Pojavnost patvorenja vegetarijanskih proizvoda u Republici Hrvatskoj

Kusik, Davinija

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:849956

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Davinija Kusik

Stručni studij Zootehnika

Pojavnost patvorenja vegetarijanskih proizvoda u Republici Hrvatskoj

Završni rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Davinija Kusik

Stručni studij Zootehnika

Pojavnost patvorenja vegetarijanskih proizvoda u Republici Hrvatskoj

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:

1. prof.dr.sc. Goran Kušec, predsjednik
2. doc.dr.sc. Ivona Djurkin Kušec, mentor
3. doc.dr.sc. Vladimir Margeta, član

Osijek, 2017

SADRŽAJ

1.UVOD 1

2. PREGLED LITERATURE 2

2.1. KVANTITATIVNI PCR (qPCR) 3

2.2. PCR-RFLP 4

2.3. PCR-AFLP 5

2.4. SEKVENCIRANJE 5

2.5. PCR-RAPD 6

2.6. PCR TEMELJEN NA POČETNICAMA SPECIFIČNIM ZA VRSTU 6

2.6.1. *Združeni PCR* 7

3. MATERIJALI I METODE 8

3.1. DNA analiza 9

3.1.1. Izolacija DNA 9

3.1.2. Lančana reakcija polimerazom 10

4. REZULTATI I RASPRAVA 12

5. ZAKLJUČAK 15

6. LITERATURA 16

7. SAŽETAK 19

8. SUMMARY 20

9. POPIS SLIKA 21

10. POPIS TABLICA 22

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 23

1.UVOD

Uz poboljšanje kvalitete života prehrambena industrija neviđeno je napredovala i prosperirala, što je rezultiralo stvaranjem novih prehrambenih proizvoda. U međuvremenu problem sigurnosti hrane privukao je veću pozornost zbog raznih netočnih opisa i prijevara na deklaraciji poput maslinovog ulja pomiješanog s drugim jeftinijim uljima, govedine pomiješane s konjskim ili svinjskim mesom, mesa divljači zamijenjenog mesom domaćih životinja, a na tržištu morskih plodova i vegetarijanske hrane pojavljuje se kontaminacija sa životinjskim sastojcima. S povećanjem potražnje za vegetarijanskim proizvodima na tržištu neki proizvodi su pomiješani sa životinjskim komponentama radi poboljšanja teksture i okusa te manjih troškova. Obveza svih proizvođača hrane je osigurati visoku razinu zaštite potrošača. Proizvedena hrana mora biti pravilno deklarirana i zdravstveno ispravna te potrošačima treba osigurati sve bitne informacije o proizvodu kojeg kupuju (Knežević i sur., 2014.). Lažan i netočan opis proizvoda stvara lošu sliku o proizvođaču i negativno se reflektira na povjerenje potrošača. Štoviše, zabrinjavajuće je to što neki životinjski sastojci mogu izazvati štetne, alergijske ili zdravstvene rizike, kao što je „otpadno“ ulje (izrađeno od recikliranog kuhinjskog ulja), a koje je predstavljeno kao biljno ulje (Moore i sur., 2012.).

Cilj ovog istraživanja je utvrditi učestalost pojave patvorenja vegetarijanskih proizvoda na hrvatskom tržištu.

2. PREGLED LITERATURE

PCR (eng. Polymerase Chain Reaction) ili metoda lančane reakcije polimerazom za umnožavanje molekula *in vitro* predstavlja značajan tehnički napredak u istraživanju na području molekularne biologije. Ovom metodom omogućuje se neograničeno dobivanje fragmenata DNA ukoliko je poznat slijed nukleotida tražene molekule. Osnova metode je uzastopno umnažanje određenog segmenta DNA uz pomoć enzima DNA-polimeraze, gdje njezinom uporabom broj molekula DNA postaje dvostruko veći i dalje se povećava eksponencijalno. Primjenom oligonukleotidnih početnica, odnosno kratkih DNA sekvenci (20-30 nukleotida), vrši se selekcija specifičnog dijela DNA molekule, a za primjenu metode koriste se dvije početnice koje će započeti sintezu u suprotnim smjerovima na dva komplementarna lanca DNA. Reakcija započinje kada vodikove veze koje održavaju dvolančanu strukturu molekule pucaju na temperaturi od 95˚C kako bi se razdvojila dva DNA lanca. Temperatura se tada snižava kako bi početnicama omogućilo specifično povezivanje s komplementarnim sljedovima na lancima DNA kalupa. DNA polimeraza tada sintetizira lanac DNA komplementaran kalupu počevši od specifično povezanih početnica. Ovisno od svrhe reakcije, veličine umnožavanog dijela DNA i željene koncentracije, tipična PCR reakcija se odvija u 30–40 ciklusa, a u svakom ciklusu broj molekula DNA se udvostručuje. Od svih metoda temeljenih na analizi DNA, PCR je dosada najrazvijenija molekularna tehnika koja predstavlja jednostavan, brz, vrlo osjetljiv i specifičan alat za otkrivanje sastojaka životinjskog podrijetla u hrani. Metode za analizu DNA zasnovane su na specifičnoj amplifikaciji jednog ili više DNA fragmenata koristeći PCR i kvantitativni (q; od eng. quantitative) PCR. Metode za otkrivanje životinjskog podrijetla u hrani temeljene na PCR-u su: polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (eng. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)), polimorfizam dužine amplificiranih fragmenata (eng. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)), sekvenciranje, nasumična amplifikacija polimofrne DNA (eng. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)) i PCR temeljen na specifičnim početnicama (eng. species-specific PCR).

