

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

ANTONETA SEGARIĆ

**UTVRĐIVANJE PATVORENJA MESNIH PROIZVODA
NEDEKLARIRANIM VRSTAMA MESA POMOĆU
POSTUPKA LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2016.

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Zavod za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane

Predstojnica:

izv. prof. dr. sc. Vesna Dobranić

Mentori:

izv. prof. dr. sc. Željka Cvrtila Fleck i doc. dr. sc. Gordan Mršić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof.dr.sc. Lidija Kozačinski
2. doc.dr.sc. Gordan Mršić
3. izv. prof. dr. sc. Željka Cvrtila Fleck
4. prof.dr.sc. Bela Njari, zamjena

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Željki Cvrtili Fleck na divnoj suradnji i podršci tijekom realizacije ovog rada, te svim djelatnicima Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem mentoru doc.dr.sc. Gordanu Mršiću, dipl. inž. na suradnji i mogućnosti izrade diplomskog rada u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“, te svim djelatnicima Centra, naročito Siniši Merkašu, dip. inž. koji mi je bio velika pomoć pri izradi praktičnog dijela rada.

Posebno zahvaljujem svojem dečku Dini Jadrežiću na strpljenju i podršci tijekom studiranja.

Osobito se zahvaljujem svojim roditeljima koji su mi omogućili studiranje i završetak fakulteta.

Zahvaljujem se svim prijateljima i kolegama koji su me također podržavali i pratili tijekom cijelog studiranja i bez kojih završetak fakulteta teško bi bio moguć.

POPIS PRILOGA

Slika 1. Princip lančane reakcije polimerazom

Slika 2. Izgled Micro – ouchterlony test pločice

Slika 3. Elektroforeza u agarozu - gelu

Slika 4. Očitavanje elektroforeze uzoraka iz prometa

Slika 5. Očitavanje elektroforeze uzoraka čistih „mesnih modela“ A, E i F

Slika 6. Očitavanje elektroforeze uzoraka „mesnih modela“

Tablica 1. Udio svinjskog i goveđeg mesa u uzorcima od A do E

Tablica 2. Udio svinjskog i pilećeg mesa u uzorcima od F do I

Tablica 3. Popis korištenih početnica specifičnih za vrstu

Tablica 4. Uvjeti PCR reakcije

Tablica 5. Udio DNK u uzorcima pljeskavica nakon PCR

Tablica 6. Udio DNK u uzorcima „mesnih modela“ nakon PCR

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Pregled dosadašnjih spoznaja	2
2.1. Vrijednosti i svojstva animalnih bjelančevina	2
2.2. Metode identifikacije vrste mesa	4
2.3. Određivanje vrsta mesa u cilju provjere ispravnosti deklaracija	8
3. Materijali i metode	14
3.1. Uzorci.....	14
3.2. Micro-ouchterlony test.....	15
3.3. Izolacija DNK	16
3.4. Provjera uspješnosti izolacije DNK (kvantifikacija)	17
3.5. PCR reakcija	17
3.6. Elektroforeza.....	19
4. Rezultati	20
4.1. Micro-ouchterlony test.....	20
4.2. Kvantifikacija DNK	20
4.3. Elektroforeza.....	21
5. Rasprava.....	24
6. Zaključak.....	27
7. Literatura.....	28
8. Sažetak	32
9. Summary	33
10. Životopis.....	34

