печенья. *Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет)*. 2025;(2):232-245. <https://doi.org/10.31677/2072-6724-2025-75-2-232-245>.
4. Castro Delgado M., Chambers IV E., Carbonell-Barrachina A. et al. Consumer acceptability in the USA, Mexico, and Spain of chocolate chip cookies made with partial insect powder replacement, *Journal of Food Science*, 2020, No. 85(6), pp. 1621–1628, DOI: 10.1111/1750-3841.15175.
5. Biró, B., Sipos, M.A., Kovács A., Badak-Kerti, K., Pásztor-Huszár, K., Gere A. (2020). Cricket-enriched oat biscuit: technological analysis and sensory evaluation. *Foods*, 9, Article 1561. <https://doi.org/10.3390/foods9111561>.
6. Kowalczewski, P.L., Gumienna, M., Rybicka, I., Górna, B., Sarbak, P., Dziejic, K., Kmiecik, D. (2021). Nutritional value and biological activity of gluten-free bread enriched with cricket powder. *Molecules*, 26, Article 1184. <https://doi.org/10.3390/molecules26041184>.
7. Çabuk, B. (2021). Influence of grasshopper (*Locusta Migratoria*) and mealworm (*Tenebrio molitor*) powders on the quality characteristics of protein rich muffins: nutritional, physicochemical, textural and sensory aspects. *Journal of Food Measurement and Characterization*. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00967-x>.
8. Bread enriched with cricket powder (*Acheta domesticus*): A technological, microbiological and nutritional evaluation / A. Osimani, V. Milanović, F. Cardinali [et.al.] // *Innovative food science & emerging technologies*. – 2018. –No 48. – P. 150–163. DOI: 10.1016/j.ifset.2018.06.007.
9. Cricket-Enriched Oat Biscuit: Technological Analysis and Sensory Evaluation / B. Biró, M.A. Sipos, A. Kovács [et.al.] // *Foods*. – 2020. – No 9. – P. 1–17. – DOI: 10.3390/foods9111561.
10. В.П. Варламов, А.В. Ильина, Б.Ц. Шагдарова, А.П. Луньков, И.С. Мысякина Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты. *Успехи биологической химии*, т. 60, 2020, с. 317–368.
11. Григорьева Е.В. Обоснование переработки гаммаруса Балтийского моря (*Gammarus lacustris*) методами биотехнологии: автореф. дис... канд. хим. наук. – М.: ВНИРО, 2008. – 24 с.

12. Иванов П.А. Биомедицинские материалы на основе хитина и хитозана. – М.: Наука, 2020. – 430 с.
13. Ежова Е. А. Обоснование и разработка технологии пищевого хитозана и препаратов на его основе : дис... канд. техн. наук. – М. : ВНИРО, 2005. – 127 с.
14. Селиверстов А.Ф. и др. Композиционные материалы на основе хитина для сорбции ионов металлов из водных растворов // Журнал прикладной химии. – 1997. – Т.70, № 1. – С. 148–152.
15. Giraud-Guille M.M. Chitin-protein supramolecular order in arthropod cuticles analogies with liquid crystals // 1 st Stummerschol of European Chitin society «EUCHIS» «Chitin in life sciences». Lion, 1996. – P. 110.
16. Р 4.1.1672-03 Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. Введ. 30.06.2004. – М.: Минздрав РФ, 2004. – ф240 с.
17. Тимофеева К.Г. Технология получения биологически активных хитин-минеральных препаратов из ракообразных электрическим способом: дис. ... канд. техн. наук: 03.01.06. – М.: ВНИРО, 2011. – 212 с.
18. Быкова В.М., Немцев С.В. Сырьевые источники и способы получения хитина и хитозана: хитин, его строение и свойства. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. Под ред. Н.Г. Скрыбина. – М.: Рос. акад. наук, Центр "Биоинженерия". Общерос. обществ. орг. "Рос. хитиновое об-во". – 2002. – с.7-23.
19. Xiaolan Zhu, Jibao Cai, Jun Yang, Qingde Su. Determination of glucosamine in impure chitin samples by high-performance liquid chromatography // Carbohydrate Research. – 2005. – Vol. 340, Is. 10. – P. 1732-1738.
20. Hagen S. R. High-performance liquid chromatographic quantitation of phenylthiocarbamyl muramic acid and glucosamine from bacterial cell walls // Journal of Chromatography A. – 1993. – № 632(1). – P. 63–68.
21. Eikenes M., Fongen M., Roed L., & Stenstrøm Y. Determination of chitosan in wood and water samples by acidic hydrolysis and liquid chromatography with online fluorescence derivatization // Carbohydrate Polymers. – 2005. – № 61(1). – P. 29–38.
22. Aghazadeh-Habashi A., Carran J., Anastassiades T., & Jamali F. High performance liquid chromatographic determination of N-butyryl glucosamine in rat plasma // Journal of Chromatography B. – 2005. – № 819(1). – P. 91–96.
23. Zhou J. Z., Waszkuc T., & Mohammed F. Determination of glucosamine in raw materials and dietary supplements containing glucosamine sulfate and/or glucosamine hydrochloride by high-performance liquid chromatography with FMOC-Su derivatization: Collaborative study // Journal of AOAC International. – 2005. – № 88(4). – P. 1048–1058.
24. Díaz J., Lliberia J. L., Comellas L., & Broto-Puig F. Amino acid and amino sugar determination by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate followed by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection // Journal of Chromatography A. – 1996. – № 719(1). P. 171–179.
25. Wang X., Chen X., Chen L., Wang B., Peng C., Wei Y. Optimizing high-performance liquid chromatography method for quantification of glucosamine using 6-

aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate derivatization in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study // *Biomedical Chromatography*. –2008. – № 22(11). P. 1265–1271.

26. Han X., Heinonen M. Development of ultra-high performance liquid chromatographic and fluorescent method for the analysis of insect chitin // *Food chemistry*. – 2021. – Vol. 334. – P. 1275-77.

27. M.O. Punín Crespo, M. Vilasoa Martínez, J. López Hernández, M.A. Lage Yusty. High-performance liquid chromatographic determination of chitin in the snow crab, *Chionoecetes opilio* // *Journal of Chromatography A*. – 2006. – Vol. 1116, Issues 1–2. – P. 189-192.

28. Joel Brugnerotto, Jacques Desbrières, George Roberts, Marguerite Rinaudo. Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography // *Polymer*. – 2001. – Vol. 42, Issue 25. – P. 09921-09927.

29. Hase S. Amino sugar analysis by gas-liquid chromatography // *Journal of Biochemistry*. – 1969. – № 66. – P. 57–62.

30. Z. Holan, J. Votruba, V. Vlasáková. New method of chitin determination based on deacetylation and gas-liquid chromatographic assay of liberated acetic acid // *Journal of Chromatography A*. – 1980. – Vol. 190, Issue 1. – P. 67-76.

31. G. Stoev, A. Velichkov. Direct determination of acetic acid in strongly acidic hydrolysates of chitin and chitin-containing biological products by capillary gas chromatography // *Journal of Chromatography A*. – 1991. – Vol. 538, Issue 2. P. 431-434.

32. Tariq Bhatti, Robin E. Chambers, John R. Clamp. The gas chromatographic properties of biologically important N-acetylglucosamine derivatives, monosaccharides, disaccharides, trisaccharides, tetrasaccharides and pentasaccharides // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 1970. – Vol. 222, Issue 2. P. 339-347.

33. Yajima H., Morita M., Hashimoto M., Sashiwa H., Kikuchi T., & Ishii T. Complex formation of chitosan with iodine and its structure and spectroscopic properties - Molecular assembly and thermal hysteresis behavior // *International Journal of Thermophysics*. – 2001. – № 22. P. 1265–1283.

34. Sujeetha M., Sharmila S., Jayanthi J., & Ragnathan M. G. Quantitative and qualitative analysis of chitin and chitosan from the shell of the mud crab, *Scylla* // *International Journal of Pharmacy & Therapeutics*. – 2015. № 6(2). P. 69– 72.

35. Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F. M., Argüelles-Monal W., Desbrières J., & Rinaudo M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization // *Polymer*. – 2001. – № 42. – P. 3569–3580.

36. Kumirska J., Czerwicka M., Kaczyński Z., Bychowska A., Brzozowski K., Thöming J., & Stepnowski P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan // *Marine Drugs*. – 2010. – № 8(5).– P. 567–1636.

37. Brunner E.; Ehrlich H.; Schupp P.; Hedrich R.; Hunoldt S.; Kammer M.; Machill S.; Paasch S.; Bazhenov V.V.; Kurek D.V.; Arnold T.; Brockmann S.; Ruhnow M.; Born R. Chitinbased scaffolds are an integral part of the skeleton of the marine

demosponge *Ianthella basta* // *Journal of Structural Biology*. – 2009. – № 168. P. 539–547.

38. Juárez-de la Rosa B.A.; Ardisson P.-L.; Azamar-Barrios J.A.; Quintana P.; Alvarado-Gil J.J. Optical, thermal, and structural characterization of the sclerotized skeleton of two antipatharian coral species // *Materials Science and Engineering A*. – 2007. – № 27. P. 880–885.

39. Moreira M. F., dos Santos A. S., Marotta H. R., Mansur J. F., Ramos I. B., Machado E.A., Souza G. H. M. F., Eberlin M. N., Kaiser C. R., Kramer K. J., Muthukrishnan S., & Vasconcellos A. M. H. A chitin-like component in *Aedes aegypti* eggshells, eggs and ovaries. // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2007. – № 37(12). P. 1249–1261.

40. Kang X., Kirui A., Muszyński A., Widanage M. C. D., Chen A., Azadi P., Wang P., Mentink-Vigier F., & Wang T. Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR // *Nature Communications*. – 2007. – № 9. – P. 2747.

41. Paulino A. T., Simionato J. I., Garcia, J. C., & Nozaki, J. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides // *Carbohydrate Polymers*. – 2006. № 64. – P. 98–103.

42. Brunner E., Ehrlich H., Schupp P., Hedrich R., Hunoldt S., Kammer M., Machill S., Paasch S., Bazhenov V. V., Kurek D. V., Arnold T., Brockmann S., Ruhnnow M., & Born, R. Chitin-based scaffolds are an integral part of the skeleton of the marine demosponge *Ianthella basta* // *Journal of Structural Biology*. – 2009. – № 168(3). – P. 539–547.

43. Elson L. A., & Morgan W. T. J. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine // *Biochemical Journal*. – 1933. – № 27. – P. 1824–1828.

44. Katano H., Takakuwa M., Hayakawa H., & Kimoto H. Determination of chitin based on the colorimetric assay of glucosamine in acidic hydrolysate // *Analytical Sciences*. – 2016. – № 32, – P. 701–703.

45. Ehrlich H., Krautter M., Hanke T., Simon P., Knieb C., Heinemann S., & Worch, H. First evidence of the presence of chitin in skeletons of marine sponges. Part II. Glass sponges (Hexactinellida: Porifera) // *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. – 2007. – № 308. – P. 473–483.

46. Boden N., Sommer U., & Spindler K. D. Demonstration and characterization of chitinases in the *Drosophila* Kc cell line // *Insect Biochemistry*. – 1985. – № 15. – P. 19–23.

47. Itakura Y., Nakamura-Tsuruta S., Kominami J., Tateno H., & Hirabayashi J. Sugar-binding profiles of chitin-binding lectins from the hevein family: A comprehensive study // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – № 18. – P. 1160.

48. Klusemann J., Kleinow W., & Peters W. The hard parts (trophi) of the rotifer *Mastax* do contain chitin: evidence from studies on *Brachionus plicatilis* // *Histochemistry*. – № 94. – P. 277–283.

49. Черкасова Е.И., Смирнова Л.А., Смирнов В.Ф. Измерение молекулярной массы олигомеров хитозана // *Высокомолекулярные соединения, серия Б.* – 2006. – том 48, № 3. – с. 557-560.

50. Ahmed MU, Hasan Q, Hossain M, Masato S, Tamiya E (2010) Meat species identification based on the loop mediated isothermal amplification and electrochemical DNA sensor. *Food Control* 21:599–605.

51. Yoshikawa H, Tamiya E, Yasin HM, Ahmed MU (2014) A highly sensitive gold nanoparticle bioprobe based electrochemical immunosensor using screen printed graphene biochip. *RSC Adv* 4(102):58460–58466.

52. López-Calleja IM, de la Cruz S, Pegels N, González I, Martín R, García T (2014) Sensitive and specific detection of almond (*Prunus dulcis*) in commercial food products by real-time PCR. *LWT Food Sci Technol* 56:31–39.

53. Shrestha HK, Hwu K, Chang M (2010) Advances in detection of genetically engineered crops by multiplex polymerase chain reaction methods. *Trends Food Sci Technol* 21:442–452.

54. Purcell MK, Thompson RL, Garver KA, Hawley LM, Batts WN, Sprague L, Sampson C, Winton JR (2013) Universal reverse transcriptase real-time PCR for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Dis Aquat Org* 106:103–115.

55. Salihah, N.T., Hossain, M.M., Lubis, H. et al. Trends and advances in food analysis by real-time polymerase chain reaction. *J Food Sci Technol* 53, 2196–2209 (2016). <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2205-0>.

56. Садыкова Э.О., Тышко Н.В., Никитин Н.С., Требух М.Д., Шестакова С.И. Методы контроля за пищевой продукцией нового вида, полученной из насекомых: протокол ПЦР-анализа для выявления и идентификации насекомых *Hermetia Illucens* на основе зонда и праймерной системы HEI-COI // *Вопросы питания.* 2023. Т. 92, № 1. С. 36-44. DOI: <https://doi.org/10.33029/0042-8833-2023-92-1-36-44>.

57. Document 32022R0188. Commission Implementing Regulation (EU) 2022/188 of 10 February 2022 authorising the placing on the market of frozen, dried and powder forms of *Acheta domesticus* as a novel food under Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council, and amending Commission Implementing Regulation (EU) 2017/2470 (Text with EEA relevance) C/2022/695 OJ L 30, February 11, 2022.

58. <https://www.food.gov.uk/news-alerts/news/a-third-of-uk-consumers-are-willing-to-try-lab-grown-meat-and-a-quarter-would-try-insects> - дата обращения 08.10.2025.

59. Veys P., Baeten V. Protocol for the isolation of processed animal proteins from insects in feed and their identification by microscopy. *Food Control.* 2018;92:496–504. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.05.028.

60. Pečová M., Javůrková Z., Bartlová M., Pospiech M. Detection of edible insect as a component of snack bars using histochemical method. *J. Food Compos. Anal.* 2024;132:106312. doi: 10.1016/j.jfca.2024.106312.

61. Belghit I., Lock E.-J., Fumière O., Lecrenier M.-C., Renard P., Dieu M., Berntssen M.H., Palmblad M., Rasinger J.D. Species-specific discrimination of insect

meals for aquafeeds by direct comparison of tandem mass spectra. *Animals*. 2019;9:222. doi: 10.3390/ani9050222.

62. Francis F., Mazzucchelli G., Baiwir D., Debode F., Berben G., Caparros Megido R. Proteomics based approach for edible insect fingerprinting in novel food: Differential efficiency according to selected model species. *Food Control*. 2020;112:107135. doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107135.

63. Ulrich S., Kühn U., Biermaier B., Piacenza N., Schwaiger K., Gottschalk C., Gareis M. Direct identification of edible insects by MALDI-TOF mass spectrometry. *Food Control*. 2017;76:96–101. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.01.010.