2.1. KVANTITATIVNI PCR (qPCR)

Kvantitativni PCR ili PCR u „realnom vremenu“ primjenjuje se za umnožavanje i simultanu detekciju ciljane molekule DNA, a postupak se temelji na općem principu polimerazne lančane reakcije. Karakteristika im je da se umnožena DNA otkriva kako reakcija napreduje u "realnom vremenu", u odnosu na standardni PCR. Kvantitativni PCR omogućuje otkrivanje tragova različitih životinjskih vrsta u proizvodima složenog sastava u istoj minuti, a smatra se jednim od najperspektivnijih molekularnih alata za autentifikaciju mesa (Koppel i sur., 2009.). Ova metoda se odnosi na proces u kojem se izravno prati umnažanje proizvoda tijekom svakog ciklusa amplifikacije te se može izmjeriti PCR reakcija dok je još u eksperimentalnoj fazi i nijedan od reakcijskih sastojaka nije ograničen. Uobičajene metode za otkrivanje DNA pomoću kvantitativnog PCR-a su:

- nespecifične, gdje se fluorescentna boja umetne u bilo koji polulanac DNA i,
- sekvencno-specifične DNA sonde koje su sastavljene od oligonukleotida, označenih fluorescentim reporterom koji dopušta detekciju tek nakon hibridizacije sonde sa svojom komplementarnom sekvencom.

Postoje razne fluorescencije na kemijskoj bazi prilagođene za kvantitativni PCR, a mogu se svrstati u četiri vrste: hidrolizne probe, (primjerice TaqMan® kemija), zatim tzv. ukosnica probe poput molekularnih svjetionika, fluorescentno obilježene hibridizacijske sonde i DNA interkalirajuće boje. Najjednostavniji i najjeftiniji fluorescentni sustav prilagođen za otkrivanje u realnom vremenu uključuje interkalaciju SYBR Green I boje, čija se fluorescencija pod UV lampom znatno povećava (Lopez-Andreo i sur., 2006.; Sawyer i sur., 2003.).

Za detekciju i kvantifikaciju DNA u animalnim proizvodima najčešće se koriste eseji temeljeni na TaqMan® kemiji. Tako su Zhang i sur. (2007.) razvili esej temeljen na TaqMan® kemiji za identifikaciju goveđe DNA u mesu, mlijeku i siru. Autori su utvrdili da navedeni esej može kvantitativno detektirati čak i količinu od 35 pg goveđe DNA te da ne pokazuje krosreakciju s ovčijom, kozjom ili svinjskom DNA. Istom tehnologiom Kesmen i sur. (2009.) su dizajnirali specifični esej na mitohondrijskim ND2, ND5 i ATP6-8 genima za identifikaciju DNA u magarca, svinje i konja. Esej omogućava detekciju i do 0,0001 ng DNA u sirovom mesu.

Camma i sur. (2012.) dizajnirali su TaqMan® esej sa specifičnim početnicama i probama na 16S rRNA i CTb genima za identifikaciju purećeg, goveđeg, svinjskog i ovčjeg mesa u binarnim svježim smjesama. Limit detekcije iznosio je 0,02 do 0,80 pg DNA.

Slično principima TayMan® kemije, djeluju i eseji koji se baziraju na probama s formom ukosnice. Tako su Yuzop i sur. (2012.) razvili esej baziran na probama s formom ukosnice za detekciju i kvantifikaciju svinjske DNA na CYTb genu. Metodom je moguće otkriti dodatke 0,1% svinjetine u binarnoj mješavini.

Valja međutim naglasiti da su eseji zasnovani na TaqMan® kemiji, iako visoko specifični, vrlo složeni za dizajn što ih čini i vrlo skupim, zbog čega se sve češće pribjegava dizajnu eseja baziranim na interkaliranju fluoroscentnih boja poput Sybre Green I ili Eva Green. No, do danas takvih eseja ima vrlo malo. Primjerice, Martin i sur. (2009.) su dizajnirali Sybre Green I esej za detekciju i kvantifikaciju svinjske DNA u sirovim i toplinski obrađenim binarnim mješšavinama svinjskog mesa i biljnog matriksa. Utvrđena osjetljivost eseja iznosila je 1%. Slično tome, Soarez i sur. (2013.) dizajnirali su Sybre Green I esej za detekciju DNA u pilećim kobasicama, te je osjetljivost eseja iznosila 1%. Safdar i Abasiyanik (2013.) navode pak da je Eva Green boja specifičnija i ekonomičnija od Sybre Green I te su isti autori razvili Eva Green Multiplex PCR (EMPRT-PCR) esej za simultanu identifikaciju sojine i govođe DNA u kobasicama.