1. Uvod

Autentičnost hrane (izvornost) podrazumijeva vjerodostojnost svih podataka istaknutih na oznakama hrane (deklaraciji) i to od naziva hrane, popisa sastojaka, neto količine punjenja ili podrijetla. Već samom upotrebom nekog važećim propisima definiranog naziva hrane proizvođač na sebe preuzima obavezu da taj proizvod udovoljava propisima za taj naziv. Odstupanja od ovakvih tvrdnji i navoda u deklaraciji smatraju se nesukladnostima s propisima o hrani koji se u slučaju dokazane namjere mogu smatrati prijevarom kojom se želi postići materijalna korist. Patvorenje hrane uključuje upotrebu sirovina ili sastojaka koji su niže kakvoće te posljedično i niže cijene koštanja, prodaju proizvoda pod lažnim nazivom odnosno upotrebu sastojaka koji imaju za cilj prikriti ukupnu lošu kvalitetu proizvoda. Poznato je da mesna industrija tijekom vremena nastoji pronaći najprikkladnije mogućnosti za uporabu osnovnih sirovina u proizvodnji mesnih proizvoda. Vrsta i količina sirovina definirana je za svaki mesni proizvod no valja imati na umu da sofisticirana tehnologija proizvodnje omogućuje proizvođačima korištenje većih količina sirovine slabije kakvoće. U tom smislu potrošači nisu u stanju senzorički ocijeniti kakvoću gotovog proizvoda, tim više što uporaba raznovrsnih dodatnih sastojaka pridonosi boljem vanjskom izgledu, ugodnom mirisu i okusu proizvoda, a proizvođaču omogućuje prikrivanje krivotvorenja. Nadalje, utvrđivanje patvorenja proizvoda od mesa s nedeklariranim vrstama mesa osim s ekonomskog vrlo je značajno i s religioznog stanovišta. Patvorenje hrane, na način da njezin sastav odstupa od standardnog koji se očekuje s obzirom na naziv hrane ili deklarirane vrijednosti može također imati negativne posljedice na zdravlje potrošača. Konzumiranje proizvoda koji sadrže nedeklarirane animalne ili biljne bjelančevine lako može uzrokovati i alergijske reakcije kod senzibiliziranih pojedinaca. Potreba za kontrolom kakvoće u tom području djelovanja znatno je porasla posljednjih nekoliko godina posebice liberalizacijom trgovine u Europskoj Uniji i porastom uvoza iz svih dijelova svijeta. Radi svega navedenog kupci moraju biti sigurni da su dobili upravo onaj proizvod koji su platili. U tom je smislu cilj ovog rada utvrđivanje prisustva nedeklariranih vrsta mesa u mesnim proizvodima.

2. Pregled dosadašnjih spoznaja

2.1. Vrijednosti i svojstva animalnih bjelančevina

Konsumacijom mesa i mesnih proizvoda prosječni čovjek u svoj organizam unese najveću količinu bjelančevina. Tijekom prošlog stoljeća na svjetskoj se razini najviše konzumirala govedina. Tako je 60-ih godina 20. stoljeća predstavljala udio od čak 40 % ukupne konzumacije u svijetu. No kako se mijenjaju trendovi, saznanja o koristima konzumacije pojedinih vrsta hrane nasuprot možebitnim štetnim utjecajima hrane konzumacija govedine početkom ovog stoljeća pada na samo 23 %. Danas se na globalnoj razini, najviše konzumira svinjetina djelomično zbog relativno niske cijene mesa i mesnih proizvoda, ali i zbog niskih troškova proizvodnje (IWOBI i sur., 2015.).

Meso je osnovna namirnica animalnog podrijetla te se dobiva klanjem različitih vrsta životinja, odnosno odstrelom ili klanjem divljači. U užem smislu meso predstavlja skeletno mišićje životinja za klanje i divljači s priležećim kostima, hrskavicama, masnim tkivom, limfnim žlijezdama, limfnim i krvnim žilama i živcima. S druge strane u širem smislu mesom smatramo i jestive dijelove trupa zaklane životinje (iznutrice, masno tkivo, krv). Obzirom da je meso u ljudskoj prehrani najvažniji izvor bjelančevina prema njegovoj proizvodnji i potrošnji vrednuje se razina razvijenosti naroda i država. Tim bjelančevinama se pripisuje stimulativno djelovanje, vrlo su vrijedne za život i u dovoljnoj količini i povoljnim omjerima sadrže sve aminokiseline potrebne za izgradnju bjelančevina u organizmu čovjeka (ŽIVKOVIĆ, 1986.). Osim bjelančevina meso je izvor omega-3 masnih kiselina, vitamina B12 i željeza (GRUJIĆ i sur., 2012.), sadrži minerale u dovoljnoj količini za zadovoljavanje dnevnih potreba organizma čovjeka, te je izvor fosfora, kalija, cinka što je bitno u prehrani djece.