64. Karnaneedi S., Johnston E.B., Bose U., Juhász A., Broadbent J.A., Ruethers T., Jerry E.M., Kamath S.D., Limviphuvadh V., Stockwell S., et al. The Allergen Profile of Two Edible Insect Species—*Acheta domesticus* and *Hermetia illucens*. *Mol. Nutr. Food Res*. 2024;68:2300811. doi: 10.1002/mnfr.202300811.

65. Jeong K.Y., Son M., Lee J.Y., Park K.H., Lee J.-H., Park J.-W. Allergenic Characterization of 27-kDa Glycoprotein, a Novel Heat Stable Allergen, from the Pupa of Silkworm, *Bombyx mori*. *J. Korean Med. Sci*. 2015;31:18–24. doi: 10.3346/jkms.2016.31.1.18.

66. Liu Z., Xia L., Wu Y., Xia Q., Chen J., Roux K.H. Identification and characterization of an arginine kinase as a major allergen from silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *Int. Arch. Allergy Immunol*. 2009;150:8–14. doi: 10.1159/000210375.

67. Pospiech M., Pečová M., Bartlová M., Javůrková Z., Kopecká A., Šebelová K., Pospíšil O., Kulma M., Folke J., Tremlová B., et al. Development of Indirect Sandwich ELLA for Detection of Insects in Food. *Appl. Sci*. 2024;14:10794. doi: 10.3390/app142310794.

68. Son Y.-J., Hwang I.-K., Nho C.W., Kim S.M., Kim S.H. Determination of carbohydrate composition in mealworm (*Tenebrio molitor* L.) larvae and characterization of mealworm chitin and chitosan. *Foods*. 2021;10:640. doi: 10.3390/foods10030640.

69. Poma G., Cuykx M., Da Silva K.M., Iturrospe E., van Nuijs A.L., van Huis A., Covaci A. Edible insects in the metabolomics era. First steps towards the implementation of entometabolomics in food systems. *Trends Food Sci. Technol*. 2022;119:371–377. doi: 10.1016/j.tifs.2021.12.018. [DOI] [Google Scholar]

70. Hrbek V., Zdenkova K., Jilkova D., Cermakova E., Jiru M., Demnerova K., Pulkrabova J., Hajslova J. Authentication of Meat and Meat Products Using Triacylglycerols Profiling and by DNA Analysis. *Foods*. 2020;9:1269. doi: 10.3390/foods9091269.

71. Tata A., Massaro A., Marzoli F., Miano B., Bragolusi M., Piro R., Belluco S. Authentication of edible insects' powders by the combination of DART-HRMS signatures: The first application of ambient mass spectrometry to screening of novel food. *Foods*. 2022;11:2264. doi: 10.3390/foods11152264. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

72. Tramuta C., Gallina S., Bellio A., Bianchi D.M., Chiesa F., Rubiola S., Romano A., Decastelli L. A set of multiplex polymerase chain reactions for genomic

detection of nine edible insect species in foods. *J. Insect Sci.* 2018;18:3. doi: 10.1093/jisesa/iey087.

73.Köppel R., Schum R., Habermacher M., Sester C., Piller L.E., Meissner S., Pietsch K. Multiplex real-time PCR for the detection of insect DNA and determination of contents of *Tenebrio molitor*, *Locusta migratoria* and *Achaeta domestica* in food. *Eur. Food Res. Technol.* 2019;245:559–567. doi: 10.1007/s00217-018-03225-5.

74.Hillinger S., Saeckler J., Domig K.J., Dobrovolny S., Hochegger R. Development of a DNA Metabarcoding Method for the Identification of Insects in Food. *Foods.* 2023;12:1086. doi: 10.3390/foods12051086.

75. Jilkova D., Marien A., Hulin J., Zdenkova K., Fumiere O., Cermakova E., Berben G., Debode F. Detection of *Acheta domesticus* by real-time PCR in food and feed. *J. Insects Food Feed.* 2024;1:1–16. doi: 10.1163/23524588-00001067.

76.Cermakova E., Lencova S., Mukherjee S., Horka P., Vobruba S., Demnerova K., Zdenkova K. Identification of Fish Species and Targeted Genetic Modifications Based on DNA Analysis: State of the Art. *Foods.* 2023;12:228. doi: 10.3390/foods12010228.

77.Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J. *Metody Molekulární Biologie*. Masarykova Univerzita; Brno, Czech Republic: 2005. [Google Scholar]

78.Dingle T.C., Sedlak R.H., Cook L., Jerome K.R. Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances. *Clin. Chem.* 2013;59:1670–1672. doi: 10.1373/clinchem.2013.211045.

79.Huggett J.F., O’Grady J., Bustin S. qPCR, dPCR, NGS—A journey. *Biomol. Detect. Quantif.* 2015;3:A1. doi: 10.1016/j.bdq.2015.01.001.

80. Garino C., Winter R., Broll H., Winkel M., Braeuning A., Reich F., Zagon J. Development and validation of a novel real-time PCR protocol for the detection of buffalo worm (*Alphitobius diaperinus*) in food. *Food Control.* 2022;140:109138. doi: 10.1016/j.foodcont.2022.109138.

81.Kim M.-J., Kim S.-Y., Jung S.-K., Kim M.-Y., Kim H.-Y. Development and validation of ultrafast PCR assays to detect six species of edible insects. *Food Control.* 2019;103:21–26. doi: 10.1016/j.foodcont.2019.03.039.

82.Mohamadzade Namin S., Yeasmin F., Choi H.W., Jung C. DNA-based method for traceability and authentication of *Apis cerana* and *A. dorsata* honey (Hymenoptera: Apidae), using the NADH dehydrogenase 2 gene. *Foods.* 2022;11:928. doi: 10.3390/foods11070928.

83.Marien A., Sedefoglu H., Dubois B., Maljean J., Francis F., Berben G., Guillet S., Morin J.F., Fumière O., Debode F. Detection of *Alphitobius diaperinus* by Real-Time Polymerase Chain Reaction With a Single-Copy Gene Target. *Front. Vet. Sci.* 2022;9:718806. doi: 10.3389/fvets.2022.718806.

84.Zagon J., di Rienzo V., Potkura J., Lampen A., Braeuning A. A real-time PCR method for the detection of black soldier fly (*Hermetia illucens*) in feedstuff. *Food Control.* 2018;91:440–448. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.04.032.

85.Debode F., Marien A., Gérard A., Francis F., Fumière O., Berben G. Development of real-time PCR tests for the detection of *Tenebrio molitor* in food and

feed. *Food Addit. Contam. Part A.* 2017;34:1421–1426. doi: 10.1080/19440049.2017.1320811.

86. Marien A., Dubois B., Anselmo A., Veys P., Berben G., Kohl C., Maljean J., Guillet S., Morin J.F., Debode F. Detection of *Bombyx mori* as a Protein Source in Feedingstuffs by Real-Time PCR with a Single-Copy Gene Target. *Agriculture.* 2024;14:1996. doi: 10.3390/agriculture14111996.

87. Robin E.D., Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J. Cell. Physiol.* 1988;136:507–513. doi: 10.1002/jcp.1041360316.

88. Paracchini V., Petrillo M., Lievens A., Kagkli D.-M., Angers-Loustau A. Nuclear DNA barcodes for cod identification in mildly-treated and processed food products. *Food Addit. Contam. Part A.* 2019;36:1–14. doi: 10.1080/19440049.2018.1556402.

89. Ballin N.Z., Vogensen F.K., Karlsson A.H. Species determination—Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Sci.* 2009;83:165–174. doi: 10.1016/j.meatsci.2009.06.003.

90. Meiklejohn K.A., Damaso N., Robertson J.M. Assessment of BOLD and GenBank—Their accuracy and reliability for the identification of biological materials. *PLoS ONE.* 2019;14:e0217084. doi: 10.1371/journal.pone.0217084.

91. Ratnasingham S., Hebert P.D. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>) *Mol. Ecol. Notes.* 2007;7:355–364. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x.

92. Kjærandsen J. Current state of DNA barcoding of Sciaroidea (Diptera)—Highlighting the need to build the reference library. *Insects.* 2022;13:147. doi: 10.3390/insects13020147.

93. Yu D.W., Ji Y., Emerson B.C., Wang X., Ye C., Yang C., Ding Z. Biodiversity soup: Metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods Ecol. Evol.* 2012;3:613–623. doi: 10.1111/j.2041-210X.2012.00198.x.

94. Siozios S., Massa A., Parr C.L., Verspoor R.L., Hurst G.D. DNA barcoding reveals incorrect labelling of insects sold as food in the UK. *PeerJ.* 2020;8:e8496. doi: 10.7717/peerj.8496.

95. Hebert P.D., Ratnasingham S., De Waard J.R. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 2003;270((Suppl. 1)):S96–S99. doi: 10.1098/rsbl.2003.0025.

96. Zdenkova K., Akhatova D., Fialova E., Krupa O., Kubica L., Lencova S., Demnerova K. Detection of meat adulteration: Use of efficient and routine-suited multiplex polymerase chain reaction-based methods for species authentication and quantification in meat products. *J. Food Nutr. Res.* 2018;57:351.

97. Barido F.H., Desti D., Pramono A., Abdurrahman Z.H., Volkandari S.D., Cahyadi M. Validating duplex-PCR targeting ND2 for bovine and porcine detection in meat products. *Food Chem. Mol. Sci.* 2023;7:100181. doi: 10.1016/j.fochms.2023.100181.

98. Watanabe S., Masamura N., Satoh S.-y., Hirao T. Technique for the identification of insect species in processed foods based on three short DNA sequences. *Food Control*. 2023;153:109908. doi: 10.1016/j.foodcont.2023.109908.

99. Zhou X., Li Y., Liu S., Yang Q., Su X., Zhou L., Tang M., Fu R., Li J., Huang Q. Ultra-deep sequencing enables high-fidelity recovery of biodiversity for bulk arthropod samples without PCR amplification. *GigaScience*. 2013;2:2047-217X-2-4. doi: 10.1186/2047-217X-2-4.

100. Giusti A., Spatola G., Mancini S., Nuvoloni R., Armani A. Novel foods, old issues: Metabarcoding revealed mislabeling in insect-based products sold by e-commerce on the EU market. *Food Res. Int.* 2024;184:114268. doi: 10.1016/j.foodres.2024.114268.

101. Deiner K., Bik H.M., Mächler E., Seymour M., Lacoursière-Roussel A., Altermatt F., Creer S., Bista I., Lodge D.M., de Vere N., et al. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Mol. Ecol.* 2017;26:5872–5895. doi: 10.1111/mec.14350.

102. Taberlet P., Coissac E., Pompanon F., Brochmann C., Willerslev E. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.* 2012;21:2045–2050. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x.

103. Elbrecht V., Leese F. Can DNA-Based Ecosystem Assessments Quantify Species Abundance. Testing Primer Bias and Biomass–Sequence Relationships with an Innovative Metabarcoding Protocol. *PLoS ONE*. 2015;10:e0130324. doi: 10.1371/journal.pone.0130324.

104. Amoah, I., Cobbinah, J.C., Yeboah, J.A., Essiam, F.A., Lim, J.J., Tandoh, M.A., Rush, E. (2023). Edible insect powder for enrichment of bakery products– A review of nutritional, physical characteristics and acceptability of bakery products to consumers. *Future Foods*, 8, Article 100251. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2023.100251>.

105. Bawa, M., Songsermpong, S., Kaewtapee, C., Chanput, W. (2020). Nutritional, sensory, and texture quality of bread and cookie enriched with house cricket (*Acheta domesticus*) powder. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(8), Article e14601. <https://doi.org/10.1111/jfpp.1460>.

106. Vlahova-Vangelova, D.B., Balev, D.K., Kolev, N.D., Gradinarska, D.N., Dragoev, S.G. (2021). Cricket powder (*Acheta domestica*) as food additive for processing of dry-fermented poultry bars. *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 22(4), 453-461.

107. В.П. Варламов, А.В. Ильина, Б.Ц. Шагдарова, А.П. Луньков, И.С. Мысякина Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты. *Успехи биологической химии*, т. 60, 2020, с. 317–368.

108. ГОСТ ISO 16140-2011 Микробиология продуктов питания и кормов для животных. Протокол валидации альтернативных методов.

109. Козырева А. А., Злотина А. М., Головкин А. С. и др. Конструирование праймеров для ПЦР в программе Primer-BLAST. *Трансляционная медицина*. 2021;8(3): 37-52. DOI: 10.18705/2311-4495- 2021-8-3-37-52.

110. Bossier et al., 2004; Shi et al., 2005; Herborg et al., 2007. A Simple, Reliable, and Fast Protocol for Thraustochytrid DNA Extraction

April 2001 *Marine Biotechnology* 3(2):100-2. DOI:10.1007/s101260000069

111. Y.J. Zhang, S. Zhang, X.Z. Liu, H.A. Wen and M. Wang. A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. July 2010 *Letters in Applied Microbiology* 51(1):114 - 118 DOI:10.1111/j.1472-765X.2010.02867.x

112. P Sean Walsh, David A Metzger, Russell Higushi. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10(4): 506-13 (April 1991). Taylor & Francis. *BioTechniques*. March 2013 54(3):134-9. DOI:10.2144/000114018

ПРИЛОЖЕНИЯ

УТВЕРЖДАЮ
Директор Всероссийского научно-исследовательского института пищевых добавок - филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр пищевых систем имени В.М. Горбатова» РАН (ВНИИПД – Филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)
В.Ю. Ситнов
25 июля 2025 г.



АКТ

выработки опытной партии муки из насекомых

Представитель разработчика Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр пищевых систем имени В.М. Горбатова» РАН (ВНИИПД – Филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)

- младший научный сотрудник Мечтаева Е.В.

Составил акт о выработке партии обезжиренной муки из сверчка домашнего (*Acheta domestica*).

Наименование продукта: «Мука обезжиренная из сверчка *Acheta domestica*».

Дата изготовления опытной партии: 25 июля 2025 г.

Способ сушки сырья: конвекционная сушка при 40 °С.

Способ обезжиривания: трёхкратное обезжиривание гексаном с последующим удалением растворителя.

Способ упаковки продукта: вакуумирование.

Объем опытной партии и типоразмер тары: 2 пластиковых пакета по 150 г.

Подписи

Расшифровка подписей

Представители разработчика:
Младший научный сотрудник

Мечтаева Е.В.

УТВЕРЖДАЮ

Директор Всероссийского научно-исследовательского института пищевых добавок - филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр пищевых систем имени В.М. Горбатова» РАН (ВНИИПД – Филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)
В.Ю. Ситнов
29 июля 2025 г.



АКТ

выработки опытной партии белка насекомых

Представитель разработчика Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр пищевых систем имени В.М. Горбатова» РАН (ВНИИПД – Филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)

- младший научный сотрудник Мечтаева Е.В.

Составил акт о выработке партии белка из сверчка домашнего (*Acheta domestica*).

Наименование продукта: «Белок сверчка *Acheta domestica*».

Дата изготовления опытной партии: 25 июля 2025 г.

Способ сушки сырья: конвекционная сушка при 40 °С.

Способ обезжиривания: трёхкратное обезжиривание гексаном с последующим удалением растворителя.

Способ выделения белка: щелочная экстракция.

Объем опытной партии и типоразмер тары: 2 пластиковых пакета по 500 г

Подписи

Представители разработчика:
Младший научный сотрудник

Расшифровка подписей

Мечтаева Е.В.



научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН
(ВНИИТеК – филиал ФГБНУ "ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН)
Научно-исследовательский испытательный центр (НИИЦ)



Адрес юридический: 109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26; Адрес фактический: 142703, Россия, Московская область, Ленинский городской округ, г. Видное, ул. Школьная, д. 78

test@vniitek.ru

Телефон/факс: (495) 541-86-44, 541-08-92

УТВЕРЖДАЮ:

Руководитель НИИЦ

Самойлова А.М.
(ФИО сотрудника)

Дата утверждения: 12 августа 2025 г.



ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ № 1355

от 12 августа 2025 г.

Наименование образца испытаний ¹ :	Мука обезжиренная из сверчка <i>Acheta domesticus</i>
Обозначение и наименование НД на образец ¹ :	-
Дата изготовления ¹ :	25.07.2025
Упаковка, масса нетто (объем) ¹ :	Упаковка из полимерного материала
Наименование, ИНН заказчика, его юридический и фактический адрес ¹ :	ФГБНУ "ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН, ИНН 7709022913, Адрес юридический: Россия, 109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26; Адрес фактический: Россия, 109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26
Внутренний номер (код) образца:	1355
Сведения об отборе проб ² :	Проба отобрана 06.08.2025; Проба доставлена 08.08.2025 11:05:00
Основание для проведения испытаний:	Заявка от 08.08.2025
Даты осуществления лабораторной деятельности:	11.08.2025-11.08.2025
Цель проведения испытаний ¹ :	Исследование по фактическим показателям в соответствии с заявкой Заказчика

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ:

Наименование показателя, единица измерения	Документ на метод испытаний	Значение показателя	
		Нормированное	При испытаниях ³
1	2	3	4
Физико-химические показатели			
Массовая доля общего белка (коэффициент пересчета составляет 6,25), %	ГОСТ 26889-86	-	73,21 ± 10,98

Основное оборудование, использованное при испытаниях:	Весы лабораторные электронные ВЛ-224В (Н151-027) (заводской № Н151-027, дата поверки 29.01.2025)
---	--

Ответственный за формирование протокола: Колобова Н.В.

Ответственный за проверку протокола:

Журавская-Скалова Д.В.

(ФИО сотрудника)

(подпись)

Идентификатор протокола



МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН
(ВНИИТеК – филиал ФГБНУ "ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН)
Научно-исследовательский испытательный центр (НИИЦ)

Адрес юридический: 109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26; Адрес фактический: 142703, Россия, Московская область, Ленинский городской округ, г. Видное, ул. Школьная, д. 78

test@vniitek.ru

Телефон/факс: (495) 541-86-44, 541-08-92

УТВЕРЖДАЮ:

Руководитель НИИЦ

Самойлова А.М.
(ФИО сотрудника)

Дата утверждения: 12 августа 2025 г.

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ № 1356

от 12 августа 2025 г.

Наименование образца испытаний ¹ :	Белок сверчка домашнего <i>Acheta domesticus</i>
Обозначение и наименование НД на образец ¹ :	-
Дата изготовления ¹ :	25.07.2025
Упаковка, масса нетто (объем) ¹ :	Упаковка из полимерного материала
Наименование, ИНН заказчика, его юридический и фактический адрес ¹ :	ФГБНУ "ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН, ИНН 7709022913, Адрес юридический: Россия, 109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26; Адрес фактический: Россия, 109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26
Внутренний номер (код) образца:	1356
Сведения об отборе проб ² :	Проба отобрана 06.08.2025; Проба доставлена 08.08.2025 11:05:00
Основание для проведения испытаний:	Заявка от 08.08.2025
Даты осуществления лабораторной деятельности:	11.08.2025-11.08.2025
Цель проведения испытаний ¹ :	Исследование по фактическим показателям в соответствии с заявкой Заказчика

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ:

Наименование показателя, единица измерения	Документ на метод испытаний	Значение показателя	
		Нормированное	При испытаниях ³
1	2	3	4
Физико-химические показатели			
Массовая доля общего белка (коэффициент пересчета составляет 6,25), %	ГОСТ 26889-86	-	69,03 ± 10,36

Основное оборудование, использованное при испытаниях:	Весы лабораторные электронные ВЛ-224В (Н151-027) (заводской № Н151-027, дата поверки 29.01.2025)
---	--

Ответственный за формирование протокола: Колобова Н.В.

Ответственный за проверку протокола:

Журавская-Скалова Д.В.

(ФИО сотрудника)

(подпись)

1. Объект испытаний

Проба сверчковой муки

2. Цель(и) (задачи)

Определение массовой доли влаги

3. Оцениваемые показатели

- массовая доля влаги, %

4. Заказчик

ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26, ИНН 7709022913

5. Место и дата

г. Екатеринбург, ул. Красноармейская 4, комн. 809, 25.09.2025 г.

6. Влияющие факторы

Показатель	Значение
Температура, °С	21,9
Давление, кПа	97,4
Отн. влажность, %	40,1

7. Методология

Эксплуатационная документация на ГЭТ 173-2017

8. Материальное обеспечение

- 1) Гигрометр Rotronic модификации HygroPalm, заводской номер 60280518, свидетельство о поверке № С-В/27-05-2025/434927652, действующее до 26.05.2026.*
- 2) Барометр-анероид метеорологический БАММ-1, серийный номер 507, свидетельство о поверке № С-СЕ/09-09-2025/463500912, действующее до 08.09.2026.*
- 3) Государственный первичный эталон единиц массовой доли, массовой (молярной) концентрации воды в твердых и жидких веществах и материалах ГЭТ 173-2017, утвержденный приказом № 2993 Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28.12.2017.*
- 4) Весы лабораторные электронные LE225D, серийный номер 19007857, свидетельство о поверке № С-С/24-01-2025/407787590, действующее до 23.01.2026.*



ВНИИМ
им. Д.И. Менделеева
(УНИИМ)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ
РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева»
УНИИМ – филиал ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева»



ПРОТОКОЛ № 253-241/2025 от 25.09.2025 г.

Страница 2 из 2

9. Полученные результаты

Результаты измерений массовой доли влаги методом воздушно-тепловой сушки

Таблица 1 – Результаты измерений массовой доли влаги

№ п/п	$m_1, г$	$m_2, г$	$m_3, г$	$W, \%$
1	15,49719	16,49812	16,41843	7,962
2	14,92987	15,92958	15,84993	7,967
3	15,49719	16,49812	16,41842	7,963
4	14,92987	15,92958	15,84994	7,966

Таблица 2 – Бюджет неопределенности результатов измерений массовой доли влаги

Источник	Оценка	Ед. изм.	u_i	Коеф. чувств. c_i	Закон распр.	Число степ. свободы, ν_i	$c_i u_i$	$c_i^2 u_i^2$
Повтор.	7,96	%	0,0014	1	N	3	1,4E-03	1,9E-06
m_1	15,21353	г	1,0E-04	-7,96	R	∞	-8,0E-04	6,3E-07
m_2	16,21385	г	1,0E-04	-92,01	R	∞	-9,2E-03	8,5E-05
m_3	16,13418	г	1,0E-04	99,97	R	∞	1,0E-02	1,0E-04
Стандартная неопределенность типа A, %								0,0014
Стандартная неопределенность типа B, %								0,014
Суммарная стандартная неопределенность, %								0,014
Расширенная неопределенность ($k=2$), %								0,03

10. Выводы

Массовая доля влаги в пробе сверчковой муки составляет $(7,96 \pm 0,03) \%$.



Исполнители

Голынец О.С.

И.о.зав. лабораторией 241

Крашенинина М.П.

С.н.с. лаборатории 241

	ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева» УНИИМ – филиал ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева»	
ПРОТОКОЛ № 254-241/2025 от 25.09.2025 г.		Страница 1 из 3

1. Объект испытаний

Проба сверчковой муки

2. Цель(и) (задачи)

Определение массовой доли азота

3. Оцениваемые показатели

- массовая доля азота, %

4. Заказчик

ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26, ИНН 7709022913

5. Место и дата

г. Екатеринбург, ул. Красноармейская 4, комн. 806, 25.09.2025 г.

6. Влияющие факторы

<i>Показатель</i>	<i>Значение</i>
<i>Температура, °С</i>	<i>21,7</i>
<i>Давление, кПа</i>	<i>97,4</i>
<i>Отн. влажность, %</i>	<i>40,2</i>

7. Методология

Эксплуатационная документация на ГВЭТ 176-1-2010

8. Материальное обеспечение

1) Гигрометр Rotronic модификации HygroPalm, заводской номер 60280518, свидетельство о поверке № С-В/27-05-2025/434927652, действующее до 26.05.2026.

2) Барометр-анероид метеорологический БАММ-1, серийный номер 507, свидетельство о поверке № С-СЕ/09-09-2025/463500912, действующее до 08.09.2026.

3) Государственный вторичный эталон единиц массовой доли и массовой (молярной) концентрации компонентов в твердых и жидких веществах и материалах на основе объемного титриметрического метода анализа ГВЭТ 176-1-2010, свидетельство об аттестации эталона № 01-241-2022, выданное 23.12.2022, действующее до 22.12.2025.

4) Весы лабораторные электронные CPA225D, серийный номер 27812068, свидетельство о поверке № С-С/11-06-2025/440479652, действующее до 10.06.2026.

 ВНИИМ им. Д.И. Менделеева (УНИИМ)	ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ	
	ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева» УНИИМ – филиал ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева»	
ПРОТОКОЛ № 254-241/2025 от 25.09.2025 г.		Страница 2 из 3

9. Полученные результаты

Результаты измерений массовой доли азота методом Кьельдаля

Таблица 1 - Результаты стандартизации титранта по ГСО 10450-2014

№ п/п	$m(\text{Na}_2\text{CO}_3)$, г	$V_1(\text{H}_2\text{SO}_4)$, см ³	$V_2(\text{H}_2\text{SO}_4)$, см ³	$C(\text{H}_2\text{SO}_4)$, моль/дм ³
1	0,1515	14,278	14,244	0,1002
2	0,1508	14,188	14,155	0,1004
3	0,1512	14,237	14,228	0,1002
4	0,1500	14,086	14,103	0,1004
5	0,1503	14,181	14,141	0,1001
6	0,1506	14,105	14,234	0,1003
7	0,1508	14,215	14,185	0,1002
8	0,1511	14,262	14,198	0,1002

Таблица 2 - Бюджет неопределенности стандартизации титранта

Источник	Оценка	Ед. изм.	u_i	Козф. чувств. c_i	Закон распр.	Число степ. своб.	c_{u_i}	$c_i^2 u_i^2$
$C(\text{H}_2\text{SO}_4)$	0,1003	моль/дм ³	3,5E-05	1	N	7	3,5E-05	1,2E-09
$m(\text{Na}_2\text{CO}_3)$	0,1508	г	5,8E-05	0,6649	R	∞	3,8E-05	1,5E-09
$V_1(\text{H}_2\text{SO}_4)$	14,194	см ³	1,4E-02	-0,0035	R	∞	-5,0E-05	2,5E-09
$V_2(\text{H}_2\text{SO}_4)$	14,186	см ³	1,4E-02	-0,0035	R	∞	-5,0E-05	2,5E-09
$M(\text{Na}_2\text{CO}_3)$	105,9867	г/моль	1,2E-03	-0,0009	R	∞	-1,2E-06	1,4E-12
$\omega(\text{Na}_2\text{CO}_3)$	99,992	%	8,5E-03	0,0010	R	∞	8,5E-06	7,3E-11
Стандартная неопределенность типа А, u_A , моль/дм ³								0,000035
Стандартная неопределенность типа В, u_B , моль/дм ³								0,000081
Суммарная стандартная неопределенность, u_C , моль/дм ³								0,000088
Расширенная неопределенность, $U(k=2)$, моль/дм ³								0,00018

Таблица 3 - Результаты измерений массовой доли азота

№ п/п	m_1 , г	m_2 , г	$C(\text{H}_2\text{SO}_4)$, моль/дм ³	$V_1(\text{H}_2\text{SO}_4)$, см ³	$V_0(\text{H}_2\text{SO}_4)$, см ³	$W(\text{N})$, %
1	0,5591	0,7595	0,1003	17,061	0,409	11,668
2	0,5489	0,7486	0,1003	17,032	0,409	11,688
3	0,5734	0,7736	0,1003	17,029	0,409	11,657
4	0,5873	0,7875	0,1003	17,046	0,409	11,669

Таблица 4 - Бюджет неопределенности результатов измерений массовой доли азота

Источник	Оценка	Ед. изм.	u_i	Коэф. чувств. c_i	Закон распр.	Число степ. своб.	$c_i u_i$	$c_i^2 u_i^2$
Повтор.	11,66	%	1,5E-02	1	N	4	1,5E-02	2,2E-04
m_1	0,5679	г	1,0E-04	58,26	R	∞	5,8E-03	3,4E-05
m_2	0,7680	г	1,0E-04	-58,26	R	∞	-5,8E-03	3,4E-05
$V_1(\text{H}_2\text{SO}_4)$	17,0181	см ³	1,7E-02	0,70	R	∞	1,2E-02	1,4E-04
$V_0(\text{H}_2\text{SO}_4)$	0,4092	см ³	4,1E-04	-0,70	R	∞	-2,9E-04	8,2E-08
$M(\text{N})$	14,0069	г/моль	2,5E-04	0,83	R	∞	2,0E-04	4,2E-08
$C(\text{H}_2\text{SO}_4)$	0,1003	моль/дм ³	8,8E-05	116,27	R	∞	1,0E-02	1,1E-04
Стандартная неопределенность типа А, u_A , %								0,015
Стандартная неопределенность типа В, u_B , %								0,018
Суммарная стандартная неопределенность, u_c , %								0,023
Расширенная неопределенность, $U(k=2)$, %								0,05

10. Выводы

Массовая доля азота в пробе сверчковой муки составляет $(11,66 \pm 0,05)$ %.

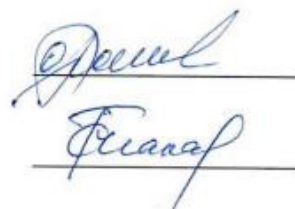
Исполнители

Голынец О.С.

И.о.зав. лабораторией 241

Макарова С.Г.

Инж. 1 кат. лаборатории 241



ФГБНУ «Федеральный научный центр
пищевых систем им. В.М.Горбатова» РАН

Россия, 109316, Москва, ул. Талалихина, 26
E-mail: 6769126@fneps.ru
Тел: +7(495) 676-91-26

ЗАКЛЮЧЕНИЕ № 1992/1

От 13.10.2025 г.

Договор №Н-17/306 от 11.07.2025 г.