2.2. PCR-RFLP

PCR- RFLP tj. PCR temeljen na polimorfizmu različite duljine restrikcijskih fragmenata je metoda koja ima poseban značaj primjene u identifikaciji vrsta u mesu i mesnim proizvodima. Tehnika se temelji na varijaciji sekvenci unutar definirane DNA regije. U RFLP DNA uzorak se cijepa (digestira) na komade pomoću restrikcijskih enzima, a restrikcijski fragmenti se potom razdvajaju elektroforezom u agaroznom gelu u skladu sa njihovim dužinama. Većina istraživanja autentifikacije životinjskih vrsta u prehrambenim proizvodima temelje se na mitohondrijskim markerima kao što su citokrom b (cyt b) i 12S rRNA gena. Haider i sur. (2012.) proveli su istraživanje uz korištenje mitohondrijskog COI gena gdje je identificirano podrijetlo vrste u sirovom goveđem mesu, ovčjem mesu, mesu deve, puri i magarca. Autori navode da rezultati istraživanja dokazuju kako se meso navedenih vrsta može kvalitativno identificirati i razlikovati primjenjujući ovu metodu. Nadalje, autori ističu slijedeće prednosti predložene metode: ne zahtjeva se primjena skupih

nukleotidnih sekvenci, kao ni specifičnih početnica, fluorescentnog obilježavanja početnica, te primjena više od jednog restrikcijskog enzima. Metoda je znatno jeftinija, a sam postupak traje manje od 4 sata. U sličnom istraživanju Ong i sur. (2007.) koristili su tehniku PCR-RFLP uz korištenje mitohondrijskog markera citokroma b te su identificirane tri vrste mesa (svinjetina, piletina, govedina). U rezultatima istraživanja ova metoda pokazala se kao vrlo pouzdana u detekciji prisutnosti vrlo malih količina ciljne DNA, dobivene od 0,25 mg smjese pomiješanih navedenih vrsta mesa, te takva može primjenjivati u provjeri autentičnosti i identifikaciji različitih vrsta mesa.

2.3. PCR-AFLP

AFLP tehnika se sastoji od oblikovanja i sintetiziranja proizvoljnih početnica koji se dalje ligiraju na fragmente ciljane DNA. Pripremljene početnice nazivaju se „adapteri“ te se sastoje od poznate sekvence veličine 20 nukleotida. Ciljane DNA sekvence su fragmenti genomske DNA koji su stvoreni kombiniranom uporabom dvaju restrikcijskih enzima. Adapteri se ligiraju na svaki kraj restrikcijskog fragmenta pomoću protein ligaze i koriste se kao početna mjesta za umnažanje restrikcijskog fragmenta u lančanoj reakciji polimerazom. AFLP markeri otkrivaju polimorfizam restrikcijskog mjesta, a veliki broj fragmenata omogućuje procjenu varijacije preko cijelog genoma. Ova metoda tehnički je vrlo zahtjevna, iziskuje duži rad, a prikaz rezultata traži dodatnu automatsku računalnu analizu (Pereira i sur.,2008.), zbog čega se danas koristi iznimno rijetko za specitaciju u prehrambenim proizvodima.

2.4. SEKVENCIRANJE

Sekvenciranje umnoženih fragmenata rezultira dobivanje velike količine podataka bez uporabe enzima ili post analize. Jedna traka umnoženih uzoraka životinja širokog raspona može se dobiti pomoću univerzalnog para početnica (Fajrdo i sur., 2010.). U metodi sekvenciranja koriste se mitohondrijski markeri, citokrom b, 12 S i 16 S rRNA upravo zbog adekvatne razine mutacija navedenih markera i dostupnosti sekvenci istih u postojećim bazama podataka. Prednosti ove metode dovele su do kreiranja specifičnih i integriranih alata u identifikaciji vrsta. Dvije najznačajnije metode DNA sekvenciranja su Sangerova metoda i Maxam-Gilbertova metoda.

Sangerova metoda temelji se na mogućnosti razdvajanja jednolančanih DNA molekula koje se razlikuju u jednom nukleotidu pomoću gel elektroforeze, dok Maxam-Gilbertova metoda sekvenciranja koristi kemikalije za cijepanje DNA molekule na određenim mjestima, što generira niz fragmenata koji se razlikuju za jedan nukleotid.
Kitano i sur. (2007.) primjenili su metodu sekvenciranja za identifikaciju velikog broja kralježnjaka (sisavaca, ptica, gmazova, vodozemaca i riba). Slično tome, Karlsson i i sur. (2007.) identificirali su ukupno 28 različitih sisavaca. Obje studije bazirane su na temelju sačuvanih područja korištenjem početnica dizajniranih kako bi povećale male fragmente (od 100 do 244 bp) na mitohondriju 12S i 16S rRNA gena.