O kakvoći mesa, u pogledu prehrambene vrijednosti, nam prvenstveno govori kemijski sastav koji uključuje količinu vode, masti, bjelančevina, ugljikohidrata, minerala i drugih tvari. Razlike u kemijskom sastavu pojedinih vrsta mesa nisu značajne i odnose se najviše na količinu masti. Međutim ipak te razlike postoje i ne odnose se samo na vrstu mesa, već i u odnosu na istu vrstu, ovisno o kategoriji, načinu držanja i hranidbe, stupnju ugojenosti, fiziološko stanje, anatomsku poziciju dijela trupa, te o drugim čimbenicima. Postmortalne promjene u velikoj mjeri mijenjaju svojstva i sastav svih animalnih tkiva pa tako i mišićja. U sarkoplazmi mišića odvija se vrlo intenzivna aktivnost enzima koji kataliziraju značajne biokemijske procese pretvorbe mišića u meso (autoliza, zrenje). Hidratacijska sposobnost mišićnih bjelančevina se smanjuje, doseže svoj minimum nekoliko dana nakon klanja, zatim se neznatno povećava i

tijekom daljnje pohrane mesa ostaje na razini oko 85% inicijalne vrijednosti. Također, paralelno s promjenama sposobnosti vezanja vode, mijenja se i konzistencija mesa (RAHELIĆ, 1978.; ŽIVKOVIĆ, 1986.; KULIER, 1996.).

U svrhu sprječavanja kvarenja i radi poboljšanja održivosti mesa potrebno ga je konzervirati. Jedan od načina konzerviranja jest toplinska obrada koja se vrlo često koristi, praktički svakodnevno, u industrijskoj preradi i kulinarskoj pripremi mesa. Glavni cilj toplinske obrade mesa je denaturacija bjelančevina, kojom meso postaje jestivije i probavljivo, postizanje odgovarajuće konzistencije i oblikovanje senzoričkih svojstava, te osiguranje potrebne održivosti i higijenske ispravnosti proizvoda (ŽIVKOVIĆ, 1986.; 2001.). Poznato je da temperatura od 50 do 55 °C izaziva razaranje native strukture bjelančevina topivih u vodi čime bjelančevine gube svoja biološka i fiziološka svojstva. Te promjene molekule nazivaju se denaturacija bjelančevina i uzrokuju vidljive promjene svojstava mesa, promjena boje, koagulaciju globulinske frakcije i izdvajanje mesnog soka zbog smanjene sposobnosti vezanja vode. Zagrijavanjem životinjskog tkiva na visokim temperaturama, u cilju uništavanja patogenih mikroorganizama, oštećuju se bjelančevine mesa, a može doći do značajnih kemijskih promjena koje rezultiraju nastankom amonijaka, ugljikovog dioksida i drugih spojeva od kojih neki sudjeluju u stvaranju okusa i mirisa. Također može doći do cijepanja peptidnih veza i nastanka dijelova proteinske molekule koja nema biološku funkciju (HOFMANN i sur., 1996.; LEE i sur., 1998.).

Bjelančevine su vrlo važna građevna jedinica živog organizma te su od primarnog značaja za rast i razvoj istog. Posljedično je i njihov unos u organizam vrlo bitan u smislu vrste i količine. Bjelančevine animalnog podrijetla su najbogatiji izvor bjelančevina u prehrani ljudi, a nalaze se prvenstveno u mesu, zatim mlijeku, jaja, siru, ribi i mesu divljači, dok su mahunarke i žitarice najbogatije bjelančevinama biljnog podrijetla. Stoga je važno konzumirati li bjelančevine životinjskog ili biljnog podrijetla, zbog različitosti njihovog aminokiselinskog sastava. Mnoge animalne bjelančevine približavaju se idealnim potrebama ljudskog organizma, dok većina biljnih proteina pokazuje neuravnotežen omjer i ima manju biološku vrijednost (KOVAČIĆ i SENTA, 1999.). Bjelančevine iz mesa, odnosno animalnog podrijetla, potrebne su za rast i sposobnost samoodržavanja i obnavljanja tijela. Utvrđeno je da crveno meso sadrži između 20 i 24 g bjelančevina u 100 g. Kuhanjem mesa se smanjuje količina vode pa tako kuhano crveno meso sadrži između 27 i 35 g bjelančevina u 100 g. Pravilo je što je meso suše, to je veći postotak bjelančevina (TORTI, 2007.). Različitim istraživanjima je utvrđeno da se potrebe ljudskog organizma za bjelančevinama kreću od 55 g dnevno za odraslog muškarca i 45 g za

žene, uz znatno veće potrebe kod nekih bolesti i pri stresu (KARADJOLE i HADŽIOSMANOVIĆ, 1999.).