НАИМЕНОВАНИЕ ОБРАЗЦА ИСПЫТАНИЙ*	БИОМАССА СВЕРЧКА ДОМОВОГО <i>ACHETA DOMESTICUS</i>	
ИД (ТД) НА ПРОДУКЦИЮ*	ТУ 10.8-001-85266047-2023 ЕАЭС N RU Д-РУ.РА04. В.09546/23	
ЗАКАЗЧИК (включая юридический и фактический адрес)*	МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЕВРАЗИЙСКАЯ ЭКОНОМИЧЕСКАЯ КОМИССИЯ	
ИЗГОТОВИТЕЛЬ (включая юридический и фактический адрес)*	ВНИИПД- ФИЛИАЛ «ФНЦ ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ ИМ. В.М. ГОРБАТОВА» РАН, г. Санкт-Петербург ул. Литейная, д.33	
ЦЕЛЬ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ/ОСНОВАНИЕ*	ВЫПОЛНЕНИЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ ДЛЯ ОФИЦИАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЕВРАЗИЙСКОЙ ЭКОНОМИЧЕСКОЙ КОМИССИЕЙ ПО ТЕМЕ «ОБОСНОВАНИЕ ГИГИЕНИЧЕСКИХ ТРЕБОВАНИЙ БЕЗОПАСНОСТИ И ИЗУЧЕНИЕ ПИЩЕВОЙ ЦЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ НОВОГО ВИДА, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ НАСЕКОМЫХ. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ»	
МЕСТО ОТБОРА ОБРАЗЦА*	ВНИИПД- ФИЛИАЛ «ФНЦ ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ ИМ. В.М. ГОРБАТОВА» РАН, г. Санкт-Петербург ул. Литейная, д.33	
ДАТА, ВРЕМЯ / АКТ ОТБОРА ОБРАЗЦА*	ДАТА ОТБОРА: 25.07.2025 г.	АКТ ОТБОРА: б/н от 25.07.25
ОТБОР ПРОИЗВЕДЕН*	м.н.с Мечтаева Е.В	
МАССА ПАРТИИ/ РАЗМЕР ПАРТИИ/НОМЕР ПАРТИИ*	3000 г	
КОЛИЧЕСТВО ОБРАЗЦА	300 г	
НОМЕР (КОД) ОБРАЗЦА	ОБР.№1	
НОМЕР ЗАЯВКИ, ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ ОБРАЗЦА	№ 1992 з от 07.10.2025 г.	
УПАКОВКА*	НАИМЕНОВАНИЕ УПАКОВКИ: Полимерная вакуумная упаковка	ЦЕЛОСТНОСТЬ УПАКОВКИ: не повреждена
ДАТА ИЗГОТОВЛЕНИЯ*	25.07.2025 г.	
СРОК ГОДНОСТИ*	1 год	
УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ*	Хранить при температуре не выше +25°C	
ОПИСАНИЕ ЭТИКЕТКИ (СОСТАВ)*	-	
СПОСОБ ДОСТАВКИ ОБРАЗЦА*	-	
ДАТА ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ	ДАТА НАЧАЛА: 07.10.2025 г.	ДАТА ОКОНЧАНИЯ: 13.10.2025 г.
НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ*	-	

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

НАИМЕНОВАНИЕ ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ	ЕДИНИЦА ИЗМЕРЕНИЯ	ИД НА МЕТОДИКУ ИССЛЕДОВАНИЙ	РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ
МАССОВАЯ ДОЛЯ БЕЛКА	%	ГОСТ 32044.1-2012	72.97±0.9
МАССОВАЯ ДОЛЯ ЗОЛЫ	%	ГОСТ 26226-95 (п.2)	3.8±0.3
МАССОВАЯ ДОЛЯ ЖИРА	%	ГОСТ 17681-82 (п.2.6)	6.3±0.2
МАССОВАЯ ДОЛЯ ВЛАГИ	%	ГОСТ Р 54951-2012	7.79±0.2
УГЛЕВОДЫ	%	МУ 1-40/3805-1991	9.14

РУКОВОДИТЕЛЬ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИСПЫТАТЕЛЬНОГО ЦЕНТРА
ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН


Вострикова Н.И.
«13» ОКТЯБРЯ 2025 г.

ПЕРЕПЕЧАТКА И РАЗМНОЖЕНИЕ ЗАКЛЮЧЕНИЯ БЕЗ РАЗРЕШЕНИЯ ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН ЗАПРЕЩАЕТСЯ.
РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ ДЕЙСТВИТЕЛЬНЫ ТОЛЬКО ДЛЯ ОБРАЗЦОВ, ПРОШЕДШИХ ИСПЫТАНИЯ
ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА ПРАВИЛЬНОСТЬ ПРОВЕДЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ ДОСТАВКИ И ОТБОРА ПРОБ
ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА СТОРОННИЕ МНЕНИЯ И ТОЛКОВАНИЯ ТВОУЧЕНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИСПЫТАНИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА ДАННЫЕ, ПРЕДОСТАВЛЕННЫЕ ЗАКАЗЧИКОМ

Заключение № 1992/1 от 13.10.2025 г. Стр. 1 из 1

Приложение 4

ФГБНУ «Федеральный научный центр
пищевых систем им. В.М.Горбатова» РАН

Россия, 109316, Москва, ул. Талалихина, 26

E-mail: 6769126@fneps.ru

Тел: +7(495) 676-91-26

ЗАКЛЮЧЕНИЕ № 1992/2

От 13.10.2025 г.

Договор №Н-17/306 от 11.07.2025 г.

НАИМЕНОВАНИЕ ОБРАЗЦА ИСПЫТАНИЙ*	БИОМАССА СВЕРЧКА ДОМОВОГО <i>ACHETA DOMESTICUS</i>		
ИД(ТД) НА ПРОДУКЦИЮ*	ТУ 10.8-001-85266047-2023 ЕАЭС N RU Д-RU.РА04.В.09546/23		
ЗАКАЗЧИК (включая юридический и фактический адрес)*	МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЕВРАЗИЙСКАЯ ЭКОНОМИЧЕСКАЯ КОМИССИЯ		
ИЗГОТОВИТЕЛЬ (включая юридический и фактический адрес)*	ВНИИПД- ФИЛИАЛ «ФНЦ ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ ИМ. В.М. ГОРБАТОВА» РАН, г. Санкт-Петербург ул. Литейная, д.33		
ЦЕЛЬ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ/ОСНОВАНИЕ*	ВЫПОЛНЕНИЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ ДЛЯ ОФИЦИАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЕВРАЗИЙСКОЙ ЭКОНОМИЧЕСКОЙ КОМИССИЕЙ ПО ТЕМЕ «ОБОСНОВАНИЕ ГИГИЕНИЧЕСКИХ ТРЕБОВАНИЙ БЕЗОПАСНОСТИ И ИЗУЧЕНИЕ ПИЩЕВОЙ ЦЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ НОВОГО ВИДА, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ НАСЕКОМЫХ. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ»		
МЕСТО ОТБОРА ОБРАЗЦА*	ВНИИПД- ФИЛИАЛ «ФНЦ ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ ИМ. В.М. ГОРБАТОВА» РАН, г. Санкт-Петербург ул. Литейная, д.33		
ДАТА, ВРЕМЯ / АКТ ОТБОРА ОБРАЗЦА*	ДАТА ОТБОРА: 25.07.2025 г.	АКТ ОТБОРА: б/н от 25.07.25	
ОТБОР ПРОИЗВЕДЕН*	м.п.с Мечтаева Е.В.		
МАССА ПАРТИИ/ РАЗМЕР ПАРТИИ/НОМЕР ПАРТИИ*	3000 г		
КОЛИЧЕСТВО ОБРАЗЦА	300 г		
НОМЕР (КОД) ОБРАЗЦА	ОБР.№1		
НОМЕР ЗАЯВКИ, ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ ОБРАЗЦА	№ 1992 з от 07.10.2025 г.		
УПАКОВКА*	НАИМЕНОВАНИЕ УПАКОВКИ: Полимерная вакуумная упаковка	ЦЕЛЮСТНОСТЬ УПАКОВКИ: не повреждена	
ДАТА ИЗГОТОВЛЕНИЯ*	25.07.2025 г.		
СРОК ГОДНОСТИ*	1 год		
УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ*	Хранить при температуре не выше +25°C		
ОПИСАНИЕ ЭТИКЕТКИ (СОСТАВ)*	-		
СПОСОБ ДОСТАВКИ ОБРАЗЦА*	-		
ДАТА ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ	ДАТА НАЧАЛА: 07.10.2025 г.	ДАТА ОКОНЧАНИЯ: 13.10.2025 г.	
НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ*	-		

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

НАИМЕНОВАНИЕ ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ	ЕДИНИЦА ИЗМЕРЕНИЯ	ИД НА МЕТОДИКУ ИССЛЕДОВАНИЙ	РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ
ТОКСИЧНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ:			
МАССОВАЯ ДОЛЯ СВИНЦА	мг/кг	ГОСТ 30178-96	0.17±0.03
МАССОВАЯ ДОЛЯ КАДМИЯ	мг/кг	ГОСТ 30178-96	0.065±0.012
МАССОВАЯ ДОЛЯ МЫШЬЯКА	мг/кг	ГОСТ Р 51766-01	МЕНЕЕ 0.01
МАССОВАЯ ДОЛЯ РТУТИ	мг/кг	ГОСТ 34361-2017	МЕНЕЕ 0.0025
МАССОВАЯ ДОЛЯ ХРОМА	мг/кг	ГОСТ 34361-2017	МЕНЕЕ 0.2
ПЕСТИЦИДЫ:			
СУММА ИЗОМЕРОВ ГЕКСАХЛОРЦИКЛОГЕКСАНА (ГХЦГ):			
БЕТА-ИЗОМЕР ГХЦГ	мг/кг	ГОСТ 13496.20-2014	МЕНЕЕ 0.01
АЛЬФА-, ГАММА-ИЗОМЕРОВ ГХЦГ	мг/кг	ГОСТ 13496.20-2014	МЕНЕЕ 0.02
ДДТ И ЕГО МЕТАБОЛИТЫ	мг/кг	ГОСТ 13496.20-2014	МЕНЕЕ 0.02

Заключение № 1992/2 от 13.10.2025 г. Стр. 1 из 2

МИКОТОКСИНЫ:			
АФЛАТОКСИН В1	мг/кг	ГОСТ 33780-2016	МЕНЕЕ 0.0002
T-2 ТОКСИН	мг/кг	ГОСТ 34108-2017	МЕНЕЕ 0.02
ЗЕАРАЛЕНОН	мг/кг	ГОСТ 34108-2017	МЕНЕЕ 0.025
СУММА ФУМОНИЗИНОВ (ПО ФУМОНИЗИНУ В1)	мг/кг	ГОСТ 34108-2017	МЕНЕЕ 0.25
РАДИОНУКЛИДЫ:			
УДЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЦЕЗИЯ-137	Бк/кг	ГОСТ 32161-2013	0.00±9.35
УДЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СТРОНЦИЯ-90	Бк/кг	ГОСТ 32163-2013	0.00±10.40
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ:			
КОЛИЧЕСТВО МЕЗОФИЛЬНЫХ АЭРОБНЫХ И ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ (КМАФАММ)	КОЕ/г	ГОСТ 10444.15-94	2x10 ³
БАКТЕРИИ ГРУППЫ КИШЕЧНЫХ ПАЛОЧЕК (БГКП)	г/см ³	ГОСТ 31878-2012	НЕ ОБНАРУЖЕНО В 1.0
БАКТЕРИИ СЕМЕЙСТВА ENTEROBACTERIACEAE	КОЕ/г	ГОСТ 32064-2013	МЕНЕЕ 1×10 ¹
S. AUREUS И ДР. КОАГУЛАЗО-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ СТАФИЛОКОККИ	г	ГОСТ 31746-2012	НЕ ОБНАРУЖЕНО В 1.0

РУКОВОДИТЕЛЬ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИСПЫТАТЕЛЬНОГО ЦЕНТРА
ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

Вострикова Н.Л.

30 ОКТЯБРЯ 2025 г.

ПЕРЕПЕЧАТКА И РАЗМЕЩЕНИЕ ЗАКЛЮЧЕНИЯ БЕЗ РАЗРЕШЕНИЯ ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН ЗАПРЕЩАЕТСЯ
РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ ДЕЙСТВИТЕЛЬНЫ ТОЛЬКО ДЛЯ ОБРАЗЦОВ, ПРОШЕДШИХ ИСПЫТАНИИ
ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА ПРАВИЛЬНОСТЬ ПРОВЕДЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ ДОСТАВКИ И ОТБОРА ПРОБ
ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА СТОРОННИЕ МНЕНИЯ И ТОЛКОВАНИЯ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИСПЫТАНИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА ДАВНИЕ, ОКАЗАТЕЛЬНЫЕ ЗАКАЗЧИКОМ

Заключение № 1992/2 от 13.10.2025 г. Стр. 2 из 2

ФГБНУ «Федеральный научный центр
пищевых систем им. В.М.Горбатова» РАН

Россия, 109316, Москва, ул. Талалихина, 26
E-mail: 6769126@fneps.ru
Тел:+7(495) 676-91-26

ЗАКЛЮЧЕНИЕ № 1992/3

От 13.10.2025 г.

Договор №Н-17/306 от 11.07.2025 г.

НАИМЕНОВАНИЕ ОБРАЗЦА ИСПЫТАНИЙ*	КОНЦЕНТРАТ БЕЛКА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ СВЕРЧКА ДОМОВОГО <i>АСHETA DOMESTICUS</i>	
НД (ГД) НА ПРОДУКЦИЮ*	СТО ВНИИПД - ФИЛИАЛ «ФНЦ ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ ИМ. В.М. ГОРБАТОВА» РАН	
ЗАКАЗЧИК (включая юридический и фактический адрес)*	МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЕВРАЗИЙСКАЯ ЭКОНОМИЧЕСКАЯ КОМИССИЯ	
ИЗГОТОВИТЕЛЬ (включая юридический и фактический адрес)*	ВНИИПД - ФИЛИАЛ «ФНЦ ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ ИМ. В.М. ГОРБАТОВА» РАН, г. Санкт-Петербург ул. Литейная, д.33	
ЦЕЛЬ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ/ОСНОВАНИЕ*	ВЫПОЛНЕНИЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ ДЛЯ ОФИЦИАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЕВРАЗИЙСКОЙ ЭКОНОМИЧЕСКОЙ КОМИССИЕЙ ПО ТЕМЕ «ОБОСНОВАНИЕ ГИГИЕНИЧЕСКИХ ТРЕБОВАНИЙ БЕЗОПАСНОСТИ И ИЗУЧЕНИЕ ПИЩЕВОЙ ЦЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ НОВОГО ВИДА, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ НАСЕКОМЫХ. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ»	
МЕСТО ОТБОРА ОБРАЗЦА*	ВНИИПД - ФИЛИАЛ «ФНЦ ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ ИМ. В.М. ГОРБАТОВА» РАН, г. Санкт-Петербург ул. Литейная, д.33	
ДАТА, ВРЕМЯ / АКТ ОТБОРА ОБРАЗЦА*	ДАТА ОТБОРА: 29.07.2025 г.	АКТ ОТБОРА: б/н от 29.07.25
ОТБОР ПРОИЗВЕДЕН*	м.п.с Мечтаева Е.В	
МАССА ПАРТИИ/ РАЗМЕР ПАРТИИ/НОМЕР ПАРТИИ*	1000 г	
КОЛИЧЕСТВО ОБРАЗЦА	150 г	
НОМЕР (КОД) ОБРАЗЦА	ОБР.№2	
НОМЕР ЗАЯВКИ, ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ ОБРАЗЦА	№ 1992 з от 07.10.2025 г.	
УПАКОВКА*	НАИМЕНОВАНИЕ УПАКОВКИ: Полимерная вакуумная упаковка	ЦЕЛОСТНОСТЬ УПАКОВКИ: не повреждена
ДАТА ИЗГОТОВЛЕНИЯ*	29.07.2025 г.	
СРОК ГОДНОСТИ*	1 год	
УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ*	Хранить при температуре не выше +25°C	
ОПИСАНИЕ ЭТИКЕТКИ (СОСТАВ)*	-	
СПОСОБ ДОСТАВКИ ОБРАЗЦА*	-	
ДАТА ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ	ДАТА НАЧАЛА: 07.10.2025 г.	ДАТА ОКОНЧАНИЯ: 13.10.2025 г.
НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ*	-	