2.5. PCR-RAPD

Nasumična amplifikacija polimorfne DNA (od eng. Random Amplification of Polymorphic DNA- RAPD) je metoda koja se sastoji od umnažanja DNA fragmenata uz uporabu kratkih, proizvoljnih početnica sa 8-12 nukleotida te odvajanju umnoženih fragmenata na temelju njihove veličine pomoću gel elektroforeze. Za umnožavanje potrebna je samo jedna početnica i nije potrebno poznavanje DNA sekvenci ciljanog genoma budući da će se početnica vezati negdje u njihovom nizu. U području analize hrane, ova metoda uspješno se koristi u identifikaciji mesa, ribe i povrća (Fajadro i sur., 2010.). U istraživanju Ahmed (2005.) ispitivane su različite vrste mesa (goveda, koze, bika i ovce) u svrhu njihove identifikacije u uzorku. Usporedbom navedenih vrsta (fingerprint tehnikom i genetskoj sličnosti) dokazana je visoka genetska sličnost između ovce i koze, te niska genetska sličnost koze i goveda. Metoda se pokazala primjenjivom u otkrivanju genetskih varijacija različitih vrsta te u identifikaciji vrste mesa različitog podrijetla.

2.6. PCR TEMELJEN NA POČETNICAMA SPECIFIČNIM ZA VRSTU

Korištenjem posebno dizajniranih oligonukleotida uz točno određene i restriktivne uvjete PCR-a omogućena je izravna identifikacija specifičnih definiranih fragmenata DNA. Pomoću specifičnih početnica, ciljana sekvenca može biti vrlo osjetljivo umnožena iz uzoraka hrane. Ova metoda može se primijeniti u analizi velikog broja uzoraka hrane, a posebnu važnost ima primjena kod termički obrađene hrane gdje je sama DNA dosta oštećena. Glavni nedostatak je potreba za točnim podacima o ciljnoj sekvenci, što znači da prije samog istraživanja treba sumnjati na određenu vrstu u uzorku hrane kako bi se

dizajnirala odgovarajuća specifična početnica. Združeni (multipleks) PCR može se koristiti ukoliko nisu zadovoljeni uvjeti za prethodnu metodu jer se u ovoj tehnici koristi više početnica zajedno kako bi se umnožilo više od jednog ciljanog područja.

2.6.1. *Združeni PCR*

Združeni PCR odnosi se na upotrebu lančane reakcije polimeraze za utvrđivanje nekoliko različitih sljedova DNA istovremeno. Ovaj proces umnožava DNA u uzorcima pomoću više početnica i temperaturno posredovane DNA polimeraze u termalnom uređaju. Glavni pak nedostatak ove tehnike je razlika u duljini umnoženih fragmenata, koja za adekvatnu rezoluciju DNA traka treba iznositi 40-50 bp. Također, jedan od ograničavajućih čimbenika ove tehnike u identifikaciji različitih vrsta životinja je njezina uporaba u proizvodima čija priprema zahtijeva visoku temperaturu. Naime, povećanjem topline dolazi do defragmentacije DNA, zbog čega se smanjuje broj vrsta koji se može simultano identificirati. Danas se združeni PCR koristi vrlo često u identifikaciji vrsta u mlijeku i mliječnim proizvodima jer se za proizvodnju mliječnih proizvoda koristi zapravo samo nekoliko vrsta životinja. Tako su primjerice Bottero i sur. (2003.) razvili združeni PCR protokol za identifikaciju kravljeg, kozjeg i ovčjeg mlijeka u mliječnim proizvodima. U ovu svrhu autori su dizajnirali specifične početnice na genima 12s i 16sRNA te su utvrdili da je ovom metodom moguće identificirati koncentracije od minimalno 0,5% DNA navedenih vrsta.
Slično tome, Ghovatti i sur. (2009.), koristili su iste gene za identifikaciju goveđeg, svinjskog i pilećeg mesa u kobasicama te mljevenom i svježem mesu.

3. MATERIJALI I METODE

Za DNA analizu korišteno je 17 vegetarijanskih proizvoda različitih proizvođača kupljenih u trgovinama zdrave hrane i/ili supermarketima na području Republike Hrvatske. Proizvodi su birani na način da u je njihovoj deklaraciji vidljivo da li sadrže mlijeko/jaja, odnosno tragove animalne DNA, a sastav istraživanih proizvoda vidljiv je u tablici 1.

Tablica 1. Glavni sastojci istraživanih uzoraka.

Šifra uzorka	**Naziv proizvoda**	**Glavni sastojci**	**Proizvod može sadržavati mlijeko/jaja**
1	Namaz od soje	Tofu, biljno ulje, začinsko bilje.	Ne
2	Soja hamburger s povrćem	Tofu, riža, povrće, biljno ulje.	Ne
3	Vegetarijanski hamburger	Voda, soja, povrće	Ne
4	Vegetarijanska kobasica	Seitan, tofu, biljno ulje, začinsko bilje.	Ne
5	Sojin odrezak	Voda, tofu, začinsko bilje.	Ne
6	Tofu mini kobasica	Tofu, voda, bilje, biljno ulje.	Ne
7	Vegetarijanski narezak	Voda, suncokretovo ulje, soja, bjelanjak jajeta, biljni začini, arome.	Da
8	Namaz s maslinama	Voda, masline, biljno ulje, začini.	Ne
9	Pašteta od graha	Grah, biljno ulje, voda, zgušnjivač.	Ne
10	Vegetarijanska šnicla	Tofu, pšenične krušne mrvice, morska sol, začini.	Ne
11	Vegetarijanski bolonjez, ljuti	Voda, soja, rajčica, sol, luk .	Ne
12	Biljna pašteta	Kvasac, voda, biljno ulje, umak od rajčice.	Ne