2.2. Metode identifikacije vrste mesa

U literaturi je poznato i opisano nekoliko metoda za određivanje vrste mesa u proizvodima. Osim organoleptičkih i histoloških postupaka, koriste se kromatografske metode i imunološki testovi (HITCHCOCH i CRIMES, 1984.). Prvenstveno se koriste zbog činjenice da svaku vrstu mesa odlikuju svojstvene bjelančevine koje su vrlo različite od bjelančevina drugih vrsta.

Smatra se da je jedna od prvih metoda za određivanje vrste mesa u proizvodima bila reakcija precipitacije. U njoj sudjeluju topljivi antigen (precipitinogen) i protutijela (precipitini). U toj reakciji protutijela povezuju molekule topljivog antigena u veće komplekse trodimenzionalne strukture koji su nalik rešetkama. Reakcija se može očitati golim okom zbog taloženja kompleksa koji kad dosegnu određenu veličinu više nisu topivi (NAGLIĆ i HAJSIG, 1993.).

Osim imunoloških metoda moguće je koristiti i tekućinsku kromatografiju u svrhu određivanja vrste mesa (ASHOOR i sur., 1988.). Ova metoda je jednostavna, brza i pouzdana, a temelji se na razdvajanju topljivih proteinskih frakcija, te je moguće kvantitativno i kvalitativno određivanje. Njezin nedostatak je nemogućnost primjene na toplinski obrađenim uzorcima (BALLIN i sur. 2009.).

Kao što je već spomenuto za određivanje vrste mesa se koriste i imunološke reakcije koje mogu biti kvalitativne i kvantitativne. Za svaki imunološki postupak je bitno da je jedan od čimbenika reakcije poznat da bi se pomoću njega drugi mogao identificirati. Miješanjem pripravaka antigena i protutijela dobiva se reakcija koja može biti vidljiva golim okom. U slučaju da nije, treba ju učiniti vidljivom da bi se mogla očitati. Zbog tvari koje mogu dati „lažno negativan“ odnosno „lažno pozitivan“ rezultat uvijek je potrebno uključiti kontrolne uzorke. Oni moraju davati pozitivan (pozitivna kontrola) i negativan (negativna kontrola) rezultat (NAGLIĆ i HAJSIG, 1993.).

Imunoenzimni test ELISA (engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay) je vrlo osjetljiva metoda koja se temelji na činjenici da se topljivi antigeni ili protutijela mogu vezati za čvrstu podlogu, a da se ne mogu isprati puferiranom fiziološkom otopinom. Za izvođenje ove metode potrebne su polistirenske mikrotitracijske pločice koje najčešće imaju 96 (12 x 8) jažica, te antigen ili protutijelo označeni enzimom, najčešće peroksidazom. Postoji više različitih načina provođenja ELISA-e. Ona može biti izravna, neizravna i „sendvič“ ELISA. Imunološki testovi kao ELISA i EIA (engl. Enzyme Immunoassay) pogodni su za identifikaciju vrste mesa u proizvodima, ali testovi koji služe za identifikaciju sirovog mesa se ne mogu koristiti za

identifikaciju toplinski obrađenog mesa. Naime struktura antigena svojstvenih za vrstu tijekom toplinske obrade podliježe strukturnim promjenama (dolazi do razaranja strukture bjelančevina) i protutijelo ne prepoznaje antigen, pa se reakcija antigen-protutijelo ne može odvijati. S obzirom da nema dovoljno podataka o utjecaju visokih temperatura na svojstva bjelančevina mesa tako nije poznata ni najviša temperatura toplinske obrade nakon koje bi rezultati testa bili vjerodostojni (HOFMANN i sur., 1996.) za kitove kojima se određuje vrsta mesa u termički neobrađenim uzorcima. Vrste mesa u termički obrađenim uzorcima moguće je odrediti isključivo pomoću komercijalnih kitova za termički obrađene proizvode i nisu pogodni za određivanje vrste u sirovim uzorcima mesa.