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

НАИМЕНОВАНИЕ ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ	ЕДИНИЦА ИЗМЕРЕНИЯ	НД НА МЕТОДИКУ ИССЛЕДОВАНИЙ	РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ
ТОКСИЧНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ:			
МАССОВАЯ ДОЛЯ СВИНЦА	мг/кг	ГОСТ 30178-96	0.07±0.01
МАССОВАЯ ДОЛЯ КАДМИЯ	мг/кг	ГОСТ 30178-96	0.015±0.002
МАССОВАЯ ДОЛЯ МЫШЬЯКА	мг/кг	ГОСТ Р 51766-01	МЕНЕЕ 0.01
МАССОВАЯ ДОЛЯ РТУТИ	мг/кг	ГОСТ 34361-2017	МЕНЕЕ 0.0025
МАССОВАЯ ДОЛЯ ХРОМА	мг/кг	ГОСТ 34361-2017	МЕНЕЕ 0.2
ПЕСТИЦИДЫ: СУММА ИЗОМЕРОВ ГЕКСАХЛОРИЦИКЛОГЕКСАНА (ГХЦГ): БЕТА-ИЗОМЕР ГХЦГ АЛЬФА-, ГАММА-ИЗОМЕРОВ ГХЦГ	мг/кг мг/кг	ГОСТ 13496.20-2014 ГОСТ 13496.20-2014	МЕНЕЕ 0.01 МЕНЕЕ 0.02
ДДТ И ЕГО МЕТАБОЛИТЫ	мг/кг	ГОСТ 13496.20-2014	МЕНЕЕ 0.02

Заключение № 1992/2 от 13.10.2025 г. Стр. 1 из 2

МИКОТОКСИНЫ:			
АФЛАТОКСИН В1	мг/кг	ГОСТ 33780-2016	МЕНЕЕ 0.0002
1-2 ТОКСИН	мг/кг	ГОСТ 34108-2017	МЕНЕЕ 0.02
ЗЕАРАЛЕНОН	мг/кг	ГОСТ 34108-2017	МЕНЕЕ 0.025
СУММА ФУМОНИЗИНОВ (ПО ФУ-МОНИЗИНУ В1)	мг/кг	ГОСТ 34108-2017	МЕНЕЕ 0.25
РАДИОНУКЛИДЫ:			
УДЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЦЕЗИЯ-137	Бк/кг	ГОСТ 32161-2013	0.00±9.35
УДЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СТРОНЦИЯ-90	Бк/кг	ГОСТ 32163-2013	0.00±10.40
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ:			
КОЛИЧЕСТВО МЕЗОФИЛЬНЫХ АЭРОБНЫХ И ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ (КМАФАММ)	КОЕ/г	ГОСТ 10444.15-94	3x10 ⁴
БАКТЕРИИ ГРУППЫ КИШЕЧНЫХ ПАЛОЧЕК (БКП)	г/см ³	ГОСТ 31878-2012	НЕ ОБНАРУЖЕНО В 1.0
БАКТЕРИИ СЕМЕЙСТВА ENTEROBACTERICEAE	КОЕ/г	ГОСТ 32064-2013	МЕНЕЕ 1×10 ⁴
S. AUREUS И ДР. КОАГУЛАЗО-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ СТАФИЛОКОККИ	г	ГОСТ 31746-2012	НЕ ОБНАРУЖЕНО В 1.0

РУКОВОДИТЕЛЬ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИСПЫТАТЕЛЬНОГО ЦЕНТРА
ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

Вострикова Н.Л.

13 ОКТЯБРЯ 2025 г.

ПЕРЕПЕЧАТКА И РАЗМНОЖЕНИЕ ЗАКЛЮЧЕНИЯ БЕЗ РАЗРЕШЕНИЯ ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН ЗАПРЕЩАЕТСЯ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ ДЕЙСТВИТЕЛЬНЫ ТОЛЬКО ДЛЯ ОБРАЗЦОВ, ПРОШЕДШИХ ИСПЫТАНИЯ

ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА ПРАВИЛЬНОСТЬ ПРОВЕДЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ ДОСТАВКИ И ОТБОРА ПРОБ

ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА СТОРОННИЕ МНЕНИЯ И ТОЛКОВАНИЯ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИСПЫТАНИЙ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬНОЕ ИСПЫТАТЕЛЬНОЕ ЦЕНТРА ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА ДАЛЬНЕЕ ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ ЗАКАЗЧИКОМ

Заключение № 1992/2 от 13.10.2025 г. Стр. 2 из 2

ФГБНУ «Федеральный научный центр
пищевых систем им. В.М.Горбатова» РАН

Россия, 109316, Москва, ул. Талалихина, 26
E-mail: 6769126@fneps.ru
Тел:+7(495) 676-91-26

ЗАКЛЮЧЕНИЕ № 1992/4

От 13.10.2025 г.

Договор №Н-17/306 от 11.07.2025 г.

НАИМЕНОВАНИЕ ОБРАЗЦА ИСПЫТАНИЙ*	КОНЦЕНТРАТ БЕЛКА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ СВЕРЧКА ДОМОВОГО <i>АСНЕТА DOMESTICUS</i>	
ИД (ГД) НА ПРОДУКЦИЮ*	СТО ВНИИПД - ФИЛИАЛ «ФНЦ ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ ИМ. В.М. ГОРБАТОВА» РАН	
ЗАКАЗЧИК (включая юридический и фактический адрес)*	МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЕВРАЗИЙСКАЯ ЭКОНОМИЧЕСКАЯ КОМИССИЯ	
ИЗГОТОВИТЕЛЬ (включая юридический и фактический адрес)*	ВНИИПД- ФИЛИАЛ «ФНЦ ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ ИМ. В.М. ГОРБАТОВА» РАН, г. Санкт-Петербург ул. Литейная, д.33	
ЦЕЛЬ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ/ОСНОВАНИЕ*	ВЫПОЛНЕНИЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ ДЛЯ ОФИЦИАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЕВРАЗИЙСКОЙ ЭКОНОМИЧЕСКОЙ КОМИССИЕЙ ПО ТЕМЕ «ОБОСНОВАНИЕ ГИГИЕНИЧЕСКИХ ТРЕБОВАНИЙ БЕЗОПАСНОСТИ И ИЗУЧЕНИЕ ПИЩЕВОЙ ЦЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ НОВОГО ВИДА, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ НАСЕКОМЫХ. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ»	
МЕСТО ОТБОРА ОБРАЗЦА*	ВНИИПД- ФИЛИАЛ «ФНЦ ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ ИМ. В.М. ГОРБАТОВА» РАН, г. Санкт-Петербург ул. Литейная, д.33	
ДАТА,ВРЕМЯ / АКТ ОТБОРА ОБРАЗЦА*	ДАТА ОТБОРА: 29.07.2025 г.	АКТ ОТБОРА: б/н от 29.07.25
ОТБОР ПРОИЗВЕДЕН*	м.п.с Мечтаева Е.В	
МАССА ПАРТИИ/ РАЗМЕР ПАРТИИ/НОМЕР ПАРТИИ*	1000 г	
КОЛИЧЕСТВО ОБРАЗЦА	150 г	
НОМЕР (КОД) ОБРАЗЦА	ОБР.№2	
НОМЕР ЗАЯВКИ, ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ ОБРАЗЦА	№ 1992 з от 07.10.2025 г.	
УПАКОВКА*	НАИМЕНОВАНИЕ УПАКОВКИ: Полимерная вакуумная упаковка	ЦЕЛОСТНОСТЬ УПАКОВКИ: не повреждена
ДАТА ИЗГОТОВЛЕНИЯ*	29.07.2025 г.	
СРОК ГОДНОСТИ*	1 год	
УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ*	Хранить при температуре не выше +25°C	
ОПИСАНИЕ ЭТИКЕТКИ (СОСТАВ)*	-	
СПОСОБ ДОСТАВКИ ОБРАЗЦА*	-	
ДАТА ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ	ДАТА НАЧАЛА: 07.10.2025 г.	ДАТА ОКОНЧАНИЯ: 13.10.2025 г.
НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ*	-	

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

НАИМЕНОВАНИЕ ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ	ЕДИНИЦА ИЗМЕРЕНИЯ	ИД НА МЕТОДИКУ ИССЛЕДОВАНИЙ	РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ
НАИМЕНОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТ:			
АСПАРАГИНОВАЯ КИСЛОТА			162,92
ГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА			147,50
АСПАРАГИН			0,00
ГИСТИДИН		ГОСТ 34132-2017	16,45
СЕРИН	мг/ г белка		52,58
ГЛУТАМИН			0,00
ГЛИЦИН			60,19
ТРЕОНИН			41,73
АРГИНИН			66,64
АЛАНИН			77,04
ТИРОЗИН			63,81

ЦИСТИН			3,73
ВАЛИН			33,78
МЕТИОНИН			22,05
ИЗОЛЕЙЦИН			28,33
ФЕНИЛАЛАНИН		мг/г белка	46,04
ЛЕЙЦИН			92,07
ЛИЗИН			67,48
ТРИПТОФАН			17,65

РУКОВОДИТЕЛЬ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИСПЫТАТЕЛЬНОГО ЦЕНТРА
ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН



Вострикова Н.Л.

13 ОКТЯБРЯ 2025 г.

ПЕРЕПЕЧАТКА И РАЗМНОЖЕНИЕ ЗАКЛЮЧЕНИЯ БЕЗ РАЗРЕШЕНИЯ ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН ЗАПРЕЩАЕТСЯ.
РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ ДЕЙСТВИТЕЛЬНЫ ТОЛЬКО ДЛЯ ОБРАЗЦОВ, ПРОШЕДШИХ ИСПЫТАНИЯ
ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА ПРАВИЛЬНОСТЬ ПРОВЕДЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ ДОСТАВКИ ОТБОРА ПРОБ
ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА СТОРОННИЕ МНЕНИЯ И ТОЛКОВАНИЯ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИСПЫТАНИЙ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИСПЫТАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА ЗАЯВЛЕНОЕ ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ ЗАКАЗЧИКОМ.

Заключение № 1992/4 от 13.10.2025 г. Стр. 2 из 2

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

УТВЕРЖДАЮ

**Директор «ФНЦ пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН**

_____ О.А. Кузнецова
«02» октября 2025 г.

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ

**Стандартный образец состава глюкозамина
(СО глюкозамина)**

2025

1 Наименование

Стандартный образец состава глюкозамина (СО глюкозамина).

2 Нормативные ссылки

ГОСТ ISO Guide 35-2015 Стандартные образцы. Общие и статистические принципы сертификации (аттестации)

РМГ 93-2015 Государственная система обеспечения единства измерений. Оценивание метрологических характеристик стандартных образцов

3 Основание для разработки

Основанием для разработки СО является появление новых требований к пищевой продукции нового вида, полученной из насекомых, разработка соответствующих методов исследования.

Одним из способов определения биомассы насекомых в биологических матрицах является хроматографическое определение глюкозамина и последующий его пересчет в хитин. Для калибровки хроматографических методов необходим СО чистого вещества – глюкозамина.

В госреестре аналоги – СО состава глюкозамина отсутствуют.

Среди коммерческих СО можно выделить следующие аналитические стандарты:

GLUCOSAMINE HYDROCHLORIDE, Кат. №:PHR1199-500MG

Производитель: Sigma-Aldrich

ГЛЮКОЗАМИНА СУЛЬФАТ, Кат. №:CS-T-25367-100GM,

Производитель: Clearsynth

СО состава иных аминов представлены в реестре СО

ГСО 12687-2024	СО СОСТАВА N-ДИБУТИЛНИТРОЗАМИНА (DBNA)
ГСО 12482-2024	СО СОСТАВА N-ДИПРОПИЛНИТРОЗАМИНА (DPNA)

Целью настоящей работы является разработка состава глюкозамина (СО глюкозамина) с аттестованным значениям массовой доли основного вещества.

4 Назначение

- калибровка средств измерений массовой доли основного вещества – глюкозамина;

- контроль точности результатов измерений массовой доли глюкозамина в продовольственном и кормовом сырье, полученном из насекомых, для оценки качественного и количественного содержания биомассы насекомых в готовой пищевой продукции.

Стандартный образец (СО) может применяться:

- при установлении характеристик методик идентификации видовой принадлежности муки сверчка домового (*Acheta Domesticus*) в продовольственном сырье, полученном из насекомых, а также в готовой продукции и мясе,

- при установлении метрологических характеристик методик измерений массовой доли муки сверчка домового (*Acheta Domesticus*) в готовой продукции и мясе;

- для других видов метрологического контроля при соответствии метрологических характеристик СО требованиям процедур метрологического контроля.

Области экономики и сферы деятельности, где планируется применение стандартного образца: пищевая и сельскохозяйственная промышленность, государственный надзор (контроль), научные исследования.

5 Технические требования

5.1 Нормируемые метрологические характеристики

Аттестуемые характеристики:

- массовая доля основного вещества, %;

Интервалы допускаемых аттестованных значений, границы допускаемых значений абсолютной погрешности (при доверительной вероятности $P=0,95$), допускаемые значения абсолютной расширенной неопределенности ($k=2$, $P=0,95$) должны быть не более указанных в Таблице 1.

Таблица 1 – Нормируемые метрологические характеристики СО

Аттестуемая характеристика	Обозначение единицы величины	Интервал допускаемых аттестованных значений СО	Границы допускаемых значений абс. погрешности аттестованного значения СО (при $P=0,95$)	Допускаемые значения абс.расширенной неопределенности аттестованного значения СО ($k=2$, $P=0,95$)
Массовая доля основного вещества	%	от 95,00 до 99,5	от 0,05 до 0,5	0,50

Предполагаемый срок годности СО: 12 месяцев.

5.2 Требования к исходному материалу

СО представляет собой белый кристаллический порошок глюкозамина, расфасованный по (0,1 – 0,5) г в стеклянные виалы с герметичными крышками. Каждая виала снабжается этикеткой, оформленной согласно требованиям ГОСТ Р 8.691-2010. Виала снабжается этикеткой и упаковывается в полиэтиленовый пакет с ZIP-Lock-замком или герметично запаянный полиэтиленовый пакет.

Материал СО идентифицируется методом ИК-Фурье спектроскопии.

5.3 Программа и методика метрологической аттестации

5.3.1 Программа и методика метрологической аттестации СО: аттестацию СО проводят по документации:

- эксплуатационная документация на Государственный первичный эталон единиц массовой доли и массовой (молярной) концентрации воды в твердых и жидких веществах и материалах ГЭТ 173-2017;

- эксплуатационная документация на Государственный вторичный эталон единиц массовой доли и массовой (молярной) концентрации компонентов в твердых и жидких веществах и материалах на основе объемного титриметрического метода анализа ГВЭТ 176-1-2010;

МИ 3561-2016 ГСИ. Оценка неопределенности измерений массовой доли основного компонента в органических веществах

Расчет метрологических характеристик СО осуществляют с учетом положений документов РМГ 93, ГОСТ ISO Guide 35.

5.3.2 Подтверждение полученных аттестованных значений для партии, представленной в целях утверждения типа СО, проводят на ГВЭТ 176-1 Государственном вторичном эталоне единиц массовой доли и массовой (молярной) концентрации компонентов в твердых и жидких веществах и материалах на основе объемного титриметрического метода анализа в УНИИМ – филиале ФГУП «ВНИИМ им.Д.И.Менделеева».

5.3.3 Для установления аттестованных значений Производитель проводит по 5 параллельных определений массовой доли глюкозамина в 6 пробах материала СО в соответствии с методикой измерений, изложенной в документе по 5.3.1.

Результаты измерений оформляют по форме таблицы 2.

Таблица 32 – Форма записи результатов измерений

Номер пробы (в условиях внутрилабораторной прецизионности) <i>n</i>	Результат измерений, % (в условиях повторяемости)					Средний результат, %
1						
.....						
6						

5.3.4 Аттестованное значение массовой доли основного вещества A_i оценивают как среднее арифметическое значение результатов измерений, полученных по 5.3.4.