13	Tofu namaz,biljni	Voda, tofu, krumpir, biljno ulje.	Ne
14.	Vegetarijanski namaz od povrća	Povrće, biljno ulje, voda, začini.	Ne
15.	Vegetarijanske hrenovke	Pšenični gluten, biljno ulje, morska sol, začini.	Ne
16.	Vegetarijanska kobasica	Seitan, začini, paprika.	Ne
17.	Namaz od slanutka	Voda, slanutak, sezam, biljno ulje, začini.	Da

3.1. DNA analiza

3.1.1. Izolacija DNA

DNA je iz istraživanih uzoraka izolirana uporabom DNeasy mericon Food Kita (Qiagen, Njemačka) prema uputama proizvođača kako slijedi:

1. U tubicu od 50 ml u kojoj se nalazi 2,5 g uzorka pipetom se dodaje 10 ml Food Lysis Buffera i 25 µl Proteinaze K. Zatim se kratko promiješa pomoću vortex mješalice kako bi se uzorak dobro raspodijelio i namočio.

2. Uzorci se stavljaju na inkubaciju 30 min pri 60°C s neprekidnim miješanjem. Kako bi se poboljšalo taloženje, potrebno je ohladiti uzorak na sobnoj temperaturi (15- 25 °C).

3. Uzorci se stavljaju 5 minuta na centrifugu na 2500 x g. Postupak se može ponoviti ukoliko se talog i tekućina nisu dobro odvojili.

4. U digestoru se pipetira 500 µl kloroforma u mikro tubice za centrifugu od 2 ml.

5. Pažljivo se pipetira 700 µl izdvojene tekućine iz koraka 3 u mikro tubice koje sadrže kloroform.

6. Mikro tubice iz koraka 5 potrebno je snažno promućkati 15 sekundi na vorteks mješalici, a nakon toga se centrifugiraju na 14,000 x g 15 min.

7. Pipetom se dodaje 350 µl Pufera PB u novu mikro tubicu od 2 ml, a zatim pipetira 350 µl gornjeg sloja, vodene faze iz koraka 6 i dobro se promućka na vorteksu.

8. Pipetira se otopina iz koraka 7 u QIAquick membranu koja je umetnuta u sabirnu tubu (2 ml). Centrifugira se na 17,900 x g 1 min, a zatim se filtrirana frakcija (koja je prošla kroz membranu) iz donjeg dijela tubice istače te ponovo iskorištava sabirna tuba u koraku 9.

9. Dodaje se 500 µl Pufera AW2 u QIAquick spin column, centrifugira na 17,900 x g 1 min, te se opet pipetira filtrirana frakcija. Nakon toga sabirnu tubu centrifugiramo na 17,900 x g 1 min kako bi se osušila membrana.

10. QIAquick spin column prebacuje se u mikro tubicu od 2 ml i pipetira 150 µl Pufera EB direktno na QIAquick membranu. Stavlja se na inkubaciju 1 min na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugira na 17,900 x g 1 min kako bi se otopila DNA koja se nalazi na membrani.

Nakon izolacije, koncentracija i kvaliteta dobivene DNA provjerena je UV/VIS spektrofotometrom Nanophotometer® (IMPLEN GmbH, Germany).

3.1.2. Lančana reakcija polimerazom

Za utvrđivanje specifičnog odsječka citokrom b gena karakterističnog za DNA kralješnjaka te *rbcL* regije u biljaka (Hollingsworth i sur., 2011.) korišten je Biofood Standard kit (Biotools, Španjolska). Biofood kit omogućava otkrivanje i identifikaciju životinjskih vrsta u hrani i uzorcima hrane, a metoda otkrivanja bazirana je na umnažanju nukleinske kiseline združenim PCR-om.

Lančana reakcija polimerazom provedena je prema specifikaciji proizvođača kako slijedi:

1. DNA se koristi iz svježih ili obrađenih uzoraka; potrebna koncentracija DNA iznosi 50-100 ng / µl, A260/280=1.8 – 2.0 uz izostanak PCR inhibitora.
2. Za početak se priprema reakcijska mješavina zajednička za sve uzorke koja se prethodno izračunala prikazana u Tablici 2.

Tablica 2. Izračun reakcijske mješavine.