Imunoelektroforeza je metoda koja je vrlo specifična i primjenjiva. Ona objedinjuje prednosti elektroforeze i imunodifuzije u gelu. Elektroforeza je fizikalno-kemijski postupak u kojoj u električnom polju istosmjerne struje dolazi do razdvajanja bjelančevina i lipoproteina prema razlikama u električnom naboju i pokretljivosti. Rezultati ovise o različitim čimbenicima kao što su starost životinje, stres prije klanja, uhranjenost, postmortalne promjene i ostali čimbenici koji predstavljaju nedostatak ove metode. Najznačajnije su postmortalne promjene koje se odvijaju u mišićima nakon klanja, odnosno količina pH mesa o kojem ovisi točnost metode. Nedostatak imunodifuzije u gelu je otežana identifikacija. Naime, između pripravaka s više različitih antigena i protutijela dolazi do stvaranja mnogo precipitacijskih linija što otežava identifikaciju, iz tog razloga se uvodi elektroforeza u reakciju (HOFMANN, 1985.). Različiti autori su koristili metodu elektroforeze za utvrđivanje vrste mesa u proizvodima. Tako je SENG-HOUR (1985.) zaključio da smrzavanje ne utječe na proces identifikacije, dok su VIZZANI i sur. (1985.) za razlikovanje mesa divljih svinja i svinja iz uzgoja zaključili da je identifikacija moguća samo u uzorcima sirovog mesa.

Danas su metode određivanja DNK sve više u uporabi prvenstveno zbog stabilnosti DNK na visokim temperaturama i očuvanosti njezine strukture (MANE i sur., 2009.).

Molekularna biologija je pedesetih i šezdesetih godina prošlog stoljeća doživjela svoj početak kada je prvi puta opisana struktura DNK 1953. godine. WATSON i CRICK su je definirali kao dvostruku uzvojnica, a kasnije su izolirane i DNK polimeraze, enzimi koji imaju jako široku primjenu u brojnim tehnikama molekularne biologije.

Godine 1986. američki znanstvenik KARY MULLIS je došao na ideju da bi se ponavljanjem procesa sinteze DNK pomoću dvije suprotno orijentirane oligonukleotidne sekvence (početnice) i enzima DNK polimeraze broj molekula DNK mogao umnožiti i do milijardu puta (ŽIVKOVIĆ, 2007.). Za izum metode lančana reakcija polimerazom 1993. godine dobio je Nobelovu nagradu na području kemije.

Lančana reakcija polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) je jedna od metoda za umnožavanje molekula DNK *in vitro* što omogućuje diferencijaciju i identifikaciju sojeva. Osnovni preduvjet za umnožavanje je poznavanje malog dijela njegovog nukleotidnog lanca što omogućuje sintezu kratkih jednolančanih komplementarnih oligonukleotidnih nizova. Za reakciju je potrebna DNK molekula s genom ili ciljnim nizom koji se želi umnožiti zatim reagensi i enzimi reakcije (DELIĆ, 1997.; WILLIAMS i sur., 1990.). Ova reakcija se temelji na izolaciji staničnog genoma, umnožavanju odsječaka DNK i očitavanju dobivenih produkata pomoću elektroforeze ili neke druge metode. PCR-om se može umnožiti i više od 100 milijardi molekula u vrlo kratkom vremenu samo pod uvjetom da se sve tri faze reakcije (denaturacija, umnožavanje i ekstenzija) periodički ponavljaju unutar određenog ciklusa određen broj puta. Klenow odsječak DNK polimeraze dobiven iz *E. coli* se u početku koristio u PCR reakciji. Međutim enzim bi se inaktivirao tijekom denaturacije lanca DNK i bilo je neophodno njegovo dodavanje u svakom novom ciklusu.

Kada se kao enzim uvela termostabilna DNK polimeraza (*Taq* polimeraza) izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus* PCR je postala automatizirana reakcija. Povećana je učinkovitost i specifičnost reakcije radi uporabe visokih temperatura. Omogućeno je umnožavanje dugih odsječaka (više od 10 kb), za razliku od Klenow-og enzima kojem se moglo umnožiti samo do 400 bp (MULLIS i sur., 1986.).