Стандартную неопределенность от характеристики СО оценивают по формуле (1)

$$u_{char} = u_c, \quad (1)$$

где u_c - суммарная стандартная неопределенность результатов измерений значений аттестуемой характеристики, принятая в соответствии с документом по 5.3.1.

Стандартное отклонение составляющей погрешности от характеристики СО, s_{char} , принимают численно равным стандартной неопределенности от характеристики СО u_{char} .

5.3.5 Определение однородности материала СО для партии, представленной в целях утверждения типа СО, проводит Испытатель по схеме однофакторного дисперсионного анализа в соответствии с РМГ 93. Измерения массовой доли компонента в СО проводят на ГВЭТ 176-1 с использованием 6 проб материала СО, в каждом из которых выполняют по 5 параллельных определений значений аттестуемой характеристики.

При оценивании неоднородности материала СО в каждой новой выпускаемой партии используют результаты измерений, полученные по 5.3.4.

5.3.6 Определение долговременной стабильности проводит Испытатель в рамках испытаний СО. Для исследований долговременной стабильности используют метод ускоренного старения, так как скорость возможных химических реакций в зависимости от температуры должна подчиняться уравнению Вант-Гоффа:

$$\tau = \frac{T}{2^{\frac{t-t_0}{10}}}, \quad (2)$$

где T – назначаемый срок годности СО, сутки;

t_0 – температура хранения СО, °С;

t – температура испытания материала СО, °С.

В случае с назначенным сроком годности 12 месяцев, максимально допустимой температурой хранения 10 °С и температурой испытания СО 30 °С – время старения $\tau = 91$ день. Исследования проводят после выдерживания экземпляров СО при 30 °С в течение 70 дней, что соответствует 9,5 месяцам.

Обработку полученных данных проводят методом регрессионного анализа в соответствии с ГОСТ ISO Guide 35.

5.3.7 Определение кратковременной стабильности проводит Испытатель в рамках испытаний СО путем измерения значений аттестуемых характеристик после выдержки в возможных условиях транспортирования по п.8, моделированных с помощью климатической камеры и охлаждающего термостата.

5.3.8 Суммарную стандартную неопределенность аттестованного значения массовой доли основного вещества оценивают по формуле (3)

$$u_C = \sqrt{u_{char}^2 + u_{bb}^2 + u_{lts}^2 + u_{sts}^2}, \quad (3)$$

где u_{char} – стандартная неопределенность от характеристики СО по п. 5.3.5;

u_{bb} – стандартная неопределенность от неоднородности материала СО по п. 5.3.6;

u_{lts} – стандартная неопределенность от долговременной нестабильности по п. 5.3.7;

u_{sts} – стандартная неопределенность от кратковременной нестабильности по п. 5.3.8.

Суммарное стандартное отклонение аттестованного значения массовой

доли азота, белка оценивают по формуле (4)

$$s_C = \sqrt{s_{char}^2 + s_{bb}^2 + s_{lts}^2 + s_{sts}^2} . \quad (4)$$

Расширенную неопределенность аттестованного значения СО при коэффициенте охвата $k = 2$ рассчитывают по формуле (5)

$$U = 2 \cdot u_C . \quad (5)$$

Границы погрешности аттестованного значения СО при доверительной вероятности $P = 0,95$ рассчитывают по формуле (6)

$$\Delta = 1,96 \cdot s_C . \quad (6)$$

6 Требования безопасности

Материал СО не токсичен, пожаро- и взрывобезопасен.

Требования безопасности при работе с СО соответствуют требованиям, указанным в соответствующих методиках измерений.

Материал, взятый для анализа, после измерений утилизируется в соответствии с требованиями, установленными в лаборатории.

7 Требования к маркировке, таре, упаковке

Каждый экземпляр СО состава глюкозамина (СО глюкозамина) должен быть расфасован по (0,1 – 0,5) г в стеклянные виалы с герметичными крышками. Каждая виала флакон снабжается этикеткой, оформленной согласно требованиям ГОСТ Р 8.691-2010. Виала снабжается этикеткой и упаковывается в полиэтиленовый пакет с ZIP-Lock-замком или герметично запаянный полиэтиленовый пакет.

Этикетка должна содержать следующую информацию:

- Знак утверждения типа СО
- Наименование организации – изготовителя
- Наименование СО и его индекс
- Номер по Федеральному информационному фонду по обеспечению единства измерений (ФИФ)
- Номер партии
- Срок годности экземпляра СО
- Дата выпуска

8 Требования к транспортированию и хранению

СО хранят в упаковке производителя при температуре окружающего воздуха (10–25) °С.

СО транспортируют в горизонтальном положении в специальных влагонепроницаемых пакетах из полиэтилена любыми крытыми видами транспорта.

9 Экономические показатели

9.1 Форма выпуска СО – серийное производство периодически повторяющимися партиями.

9.2 Планируется выпустить 20 экземпляров СО.

9.3 Объем и периодичность следующих партий СО будет определяться потребностью предприятий.

10 Стадии и этапы разработки

№	Наименование этапа	Сроки выполнения этапа
1	Разработка Технического задания на СО	октябрь 2025 г
2	Разработка методики приготовления материала СО	октябрь 2025 г
3	Разработка Программы испытаний стандартного образца СО	октябрь 2025 г
4	Испытания СО в соответствии с Программой испытаний	ноябрь 2025 г
5	Разработка нормативной и технической документации на СО	январь 2026 г
6	Передача материалов испытаний СО на проверку результатов испытаний СО	январь 2026 г

11 Перечень разрабатываемой технической документации

В процессе разработки СО подготавливают следующие документы:

1. Техническое задание на разработку СО.
2. Методика приготовления материала СО.
3. Методика измерений.
4. Паспорт СО.
5. Этикетки СО.
6. Программа испытаний СО серийного выпуска.
7. Фото СО

В процессе испытаний СО в целях утверждения типа Испытателем будут разработаны следующие документы:

1. Программа испытаний СО в целях утверждения типа.
2. Описание типа СО.
3. Акт испытаний СО.
4. Протокол испытаний СО.

12 Оформление и приемка

12.1 Перечень отчетных документов по разработке СО, представляемых на испытания в целях утверждения типа, приведен в разделе 11.

12.2 Содержание отдельных пунктов технического задания может изменяться в установленном порядке.

Руководитель Научно-исследовательского
испытательного центра ФГБНУ «ФНЦ
пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

_____ Н.Л. Вострикова

ОПИСАНИЕ ТИПА СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА

СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ СОСТАВА ГЛЮКОЗАМИНА (СО глюкозамина)

Назначение стандартного образца:

- калибровка средств измерений массовой доли основного вещества – глюкозамина;

- контроль точности результатов измерений массовой доли глюкозамина в продовольственном и кормовом сырье, полученном из насекомых, для оценки качественного и количественного содержания биомассы насекомых в готовой пищевой продукции.

Стандартный образец (СО) может применяться:

- при установлении характеристик методик идентификации видовой принадлежности муки сверчка домового (*Acheta Domesticus*) в продовольственном сырье, полученном из насекомых, а также в готовой продукции и мясе,

- при установлении метрологических характеристик методик измерений массовой доли муки сверчка домового (*Acheta Domesticus*) в готовой продукции и мясе;

- для других видов метрологического контроля при соответствии метрологических характеристик СО требованиям процедур метрологического контроля.

Области экономики и сферы деятельности, где планируется применение стандартного образца: пищевая и сельскохозяйственная промышленность, государственный надзор (контроль), научные исследования.

Области экономики и сферы деятельности, где планируется применение стандартного образца: пищевая и сельскохозяйственная промышленность, государственный надзор (контроль), научные исследования

Описание стандартного образца:

СО представляет собой белый кристаллический порошок глюкозамина, расфасованный по (0,1 – 0,5) г в стеклянные виалы с герметичными крышками. Каждая виала снабжается этикеткой, оформленной согласно требованиям

ГОСТ Р 8.691-2010. Виала снабжается этикеткой и упаковывается в полиэтиленовый пакет с ZIP-Lock-замком или герметично запаянный полиэтиленовый пакет.

Материал СО идентифицируется методом ИК-Фурье спектроскопии, спектр прилагается к Паспорту СО

Форма выпуска: серийное производство периодически повторяющимися партиями.

Метрологические характеристики:

Аттестуемые характеристики:

- массовая доля основного вещества, %;

Интервалы допускаемых аттестованных значений, границы допускаемых значений абсолютной погрешности (при доверительной вероятности $P=0,95$), допускаемые значения абсолютной расширенной неопределенности ($k=2$, $P=0,95$) должны быть не более указанных в Таблице 1

Т а б л и ц а 1 – Нормируемые метрологические характеристики СО

Аттестуемая характеристика	Обозначение единицы величины	Интервал допускаемых аттестованных значений СО	Границы допускаемых значений абс. погрешности аттестованного значения СО (при $P=0,95$)	Допускаемые значения абс.расширенной неопределенности аттестованного значения СО ($k=2$, $P=0,95$)
Массовая доля основного вещества	%	от 95,00 до 99,5	от 0,05 до 0,5	0,50

Прослеживаемость аттестованного значения к единице величины «массовая доля компонента», воспроизводимой ГЭТ 176 Государственным первичным эталоном единиц массовой (молярной, атомной) доли и массовой (молярной) концентрации компонентов в жидких и твёрдых веществах и материалах на основе кулонометрии, обеспечена проведением измерений по аттестованной методике измерений, предусматривающей применение стандартного образца с установленной прослеживаемостью ГСО 10450-2014.

Срок годности экземпляра СО: 12 месяцев.

Знак утверждения типа: наносят полиграфическим способом в правый верхний угол первого листа паспорта СО и в правый верхний угол этикетки стандартного образца утвержденного типа.

Комплектность стандартного образца: СО с этикеткой и паспортом СО утвержденного типа, оформленными по ГОСТ Р 8.691-2010 «ГСИ. Стандартные образцы материалов (веществ). Содержание паспортов и этикеток».

ДОКУМЕНТЫ, устанавливающие требования к стандартному образцу:

1. Наименование и обозначение технической документации, по которой выпущен (будет выпускаться) стандартный образец:

- «Техническое задание. Стандартный образец глюкозамина (СО глюкозамина)», утв. ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН 02.10.2025;
- «Программа испытаний стандартного образца состава глюкозамина (СО глюкозамина) в целях утверждения типа», утв. УНИИМ – филиалом ФГУП «ВНИИМ им.Д.И.Менделеева» 02.10.2025;
- «Программа испытаний стандартного образца состава глюкозамина (СО глюкозамина) серийного выпуска», утв. ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН 02.10.2025.

2. Наименование и обозначение документов, определяющих применение стандартного образца:

- РМГ 61–2010 Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки;
- РМГ 76–2014 Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа;
- методики измерений массовой доли хитина в продовольственном и кормовом сырье, полученном из насекомых, аттестованные в установленном порядке;
- методики измерений массовой доли муки сверчка домового (*Acheta Domesticus*) в готовой продукции и мясе.

3. Периодичность актуализации технической документации на стандартный образец:

не реже одного раза в пять лет.

Номер экземпляра (партии), дата выпуска: представлена в целях утверждения типа стандартного образца партия № 1 от 01 декабря 2025 г.

Правообладатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН (ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)
ИНН 7709022913

Адрес юридического лица и фактического места осуществления деятельности юридического лица: 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26

Телефон: 8 (495) 676-9511

E-mail: info@fncps.ru, web-сайт: www.vniimp.ru

Производитель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН (ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)

ИНН 7709022913

Адрес юридического лица и фактического места осуществления деятельности
юридического лица: 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26

Телефон: 8 (495) 676-9511

E-mail: info@fncps.ru, web-сайт: www.vniimp.ru

Испытательный центр: Уральский научно-исследовательский институт
метрологии - филиал Федерального государственного унитарного предприятия
«Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии имени Д.И.
Менделеева» (УНИИМ – филиал
ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева»).

Юридический адрес: 190005, г. Санкт-Петербург, Московский пр., 19.

Адрес места нахождения: 620075, г. Екатеринбург, ул. Красноармейская, 4.

Телефон: (343) 350-26-18

E-mail: uniim@uniim.ru, web-сайт: www.uniim.ru

Уникальный номер записи в реестре аккредитованных лиц РОСС
RU.0001.310442

Руководитель Научно-исследовательского
испытательного центра ФГБНУ «ФНЦ
пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

Н.Л. Вострикова

Эксперт

УНИИМ-филиал ФГУП «ВНИИМ им.Д.И.Менделеева»

И.Н. Зырянова

ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН,
109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26

Страница 129 из 3

ПАСПОРТ
стандартного образца утвержденного типа



ГСО _____

партия № 1

Наименование стандартного образца: стандартный образец состава глюкозамина (СО глюкозамина)

Назначение:

- калибровка средств измерений массовой доли основного вещества – глюкозамина;

- контроль точности результатов измерений массовой доли глюкозамина в продовольственном и кормовом сырье, полученном из насекомых, для оценки качественного и количественного содержания биомассы насекомых в готовой пищевой продукции.

Стандартный образец (СО) может применяться:

- при установлении характеристик методик идентификации видовой принадлежности муки сверчка домового (*Acheta Domesticus*) в продовольственном сырье, полученном из насекомых, а также в готовой продукции и мясе,

- при установлении метрологических характеристик методик измерений массовой доли муки сверчка домового (*Acheta Domesticus*) в готовой продукции и мясе;

- для других видов метрологического контроля при соответствии метрологических характеристик СО требованиям процедур метрологического контроля.

Метрологические характеристики стандартного образца

Аттестуемые характеристики:

- массовая доля основного вещества, %;

Интервалы допускаемых аттестованных значений, границы допускаемых значений абсолютной погрешности (при доверительной вероятности $P=0,95$), допускаемые значения абсолютной расширенной неопределенности ($k=2$, $P=0,95$) должны быть не более указанных в Таблице 1.

Таблица 1 – Нормируемые метрологические характеристики СО

Аттестуемая характеристика	Обозначение единицы величины	Интервал допускаемых аттестованных значений СО	Границы допускаемых значений абс. погрешности аттестованного значения СО (при $P=0,95$)	Допускаемые значения абс.расширенной неопределенности аттестованного значения СО ($k=2, P=0,95$)
Массовая доля основного вещества	%	от 95,00 до 99,5	от 0,05 до 0,5	0,50

Срок годности экземпляра СО: 12 месяцев.

Описание: СО представляет собой белый кристаллический порошок глюкозамина, расфасованный по (0,1 – 0,5) г в стеклянные виалы с герметичными крышками. Каждая виала снабжается этикеткой, оформленной согласно требованиям ГОСТ Р 8.691-2010. Виала снабжается этикеткой и упаковывается в полиэтиленовый пакет с ZIP-Lock-замком или герметично запаянный полиэтиленовый пакет.

Утверждение о прослеживаемости:

Прослеживаемость аттестованного значения к единице величины «массовая доля компонента», воспроизводимой ГЭТ 176 Государственным первичным эталоном единиц массовой (молярной, атомной) доли и массовой (молярной) концентрации компонентов в жидких и твёрдых веществах и материалах на основе кулонометрии, обеспечена проведением измерений по аттестованной методике измерений, предусматривающей применение стандартного образца с установленной прослеживаемостью ГСО 10450-2014.

Инструкция по применению

Общие указания:

Перед использованием стандартного образца необходимо проверить комплектность, упаковку, наличие маркировки и этикетки путем внешнего осмотра. Упаковка стандартного образца должна быть герметичной и не иметь повреждений. При повреждении упаковки или отсутствии этикетки и маркировки стандартный образец не может быть использован.