Reagens	**µl/rxn**
Master Mix	15 µl
$MgCl_2$	2 µl
DNA Polimeraza	1,25 µl
Bidistilirana voda	26,75 µl

rxn= broj uzoraka

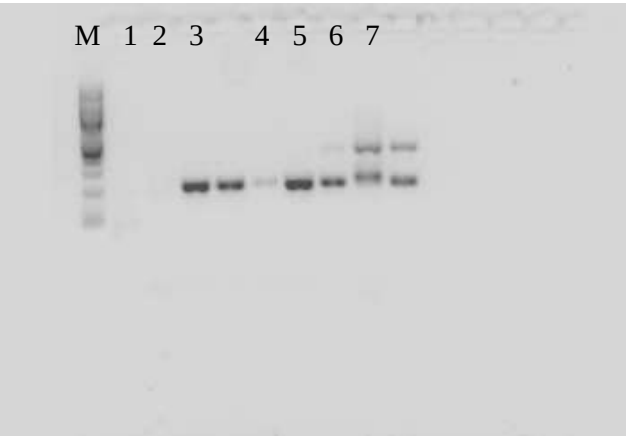
3. Pipetom se uzima 45 µl reakcijske mješavine i u svaku tubicu veličine 0,2µL pipetira zasebno, ovisno o broju istraživanih uzoraka, te se dodaje 5 µl prethodno izolirane DNA. Ovaj proces izvodi se u laminarnoj komori gdje reakcijska mješavina mora biti na ledu.
4. PCR se potom izvodi u uređaju za PCR (Eppendorf Mastercycler Gradient; Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka) prema slijedećem programu:

94 °C	90 sec	
94 °C	10 sec	40 ciklusa
55 °C	90 sec	
72 °C	40 sec	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

5. Dobiveni PCR produkti pomiješaju se sa Bromofenol plavim bojilom te se podvrgnu horizontalnoj elektroforezi na 1,75%-tnom 0,5xTBE agaroznom gelu obojenim s GelRed^{TM} Dropper (Olerup SSP AB, Sweden) bojom u trajanju od 60 min na struji jakosti 60mV.
6. Dobiveni signali se fotografiraju pomoću JY02G Fast Gel Imaging System (Beijing JUNYI DONGFANG Electrophoresis Co., Ltd., China).

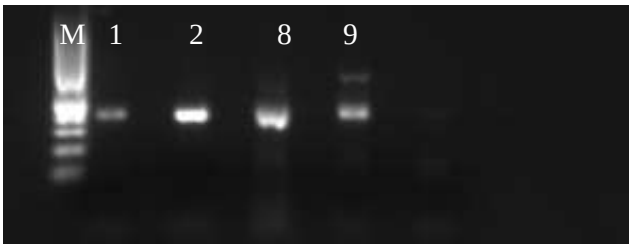
4. REZULTATI I RASPRAVA

Na slikama 1-5 prikazani su rezultati lančane reakcije polimerazom za 17 istraživanih vegetarijanskih uzoraka. Kao što se iz slika može vidjeti tragovi animalne DNA (fragment veličine 359 bp) utvrđen je za uzorke broj 6,7, 9 i 17, međutim samo u proizvodima broj 7 i 17 uistinu je i specificirano da sadrže ili mogu sadržavati animalnu DNA u obliku mlijeka ili jaja. Ovo upućuje na visoki stupanj patvorenja proizvoda dostupnih na tržištu Republike Hrvatske. Slično rezultatima ovog istraživanja, u svibnju 2016. Clear Labs laboratorij iz SAD objavio je rezultate istraživanja o prisutnosti životinjske DNA u vegetarijanskim hamburgerima. U njihovo istraživanje bilo je uključeno 258 uzoraka mljevenih proizvoda (paštete, hamburgeri) kupljenih u 22 trgovačka lanca, a cilj istraživanja bio je utvrditi trendove vezane za sigurnost proizvoda uporabom RNA seq tehnologije. Rezultati su pokazali posebno jake nepravilnosti u vegetarijanskim hamburgerima, gdje su u 14 uzoraka bili izostavljeni pojedini sastojci, a u 2 uzorka je utvrđena goveđa DNA, iako na deklaraciji nije pisalo da proizvod može sadržavati mlijeko i/ili jaja. Nadalje, isti je laboratorij objavio rezultate istraživanja veganskih hot-dog hrenovki, gdje su u 10 uzoraka našli kokošju DNA, u 4 uzorka goveđu DNA, u 3 uzorka pureću DNA i u 2 uzorka janjeću DNA. Nadahnuti rezultatima izvještaja Clear labs laboratorija, Khay i sur. (2015.) su istražili pojavnost animalne DNA u veganskim paštetama kupljenim u različitim trgovačkim lancima na području New Yorka. Suprotno izvještaju Clear Labs-a, autori nisu utvrdili animalnu DNA niti u jednom od ispitivanih uzoraka.



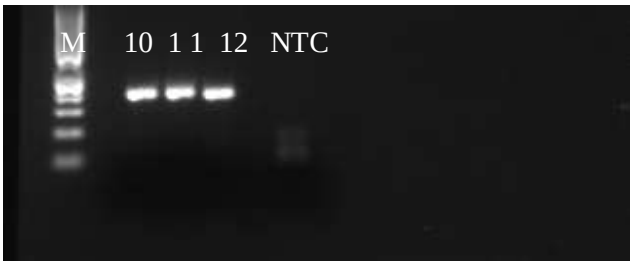
Slika 1. PCR produkti dobiveni iz uzoraka 1-7.