Za reakciju je potreban uzorak DNK molekule koji se želi umnožiti, početnice (engl. primeri) oligonukleotidnih nizova, DNK polimeraza, sva četiri deoksiribonukleotidtrifosfata (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) i pufer. DNK polimeraza ima sposobnost produživanja kratkih oligonukleotidnih početnica dodavanjem nukleotida na njihov 3'-OH kraj. Međutim početnica mora biti vezana na komplementarni lanac koji služi kao osnova reakcije. Djelovanjem DNK polimeraze nukleotidi se vezuju na odgovarajuća mjesta u kalupu. Sastojci se pomiješaju i podvrgavaju specifičnom temperaturnom ciklusu s brzim izmjenama (DELIĆ, 1997.).

Proces izvođenja PCR-a se sastoji od tri bitna koraka: 1. izolacija DNK i priprema PCR smjese za reakciju (engl. master mix); 2. PCR reakcija i 3. identifikacija PCR produkta (ŽIVKOVIĆ, 2007.).

Za izolaciju DNK postoji mnogo različitih metoda i tehnologija, a sve su prilagođene vrsti uzorka iz kojeg se DNK izolira. Te metode se temelje na jednom od sljedećih procesa: fizičko razaranje DNK, kemijska liza ili enzimatska liza, no u većini slučajeva se koristi kombinacija sva tri procesa. Postoji mnogo metoda za izolaciju DNK a neke od tih su: metoda izolacije fenolom i kloroformom (SAMBROOK i RUSSEL, 2001.), metoda izolacije isoljavanjem (MILLER i sur., 1988.), korištenje amonijevog acetata koji je zapravo modificirana metoda

isoljavanjem po MILLER i sur. (1988.). Danas se često za izolaciju DNK koriste komercijalni kitovi koji omogućuju izolaciju u kratkom periodu (nekoliko sati), a dobiveni produkti imaju visoki postotak čistoće.

Reakcijska smjesa (engl. master mix) sastoji se od:

1. Radne otopine DNK
2. Otopine početnica (dužina parova je najčešće 18 - 28 nukleotida)
3. Otopine nukleotida
4. Ioni magnezija (vezuju se za nukleotide koji se jedino u kompleksu s ionima magnezija mogu ugraditi u lanac DNK tijekom faze elongacije)
5. Taq polimeraze (obavlja ugradnju nukleotida u rastući lanac)
6. Pufera (održava odgovarajuću pH vrijednost).

Jedan ciklus PCR reakcije sastoji se od tri faze:

1. Faza denaturacije: prva faza PCR reakcije u kojoj dolazi do razdvajanja vodikovih veza između dva komplementarna lanca DNK. Odvija se 3 do 5 minuta na temperaturi 95 °C. U ovoj fazi je vrlo bitno u potpunosti razdvojiti lance DNK jer može doći do njihove renaturacije što smanjuje količinu novonastale DNK.
2. Faza umnožavanja (engl. annealing): faza u kojoj se snižuje temperatura (može varirati od 42 °C do 65 °C) u intervalu od 20 sekundi do 1 minute. Cilj ove faze je vezivanje početnica strogo specifičnih za 3'-OH kraj ciljnog fragmenta. Početnice pretražuju cijeli genom vezujući se za ciljnu sekvencu svojim 5'-OH krajem, te definiraju ciljni niz DNK i pomoću DNK polimeraze postaju njezin dio. Vrlo je bitno da početnice budu u suvišku u odnosu na uzorak DNK. Početnice su neophodne za početak aktivnosti *Taq* polimeraze i predstavljaju inicijalnu sekvencu za početak polimerizacije.
3. Faza ekstenzije: ova faza se odvija na 72 °C (70 - 80 °C) prvenstveno iz razloga što je to optimalna temperatura aktivnosti termostabilne *Taq* polimeraze te ugrađuje i više od 150 nukleotida u sekundi. *Taq* polimeraza u ovoj fazi, koristeći slobodne nukleotide iz smjese, sintetizira komplementaran lanac svakom lancu ciljne sekvence u 3'-OH-5'-OH smjeru. Kopira se samo DNK koji sadrži ciljne fragmente jer *Taq* polimeraza može kopirati samo one dijelove DNK koji sadrže hibridizirane početnice. Trajanje ove faze se kreće od 20 sekundi do 2 minute. Podizanjem temperature na 95 °C dolazi do prekida produljivanja početnica i započinje sljedeći ciklus.