После вскрытия флакона и отбора навесок, оставшаяся часть материала стандартного образца хранится в плотно закрытом флаконе и применяется в соответствии с паспортом стандартного образца в пределах действия его срока годности. Не допускается сыпать использованный материал стандартного образца в исходный флакон.

Наименьшая представительная проба составляет 0,1 г.

Условия хранения и транспортирования:

Стандартный образец должен храниться плотно закрытым в упаковке производителя в защищённом от попадания прямых солнечных лучей месте при температуре окружающего воздуха (10 ± 25)°С.

Транспортировка стандартного образца может осуществляться любыми видами транспорта при температуре окружающего воздуха от плюс 2 °С до плюс 30 °С при условии обеспечения сохранности упаковки стандартного образца, предохраняющей стандартный образец от механических повреждений, загрязнений, попадания влаги, света и контакта с агрессивными средами. Срок транспортировки не более 14 дней.

После вскрытия упаковки экземпляр СО хранению не подлежит.

Требования безопасности: Материал СО не токсичен. Другие требования безопасности при работе с СО соответствуют требованиям, указанным в соответствующих методиках измерений.

Комплект поставки: СО с этикеткой, паспорт.

Дата выпуска партии № 1: 01 декабря 2025 г.

Срок действия утвержденного типа стандартного образца до _____.

Ответственные за выпуск СО:

Руководитель Научно-исследовательского
испытательного центра ФГБНУ «ФНЦ
пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН _____ Вострикова Н.Л.

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

УТВЕРЖДАЮ

**Директор «ФНЦ пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН**

_____ О.А. Кузнецова
«02» октября 2025 г.

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ

**Стандартный образец состава муки сверчка домового
(CO Acheta Domesticus)**

1 Наименование

Стандартный образец муки сверчка домового (CO Acheta Domesticus).

2 Нормативные ссылки

ГОСТ ISO Guide 35-2015 Стандартные образцы. Общие и статистические принципы сертификации (аттестации)

ГОСТ 31719-2012 Продукты пищевые и корма. Экспресс-метод определения сырьевого состава (молекулярный)

РМГ 93-2015 Государственная система обеспечения единства измерений. Оценивание метрологических характеристик стандартных образцов

3 Основание для разработки

Основанием для разработки СО является появление новых требований к пищевой продукции нового вида, полученной из насекомых, разработка соответствующих методов исследования, подготовка методических указаний для установления видовой принадлежности сверчка домового (Acheta Domesticus) в продовольственном сырье, полученном из насекомых, а также в готовой продукции и мясе.

В госреестре аналоги – СО видовой принадлежности насекомых, в том числе СО сверчка домового, отсутствуют.

Ближайшими аналогами являются

1) СО состава мяса кур (МП-2-3 СО Gallus gallus) ГСО 11707-2021. Материал СО состава мяса кур ГСО 11707-2021 представляет собой сухой лиофилизированный порошок, приготовленный из мяса кур, который расфасован по (7-70) мг в вialsы с герметичными кримповыми крышками. (Масса одного экземпляра СО эквивалентна 100 мг сырого мяса). Срок годности экземпляра 12 месяцев.

2) СО состава стерилизованного мяса кур (МП-3-3 СО Gallus gallus) ГСО 12074-2022. СО представляет собой сухой лиофилизированный порошок, приготовленный из мяса кур, прошедшего термическую обработку с достигнутой величиной стерилизующего эффекта (F-эффект) от 22 до 24 условных минут, который расфасован массой от 7 до 70 мг в вialsы с герметичными кримповыми крышками. (Масса одного экземпляра СО эквивалентна 100 мг исходного продукта, прошедшего термическую обработку с достигнутой величиной стерилизующего эффекта (F-эффект) от 22 до 24 условных минут). Вialа снабжается этикеткой и упаковывается в полиэтиленовый пакет с ZIP-Lock-замком или герметично запаянный полиэтиленовый пакет. Срок годности экземпляра 12 месяцев.

Среди СО видовой принадлежности насекомых, в том числе СО сверчка домового, отсутствуют.

Целью настоящей работы является разработка СО состава муки сверчка домового (CO Acheta Domesticus) с аттестованными значениями массовых долей азота, белка.

В качестве дополнительной характеристики материала необходимо привести информацию об установленной нуклеотидной последовательности

гена cytochrome oxidase subunit 1, позволяющей однозначно идентифицировать видовую принадлежность.

4 Назначение

- калибровка средств измерений массовой доли азота, белка в продовольственном и кормовом сырье, полученном из насекомых;
- контроль точности результатов измерений массовой доли азота, белка в продовольственном и кормовом сырье, полученном из насекомых.

Стандартный образец (СО) может применяться:

- при установлении характеристик методик идентификации видовой принадлежности муки сверчка домового (*Acheta Domesticus*) в продовольственном сырье, полученном из насекомых, а также в готовой продукции и мясе,
- при установлении метрологических характеристик методик измерений массовой доли муки сверчка домового (*Acheta Domesticus*) в готовой продукции и мясе;
- для других видов метрологического контроля при соответствии метрологических характеристик СО требованиям процедур метрологического контроля.

Области экономики и сферы деятельности, где планируется применение стандартного образца: пищевая и сельскохозяйственная промышленность, государственный надзор (контроль), научные исследования.

5 Технические требования

5.1 Нормируемые метрологические характеристики

Аттестуемые характеристики:

- массовая доля азота, %;
- массовая доля белка, %.

Интервалы допускаемых аттестованных значений, границы допускаемых значений абсолютной погрешности (при доверительной вероятности $P=0,95$), допускаемые значения абсолютной расширенной неопределенности ($k=2$, $P=0,95$) должны быть не более указанных в Таблице 1.

Таблица 1 – Нормируемые метрологические характеристики СО

Аттестуемая характеристика	Обозначение единицы величины	Интервал допустимых аттестованных значений СО	Границы допустимых значений абсолютной погрешности аттестованного значения СО (при $P=0,95$)	Допускаемые значения абсолютной расширенной неопределенности аттестованного значения СО ($k=2, P=0,95$)
Массовая доля азота	%	7,00 – 16,64	$\pm 0,40$	0,40
Массовая доля белка*	%	40,0 – 95,0	$\pm 2,5$	2,5
*Коэффициент пересчета массовой доли азота на массовую долю белка – 5,71.				

Предполагаемый срок годности СО: 12 месяцев.

5.2 Требования к исходному материалу

СО представляет собой сухой лиофилизированный порошок, приготовленный продовольственного сырья, полученного из насекомых (вид насекомых – *Acheta Domesticus*), расфасован массой от 7 до 20 мг в вials с герметичными кримповыми крышками (масса одного экземпляра СО эквивалентна 100 мг исходного продукта). Вial снабжается этикеткой и упаковывается в полиэтиленовый пакет с ZIP-Lock-замком или герметично запаянный полиэтиленовый пакет.

Материал СО идентифицирован методом проверки соответствия нуклеотидной последовательности гена cytochrome oxidase subunit 1, представленной в базе данных GenBank, EMBL и DDBJ.

5.3 Программа и методика метрологической аттестации

5.3.1 Программа и методика метрологической аттестации СО: аттестацию СО проводят по методике измерений, содержащейся в документе «Методические рекомендации. Белковые пищевые продукты животного и растительного происхождения. Определение азота (белка) методом Кьельдаля» (планируется разработать и аттестовать в рамках испытаний СО). Расчет метрологических характеристик СО осуществляют с учетом положений документов РМГ 93, ГОСТ ISO Guide 35.

5.3.2 Подтверждение полученных аттестованных значений для партии, представленной в целях утверждения типа СО, проводят на ГВЭТ 176-1 Государственном вторичном эталоне единиц массовой доли и массовой (молярной) концентрации компонентов в твердых и жидких веществах и материалах на основе объемного титриметрического метода анализа в УНИИМ – филиале ФГУП «ВНИИМ им.Д.И.Менделеева».

Контроль погрешности (неопределенности) результатов измерений по аттестованной методике измерений при установлении аттестованных значений массовой доли азота, белка **в каждой новой выпускаемой партии** проводят

путем контроля точности измерений, используя ГСО 11274-2019/ ГСО 11276-2019 СО состава мясных продуктов сублимационной сушки (набор МП-1 СО УНИИМ), в которых обеспечена прослеживаемость аттестованного значения массовой доли азота, белка к единице величины «массовая доля компонента», воспроизводимой ГЭТ 176 Государственным первичным эталоном единиц массовой (молярной, атомной) доли и массовой (молярной) концентрации компонентов в жидких и твёрдых веществах и материалах на основе кулонометрии. Алгоритм контроля будет прописан в документе по п. 5.3.1.

Подтверждение полученных аттестованных значений для **каждой новой выпускаемой партии** проводят спектрофотометрическим методом в соответствии с ГОСТ 25011-2017 (п.7).

5.3.3 Идентификацию видоспецифичной ДНК осуществляют в соответствии с МР 4.2.0019, ГОСТ 31719-2012.

5.3.4 Для установления аттестованных значений Производитель проводит по 5 параллельных определений массовой доли азота, белка в 6 пробах материала СО в соответствии с аттестованной методикой измерений, изложенной в документе по 5.3.1.

Результаты измерений оформляют по форме таблицы 3.

Таблица 3 – Форма записи результатов измерений

Номер пробы (в условиях внутрилабораторной прецизионности) <i>n</i>	Результат измерений, % (в условиях повторяемости)					Средний результат, %
1						
.....						
6						

5.3.5 Аттестованное значение массовой доли азота, белка A_i оценивают как среднее арифметическое значение результатов измерений, полученных по 5.3.4.

Стандартную неопределенность от характеристики СО оценивают по формуле (1)

$$u_{char} = u_c, \quad (1)$$

где u_c - суммарная стандартная неопределенность результатов измерений значений аттестуемой характеристики, принятая в соответствии с документом по 5.3.1.

Стандартное отклонение составляющей погрешности от характеристики СО, s_{char} , принимают численно равным стандартной неопределенности от характеристики СО u_{char} .

5.3.6 Определение однородности материала СО для партии, представленной в целях утверждения типа СО, проводит Испытатель по схеме однофакторного дисперсионного анализа в соответствии с РМГ 93. Измерения массовой доли компонента в СО проводят на ГВЭТ 176-1 с использованием 6

проб материала СО, в каждом из которых выполняют по 5 параллельных определений значений аттестуемой характеристики.

При оценивании неоднородности материала СО в каждой новой выпускаемой партии используют результаты измерений, полученные по 5.3.4.

5.3.7 Определение долговременной стабильности проводит Испытатель в рамках испытаний СО. Для исследований долговременной стабильности используют метод ускоренного старения, так как скорость возможных химических реакций в зависимости от температуры должна подчиняться уравнению Вант-Гоффа:

$$\tau = \frac{T}{2^{\frac{t-t_0}{10}}}, \quad (2)$$

где T – назначаемый срок годности СО, сутки;

t_0 – температура хранения СО, °С;

t – температура испытания материала СО, °С.

В случае с назначенным сроком годности 12 месяцев, максимально допустимой температурой хранения 10 °С и температурой испытания СО 30 °С – время старения $\tau = 91$ день. Исследования проводят после выдерживания экземпляров СО при 30 °С в течение 70 дней, что соответствует 9,5 месяцам.

Обработку полученных данных проводят методом регрессионного анализа в соответствии с ГОСТ ISO Guide 35.

5.3.8 Определение кратковременной стабильности проводит Испытатель в рамках испытаний СО путем измерения значений аттестуемых характеристик после выдержки в возможных условиях транспортирования по п.8, моделированных с помощью климатической камеры и охлаждающего термостата.

5.3.9 Суммарную стандартную неопределенность аттестованного значения массовой доли азота, белка оценивают по формуле (3)

$$u_C = \sqrt{u_{char}^2 + u_{bb}^2 + u_{lts}^2 + u_{sts}^2}, \quad (3)$$

где u_{char} – стандартная неопределенность от характеристики СО по п. 5.3.5;

u_{bb} – стандартная неопределенность от неоднородности материала СО по п. 5.3.6;

u_{lts} – стандартная неопределенность от долговременной нестабильности по п. 5.3.7;

u_{sts} – стандартная неопределенность от кратковременной нестабильности по п. 5.3.8.

Суммарное стандартное отклонение аттестованного значения массовой доли азота, белка оценивают по формуле (4)

$$s_C = \sqrt{s_{char}^2 + s_{bb}^2 + s_{lts}^2 + s_{sts}^2}. \quad (4)$$

Расширенную неопределенность аттестованного значения СО при коэффициенте охвата $k = 2$ рассчитывают по формуле (5)

$$U = 2 \cdot u_C. \quad (5)$$

Границы погрешности аттестованного значения СО при доверительной вероятности $P = 0,95$ рассчитывают по формуле (6)

$$\Delta = 1,96 \cdot s_c . \quad (6)$$

6 Требования безопасности

Материал СО не токсичен, пожаро- и взрывобезопасен.

Требования безопасности при работе с СО соответствуют требованиям, указанным в соответствующих методиках измерений.

Материал, взятый для анализа, после измерений утилизируется в соответствии с требованиями, установленными в лаборатории.

7 Требования к маркировке, таре, упаковке

Каждый экземпляр СО состава муки сверчка домового (СО *Acheta Domesticus*) должен быть расфасован по (7-20) мг в виалу с герметичной кримповой крышкой. Виала снабжается этикеткой и упаковывается в полиэтиленовые пакеты с ZIP-Lock-замком или герметично запаянный полиэтиленовый пакет.

Этикетка должна содержать следующую информацию:

- Знак утверждения типа СО
- Наименование организации – изготовителя
- Наименование СО и его индекс
- Номер по Федеральному информационному фонду по обеспечению единства измерений (ФИФ)
- Номер партии
- Срок годности экземпляра СО
- Дата выпуска

8 Требования к транспортированию и хранению

СО хранят в упаковке производителя при температуре окружающего воздуха

(2–10) °С и относительной влажности не более 60 %.

СО транспортируют в горизонтальном положении в специальных влагонепроницаемых пакетах из полиэтилена любыми крытыми видами транспорта при температуре окружающего воздуха от плюс 2 °С до плюс 30 °С и относительной влажности не более 60 % при условии обеспечения сохранности упаковки СО. Срок транспортировки не более 14 дней. После вскрытия упаковки экземпляр СО хранению не подлежит.

9 Экономические показатели

9.1 Форма выпуска СО – серийное производство периодически повторяющимися партиями.

9.2 Планируется выпустить 50 экземпляров СО.

9.3 Объем и периодичность следующих партий СО будет определяться потребностью предприятий.

10 Стадии и этапы разработки

№	Наименование этапа	Сроки выполнения этапа
1	Разработка Технического задания на СО	октябрь 2025 г
2	Разработка методики приготовления материала СО	октябрь 2025 г
3	Разработка Программы испытаний стандартного образца СО	октябрь 2025 г
4	Испытания СО в соответствии с Программой испытаний	ноябрь 2025 г
5	Разработка нормативной и технической документации на СО	декабрь 2025 г
6	Передача материалов испытаний СО на проверку результатов испытаний СО	декабрь 2025 г

11 Перечень разрабатываемой технической документации

В процессе разработки СО подготавливают следующие документы:

8. Техническое задание на разработку СО.
9. Методика приготовления материала СО.
10. Методика измерений.
11. Паспорт СО.
12. Этикетки СО.
13. Программа испытаний СО серийного выпуска.
14. Фото СО

В процессе испытаний СО в целях утверждения типа Испытателем будут разработаны следующие документы:

5. Программа испытаний СО в целях утверждения типа.
6. Описание типа СО.
7. Акт испытаний СО.
8. Протокол испытаний СО.