M=DNA marker 50 bp



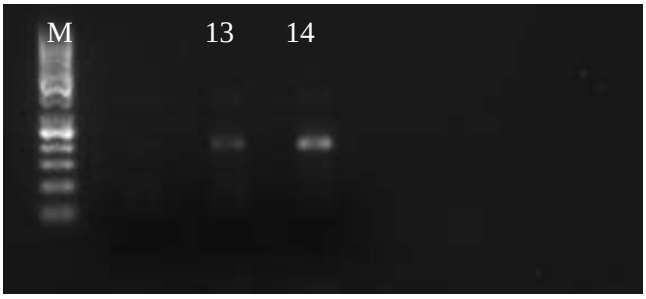
Slika 2. PCR produkti dobiveni iz uzoraka 1, 2, 8 i 9.

M=DNA marker 50 bp



Slika 3. PCR produkti dobiveni iz uzoraka 10, 11 i 12.

M=DNA marker 50 bp; NTC = slijepa proba bez DNA



Slika 4. PCR produkti dobiveni iz uzoraka 13 i 14.

M=DNA marker 50 bp



.

Slika 5. PCR produkti dobiveni iz uzoraka 15, 16 i 17.

M=DNA marker 50 bp

5. ZAKLJUČAK

Istraživanje je uspješno provedeno zahvaljujući vrlo dobroj osjetljivosti upotrebljenog kita. Rezultati su pokazali da se u dva proizvoda od ukupno 17 nalazi animalna DNA iako ona nije deklarirana na proizvodu. Valja naglasiti da je istraživanje provedeno na malom broju uzoraka te se preporuča analiza na većem broju uzoraka.

6. LITERATURA

Ahmed, M.M.M. (2005): Species identification in meat origin farm animals trough DNA tehnology. Biotechnology in Animal Husbandry 21 (1-2):13-24.

Bottero, M. T., Civera, T., Nucera, D., Rosati, S., Sacchi, P., Turi, R. M. (2003): A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheep's milk in dairy products. International Dairy Journal, 13(4): 277-282.

Cammà, C., Di Domenico, M., Monaco, F. (2012): Development and validation of fast Real-Time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures. Food Control, 23(2): 400-404.

Clear Labs: The hamburger report, May, 2016 https://www.clearlabs.com/reports/the-hamburger-report (preuzeto 26.09.2016.)

Daily mail (2015): HUMAN DNA found in popular hot dog and sausage brands and 10% of vegetarian varieties contain meat http://www.dailymail.co.uk/news/article-3290094/Vegetarian-hot-dogs-sausages-contain-meat-human-DNA-new-study-finds.html (preuzeto 26.09.2016.)

Fajadro, V., Gonzalez, I., Rojas, M., Garcia, T., Martin R. (2010): A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. Trends in Food Science and Technology 21: 408-421.

Ghovvati, S., Nassiri, M. R., Mirhoseini, S. Z., Moussavi, A. H., Javadmanesh, A. (2009): Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. Food Control, 20(8): 696-699.

Haider, N.,Nanulsi I., Al-Safadi B. (2012): Identification of meat species by PCR-RFLP of the mitochondrial COI gene, Meat Science 90: 490-493.

Hollingsworth, P.M., Graham, S.W., Little, D.P. (2011): Choosing and Using a Plant DNA Barcode. PLoS ONE 6(5):e19254. doi:10.1371/journal.pone.0019254.

Karlsson, A.O., Holmlund, G. (2007): Identification of mammal species using species-specific DNA pyrosequencing. Forensic Science International 173: 16-20.

Kesmen, Z., Gulluce, A., Sahin, F., Yetim, H. (2009): Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. Meat Science, 82(4): 444-449.

Khay, A., Bhogal, C., Qiu, J. (2015): Are Vegan Patties 100% Meat Free? http://www.urbanbarcodeproject.org/files/uploads/0000/parlo-1135-poster-IEMS8.pdf (preuzeto 26.09.2016.).

Kitano, T., Umetsu, K., Tian, W., Osawa, M (2007): Two universal primer sets for species identification among vertebrates, International Journal of Legal Medicine 121(5): 423-7.

Knežević N., Rimac Brnčić S. (2014): Označavanje hranjive vrijednosti na deklaraciji prehrambenih proizvoda, Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam 6: 17-25.

Koppel, R.,Zimmerli F., Breitenmoser A. (2009): Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat, European Food Research and Technology, 230: 125–133.

López-Andreo, M., Garrido-Pertierra, A., Puyet, A. (2006): Evaluation of post-polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (21): 7973–7978.

Martín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Pegels, N., Hernández, P. E., ... & Martín, R. (2009). SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. Meat Science, 82(2), 252-259.

Moore, J.C., Spink, J., Lipp, M. (2012): Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. Journal of Food Science 77:118-26.

Ong, S.B., Zuraini, M.I., Jurin, W.G., Cheah, Y.K., Tunung, R., Chai, L.C., Haryani, Y., Ghazali, F.M. and Son, R. (2007): Meat Molecular Detection: Sensitivity of Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Lenght Polymorphism in Species Differentiation of Meat From Animal origin, ASEAN Food Journal 14: 51-59.