12 Оформление и приемка

12.1 Перечень отчетных документов по разработке СО, представляемых на испытания в целях утверждения типа, приведен в разделе 11.

12.2 Содержание отдельных пунктов технического задания может изменяться в установленном порядке.

Руководитель Научно-исследовательского
испытательного центра ФГБНУ «ФНЦ
пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
Вострикова

Н.Л.

УТВЕРЖДЕНО
приказом Федерального агентства
по техническому регулированию
и метрологии
от «___» _____ 2025 г. №___

Регистрационный № ГСО

Лист № 1
Всего листов 147

ОПИСАНИЕ ТИПА СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА

СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ СОСТАВА МУКИ СВЕРЧКА ДОМОВОГО (СО
Acheta Domesticus)

Назначение стандартного образца:

- калибровка средств измерений массовой доли азота, белка в продовольственном и кормовом сырье, полученном из насекомых;
- контроль точности результатов измерений массовой доли азота, белка в продовольственном и кормовом сырье, полученном из насекомых.

Стандартный образец (СО) может применяться:

- при установлении характеристик методик идентификации видовой принадлежности муки сверчка домового (*Acheta Domesticus*) в продовольственном сырье, полученном из насекомых, а также в готовой продукции и мясе,
- при установлении метрологических характеристик методик измерений массовой доли муки сверчка домового (*Acheta Domesticus*) в готовой продукции и мясе;
- для других видов метрологического контроля при соответствии метрологических характеристик СО требованиям процедур метрологического контроля.

Области экономики и сферы деятельности, где планируется применение стандартного образца: пищевая и сельскохозяйственная промышленность, государственный надзор (контроль), научные исследования

Описание стандартного образца:

СО представляет собой сухой лиофилизированный порошок, приготовленный продовольственного сырья, полученного из насекомых (вид насекомых – *Acheta Domesticus*), расфасован массой от 7 до 20 мг в виалы с герметичными кримповыми крышками (масса одного экземпляра СО эквивалентна 100 мг исходного продукта). Виала снабжается этикеткой и упаковывается в

полиэтиленовый пакет с ZIP-Lock-замком или герметично запаянный полиэтиленовый пакет.

Материал СО идентифицирован методом проверки соответствия нуклеотидной последовательности гена cytochrome oxidase subunit 1, представленной в базе данных GenBank, EMBL и DDBJ.

Форма выпуска: серийное производство периодически повторяющимися партиями.

Метрологические характеристики: аттестуемые характеристики – массовые доля азота, белка, %.

Т а б л и ц а 2 – Нормируемые метрологические характеристики СО

Аттестуемая характеристика	Обозначение единицы величины	Интервал допускаемых аттестованных значений СО	Границы допускаемых значений абсолютной погрешности аттестованного значения СО (при $P=0,95$)	Допускаемые значения абсолютной расширенной неопределенности аттестованного значения СО ($k=2, P=0,95$)
Массовая доля азота	%	7,00 – 16,64	$\pm 0,40$	0,40
Массовая доля белка*	%	40,0 – 95,0	$\pm 2,5$	2,5

*Коэффициент пересчета массовой доли азота на массовую долю белка – 5,71.

Прослеживаемость аттестованного значения к единице величины «массовая доля компонента», воспроизводимой ГЭТ 176 Государственным первичным эталоном единиц массовой (молярной, атомной) доли и массовой (молярной) концентрации компонентов в жидких и твёрдых веществах и материалах на основе кулонометрии, обеспечена проведением измерений по аттестованной методике измерений, предусматривающей применение стандартного образца с установленной прослеживаемостью ГСО 10450-2014.

Срок годности экземпляра СО: 12 месяцев.

Знак утверждения типа: наносят полиграфическим способом в правый верхний угол первого листа паспорта СО и в правый верхний угол этикетки стандартного образца утвержденного типа.

Комплектность стандартного образца: от 1 до 10 экземпляров СО (по требованию заказчика) с этикеткой и паспортом СО утвержденного типа, оформленными по ГОСТ Р 8.691-2010 «ГСИ. Стандартные образцы материалов (веществ). Содержание паспортов и этикеток».

ДОКУМЕНТЫ, устанавливающие требования к стандартному образцу:

3. Наименование и обозначение технической документации, по которой выпущен (будет выпускаться) стандартный образец:

- «Техническое задание. Стандартный образец состава муки сверчка домового (CO Acheta Domesticus)», утв. ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН 02.10.2025;
- «Программа испытаний стандартного образца состава муки сверчка домового (CO Acheta Domesticus) в целях утверждения типа», утв. УНИИМ – филиалом ФГУП «ВНИИМ им.Д.И.Менделеева» 02.10.2025;
- «Программа испытаний стандартного образца состава муки сверчка домового (CO Acheta Domesticus) серийного выпуска», утв. ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН 02.10.2025.

4. Наименование и обозначение документов, определяющих применение стандартного образца:

- РМГ 61–2010 Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки;
- РМГ 76–2014 Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа;
- ГОСТ 31719-2012 Продукты пищевые и корма. Экспресс-метод определения сырьевого состава (молекулярный);
- методики измерений массовой доли азота, белка в продовольственном и кормовом сырье, полученном из насекомых, аттестованные в установленном порядке;
- методики измерений массовой доли муки сверчка домового (Acheta Domesticus) в готовой продукции и мясе.

5. Периодичность актуализации технической документации на стандартный образец: не реже одного раза в пять лет.

Номер экземпляра (партии), дата выпуска: представлена в целях утверждения типа стандартного образца партия № 1 от 01 декабря 2025 г.

Правообладатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН (ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)
ИНН 7709022913

Адрес юридического лица и фактического места осуществления деятельности юридического лица: 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26

Телефон: 8 (495) 676-9511

E-mail: info@fncps.ru, web-сайт: www.vniimp.ru

Производитель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН (ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)
ИНН 7709022913

Адрес юридического лица и фактического места осуществления деятельности юридического лица: 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26

Телефон: 8 (495) 676-9511

E-mail: info@fncps.ru, web-сайт: www.vniimp.ru

Испытательный центр: Уральский научно-исследовательский институт метрологии - филиал Федерального государственного унитарного предприятия «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии имени Д.И. Менделеева» (УНИИМ – филиал ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева»).

Юридический адрес: 190005, г. Санкт-Петербург, Московский пр., 19.

Адрес места нахождения: 620075, г. Екатеринбург, ул. Красноармейская, 4.

Телефон: (343) 350-26-18

E-mail: uniim@uniim.ru, web-сайт: www.uniim.ru

Уникальный номер записи в реестре аккредитованных лиц РОСС RU.0001.310442

Руководитель Научно-исследовательского
испытательного центра ФГБНУ «ФНЦ
пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

Н.Л. Вострикова

Эксперт

УНИИМ-филиал ФГУП «ВНИИМ им.Д.И.Менделеева»

И.Н. Зырянова

ПАСПОРТ
стандартного образца утвержденного типа

ГСО _____

партия № 1



Наименование стандартного образца: стандартный образец состава муки сверчка домового (СО *Acheta Domesticus*)

Назначение:

- калибровка средств измерений массовой доли азота, белка в продовольственном и кормовом сырье, полученном из насекомых;
- контроль точности результатов измерений массовой доли азота, белка в продовольственном и кормовом сырье, полученном из насекомых.

Стандартный образец (СО) может применяться:

- при установлении характеристик методик идентификации видовой принадлежности муки сверчка домового (*Acheta Domesticus*) в продовольственном сырье, полученном из насекомых, а также в готовой продукции и мясе,
- при установлении метрологических характеристик методик измерений массовой доли муки сверчка домового (*Acheta Domesticus*) в готовой продукции и мясе;
- для других видов метрологического контроля при соответствии метрологических характеристик СО требованиям процедур метрологического контроля.

Метрологические характеристики стандартного образца

аттестуемые характеристики – массовые доли азота, белка, %.

Т а б л и ц а 1 – Метрологические характеристики СО

Аттестуемая характеристика	Обозначение единицы величины	Аттестованное значение	Границы абсолютной погрешности аттестованного значения (при $P=0,95$)	Значение абсолютной расширенной неопределенности аттестованного значения ($k=2, P=0,95$)
Массовая доля азота	%	11,66	$\pm 0,40$	0,40
Массовая доля белка*	%	66,58	$\pm 2,5$	2,5

* Коэффициент пересчета массовой доли азота на массовую долю белка – 5,71.

Срок годности экземпляра СО: 12 месяцев.

Описание: СО представляет собой сухой лиофилизированный порошок, приготовленный из биомассы сверчка домашнего (*Acheta Domesticus*), расфасован по **(8,0 ± 1,5) мг** в виалы с герметичными кримповыми крышками (масса одного экземпляра СО эквивалентна **100 мг** исходного продукта). Виала снабжается этикеткой и упаковывается в полиэтиленовый пакет с ZIP-Lock-замком или герметично запаянный полиэтиленовый пакет.

Материал СО идентифицирован методом проверки соответствия нуклеотидной последовательности гена cytochrome oxidase subunit 1, представленной в базе данных GenBank, EMBL и DDBJ, доступных через интернет-ресурс www.ncbi.nlm.nih.gov.

Методики (методы) измерений, примененные при установлении метрологических характеристик СО: «Методические рекомендации. Белковые пищевые продукты животного и растительного происхождения. Определение азота (белка) методом Кьельдаля» (свидетельство об аттестации методики измерений №241.0078/RA.RU.311866/2023, выдано 30.10.2023 УНИИМ – филиалом ФГУП «ВНИИМ им.Д.И.Менделеева»).

Утверждение о прослеживаемости:

Прослеживаемость аттестованного значения к единице величины «массовая доля компонента», воспроизводимой ГЭТ 176 Государственным первичным эталоном единиц массовой (молярной, атомной) доли и массовой (молярной) концентрации компонентов в жидких и твёрдых веществах и материалах на основе кулонометрии, обеспечена проведением измерений по аттестованной методике измерений, предусматривающей применение стандартного образца с установленной прослеживаемостью ГСО 10450-2014.

Дополнительные сведения:

Нуклеотидная последовательность *Acheta domesticus* voucher B10UG19558-F09 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene

NCBI # >KR919588.1

```
CATTTTCGGAGCTTGAGCTGGAATAGTAGGTACCTCTTTAAGTATCTTAATTCGAACGG
AACTAGGACAACCAGGTTATTTAATTGGAGATGATCAAACATATAATGTTATCGTAAC
TGCACATGCATTTGTCATAATTTTTTTCATGGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTCGG
AAATTGATTAGTACCCСТААТАТТАGGTGCACCCGATATAGCCTTTCCTCGAATAAACA
ATATAAGATTTTGAСТTTTACCACCCTCACTAACCTTTTATTAACCAGAAGAATAGTC
GAAAATGGTGCAGGGACAGGATGAACAGTTTATCCACSTTTATCAACAGGAATCGCCC
ACGCCGGAGCATCTGTTGATTTAGCCATTTTTTCATTACACTTAGCTGGAATTTTCATCA
ATTCTGGGAGCCGTTAATTTTCATTACAACСТАТААТСААТАТАCGAGCACCTGGGATGTC
ATTAGATCAAACCCCATTTATTTGTATGAGCTGTTGGAATCACTGCCCTCCTCCTANNAT
CTTTACCTGTTCTTGCGGGT
```

Forward primer CATTTTCGGAGCTTGAGCTGG

Reverse primer ACCCGCAAGAACAGGTAAAGA

Product length 550

Т а б л и ц а 2 – Характеристики соответствия навески СО ста миллиграммам исходного продукта при постановке ПЦР в реальном времени

№ п/п	Объект исследования	Единица измерений	Интервал значений допустимых порогового цикла, Ст ^{1), 2)}
1	ДНК, выделенная из 100 мг исходного продукта (таблица 2)	Значение Ст	10 – 26
2	ДНК, выделенная из готовой навески предыдущей партии СО	Значение Ст	10 – 26
3	ДНК, выделенная из готовой навески новой партии СО	Значение Ст	10 – 26
Примечания к таблице: ¹⁾ зависит от марки амплификатора и метода выделения ДНК. Все 3 постановки должны выполняться одним методом и на одном оборудовании; ²⁾ расхождение в значениях Ст объектов 1, 2, 3 должно составлять не более 0,5.			

Инструкция по применению

Перед вскрытием виалы с экземпляром СО проверяют целостность упаковки (отсутствие нарушений упаковки) путем внешнего осмотра.

При контроле точности результатов измерений массовых долей азота, белка

СО применяют согласно методикам измерений, аттестованным в установленном порядке.

Допускается проведение измерений массовой доли азота, белка в объединенной пробе, составленной с использованием нескольких экземпляров СО (до десяти штук одновременно, взятых из одной партии). Непосредственно перед проведением измерений виалы с СО вскрывают и содержимое полностью высыпают в емкость, которую будут использовать для дальнейшего анализа.

Порядок применения СО для аттестации методик измерений и контроля показателей точности результатов измерений установлен в РМГ 61-2010, РМГ 76-2014.

Использование СО для калибровки осуществляется в соответствии с методиками калибровки.

При контроле определения видовой принадлежности белковых ингредиентов в готовой продукции и мясе

СО применяют согласно ГОСТ 31719-2012, МР 4.2.0019-11 и другим методикам, основанным на методе ПЦР.

Виалу с СО вскрывают, и содержимое высыпают в микропробирку объемом $(1,5 \div 1,7) \text{ см}^3$, предназначенную для отбора проб. Для полной эвакуации содержимого виалы его заливают лизирующим буфером используемой тест-системы в количестве, прописанном в инструкции производителя данной тест-системы. Аккуратно перемешивают содержимое виалы без образования пены и переносят в микропробирку с СО. Пробу, подготовленную из СО, проводят параллельно с рабочими пробами согласно процедуре измерений. Выделенную ДНК хранят при температуре минус $(18 \pm 2)^\circ \text{C}$ в течение 1 месяца или при

температуре плюс (4 ± 2) °С не более 3 суток. Количество циклов заморозки/разморозки не должно превышать 3. При проведении количественного или полуколичественного анализа готовят серию кратных разведений. Учет результатов ПЦР реакции с применением СО и его разведений допускается только для серии одновременно выделенной ДНК СО и испытательных образцов.

Условия хранения и транспортирования: СО хранят в упаковке производителя при температуре окружающего воздуха (2 – 10) °С и относительной влажности не более 60 %.

СО транспортируют в горизонтальном положении в специальных влагонепроницаемых пакетах из полиэтилена любыми крытыми видами транспорта при температуре окружающего воздуха от плюс 2 °С до плюс 30 °С и относительной влажности не более 60 % при условии обеспечения сохранности упаковки СО. Срок транспортировки не более 14 дней.

После вскрытия упаковки экземпляр СО хранению не подлежит.

Требования безопасности: Материал СО не токсичен. Другие требования безопасности при работе с СО соответствуют требованиям, указанным в соответствующих методиках измерений.

Комплект поставки: от 1 до 10 экземпляров СО (по требованию заказчика) в полиэтиленовом пакете с ZIP-Lock-замком или герметично запаянном полиэтиленовом пакете с этикеткой, паспорт.

Дата выпуска партии № 1: 01 декабря 2025 г.

Срок действия утвержденного типа стандартного образца
до _____.

Ответственные за выпуск СО:

Заведующий лабораторией молекулярной биологии и биоинформатики ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН _____ Минаев М.Ю.

Руководитель Научно-исследовательского испытательного центра ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН _____ Вострикова Н.Л.

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН _____ Кузнецова О.А.

« ____ » декабря 2025 г.
М.П.