Pereira, F., Carneiro, J, Amorim, A. (2008): Identification of Species with DNA-Based Technology: Current Progress and Challenges, Recent Patents on DNA and Gene Sequences 2: 187-200.

Safdar, M., Abasıyanık, M. F. (2013). Development of fast multiplex real-time PCR assays based on EvaGreen fluorescence dye for identification of beef and soybean origins in processed sausages. Food research international, 54(2): 1652-1656.

Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout, S., McDowell, D. (2003): Real-time PCR for quantitative meat species testing, Food Control, 14 (8): 579–583.

Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P., Mafra, I. (2013). A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. Meat Science, 94(1): 115-120.

Yusop, M. H. M., Mustafa, S., Man, Y. B. C., Omar, A. R., Mokhtar, N. F. K. (2012): Detection of raw pork targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome B gene by molecular beacon probe real-time polymerase chain reaction. Food Analytical Methods, 5(3): 422-429.

Zhang, C. L., Fowler, M. R., Scott, N. W., Lawson, G., Slater, A. (2007): A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. Food control, 18(9): 1149-1158.

http://www.medri.uniri.hr/files/NASTAVA/PATOLOGIJA/NASTAVNO_GRADIVO/Molekularne_metode_u_patologiji.pdf

7. SAŽETAK

Istraživanje je provedeno na 17 uzoraka vegetarijanskih proizvoda sa ciljem utvrđivanja pojavnosti animalne DNA u vegetarijanskim proizvodima. DNA je iz proizvoda izolirana uporabom DNeasy Food Mericon kita, a odsječci gena karakteristični za animalnu i biljnu DNA dobiveni su multiplex PCR metodom uporabom Biofood Standard kita tvrtke Biotools. Rezultati istraživanja pokazali su da se u dva od ukupno 17 vegetarijanskih proizvoda nalazi animalna DNA iako ona nije deklarirana na proizvodu. Ovo upućuje na visoki stupanj patvorenja u prodaji vegetarijanskih proizvoda na području Republike Hrvatske te potrebu provođenja detaljnije studije u cilju utvrđivanja adulteracije proizvoda na našem području.

8. SUMMARY

The research was carried out on 17 samples of vegetarian products with the aim of determining incidence of animal DNA in vegetarian products. DNA was isolated from purchased products using DNeasy Food Mericon kit, while gene sequences characteristic for animal and plant DNA were obtained using multiplex PCR with Biofood Standard kit (Biotools). The results of the investigation showed that two of 17 vegetarian products contain animal DNA, eventhough it was not stated on the declaration of the product. This indicates high incidence of adulteration in Republic of Croatia and a need ofperforming a thorough investigation on this matter.

9. POPIS SLIKA

Slika 1. PCR produkti dobiveni iz uzoraka 1-7. 12
Slika 2. PCR produkti dobiveni iz uzoraka 1, 2, 8 i 9. 13
Slika 3. PCR produkti dobiveni iz uzoraka 10, 11 i 12. 13
Slika 4. PCR produkti dobiveni iz uzoraka 13 i 14. 13
Slika 5. PCR produkti dobiveni iz uzoraka 15, 16 i 17. 14

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Glavni sastojci istraživanih uzoraka. *8*
Tablica 2. Izračun reakcijske mješavine. *10*

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Završni rad

Pojavnost patvorenja vegetarijanskih proizvoda u Republici Hrvatskoj

The occurence of vegetarian products adulteration in Republic of Croatia

Davinija Kusik

Sažetak :

Istraživanje je provedeno na 17 uzoraka vegetarijanskih proizvoda sa ciljem utvrđivanja pojavnosti animalne DNA u vegetarijanskim proizvodima. DNA je iz proizvoda izolirana uporabom DNeasy Food Mericon kita (Qiagen, SAD), a odsječci gena karakteristični za animalnu i biljnu DNA dobiveni su multiplex PCR metodom uporabom Biofood Standard kita tvrtke Biotools. Rezultati istraživanja pokazali su da se u dva od ukupno 17 vegetarijanskih proizvoda nalazi animalna DNA iako ona nije deklarirana na proizvodu. Ovo upućuje na visoki stupanj patvorenja u prodaji vegetarijanskih proizvoda na području Republike Hrvatske te potrebu provođenja detaljnije studije u cilju utvrđivanja adulteracije proizvoda na našem području.

Ključne riječi: DNA, združeni PCR, vegetarijanski proizvodi, patvorenje

Summary:

The research was carried out on 17 samples of vegetarian products with the aim of determining incidence of animal DNA in vegetarian products. DNA was isolated from purchased products using DNeasy Food Mericon kit (Qiagen, USA), while gene sequences characteristic for animal and plant DNA were obtained using multiplex PCR with Biofood Standard kit (Biotools, Spain). The results of the investigation showed that two of 17 vegetarian products contain animal DNA, eventhough it was not stated on the declaration of the product. This indicates high incidence of adulteration in Republic of Croatia and a need of performing a thorough investigation on this matter.

Key words: DNA, multiplex PCR, vegetarian food, fraud