Prethodno je opisan samo jedan ciklus PCR reakcije, a optimalan broj ciklusa se kreće od 25 do 30 ciklusa u kojima se sintetizira otprilike 3×10^5 molekula ciljne DNK. On ovisi o početnoj koncentraciji DNK molekule i ne bi trebao prelaziti više od 40 (ŽIVKOVIĆ, 2007.). U svakom novom ciklusu broj DNK molekula se udvostručuje i ciljni odsječak se nakuplja eksponencijalno za 2^n , gdje je n broj ciklusa. Nakon posljednjeg ciklusa temperatura se spušta na 70 °C u trajanju 5 do 10 minuta da bi se osigurao završetak produženja svih početnica. Ovim je završena PCR reakcija, a umnoženi fragmenti se mogu očitati elektroforezom u gelu, odnosno odvojiti od ostatka reakcijske smjese i izolirati iz gela (DELIĆ, 1997.; OLSEN, 2000.).

2.3. Određivanje vrsta mesa u cilju provjere ispravnosti deklaracija

Kroz povijest u mesnoj industriji poznati su primjeri krivotvorenja proizvoda neodgovarajućim ili manje vrijednim vrstama tkiva. Identifikacijom vrste tkiva u mesnim proizvodima moguće je spriječiti promet onih u čijem sastavu se nalaze nedeklarirane vrste tkiva. Utvrđivanje krivotvorenja proizvoda od mesa s nedeklariranim vrstama mesa značajno je zbog zaštite zdravlja potrošača, a i brojnih ekonomskih i socioloških razloga.

Sredinom 19. stoljeća jedna od najvećih prijetnji ljudskom zdravlju bila je prodaja pokvarenog i zaraženog mesa. Na tržnicama se prodavalo meso leševa, odnosno uginulih životinja, pa tako postoji podatak da je u Ujedinjenom Kraljevstvu u to vrijeme više od jedne petine govedine potjecalo od mesa uginulih životinja. Pojavom goveđe kuge sredinom 1860. godine pojačala se zakonska regulativa čime se smanjila prodaja zaraženog mesa, iako je zaraženo meso i dalje bilo glavni izvor zaraze i oboljenja ljudi. Postoje podaci o pojavi različitih epidemija na području Ujedinjenog Kraljevstva uzrokovanih trovanjem mesom (COLLINS, 1993.).

Iako je krajem 19. i početkom 20. stoljeća došlo do napretka mikrobiologije i razvoja analitičkih metoda, kvalitetu i sigurnost hrane bilo je teško odrediti jer se u velikoj mjeri određivala subjektivno (COLLINS, 1993.). Vjerodostojnost testiranja i analitičke metode su neizmjenjivo poboljšane do danas, pa tako postoji širok izbor tehnika i metoda koje omogućuju pristup svakom „problemu“ individualno (HARING, 1996.).

Podaci iz literature ukazuju na činjenicu da su se prijevare radnje događale već u 19. stoljeću iako prijave u smislu patvorenja tada nisu bile najveći problem jer se meso uglavnom prodavalo svježije i u vrlo prepoznatljivim dijelovima. Međutim postoje podaci da se teletina često izbjeljivala kredom (HARING, 1996.).

Proizvodnja i kakvoća hrane uvijek su pod povećalom potrošača, a proizvođači su svjesni činjenice da o prehrambenim navikama potrošača ovisi ponuda i način prezentacije proizvoda

na tržištu, te obim proizvodnje. Privući kupca moguće je ujednačenom kakvoćom, prepoznatljivim dizajnom i konkurentnom cijenom proizvoda. Na taj način mogu se stvoriti navike potrošača da kupuju određene proizvode. Svakako, naglasak treba biti na kvaliteti i sigurnosti proizvoda. Kroz povijest, kakvoća mesnih proizvoda bila je regulirana različitim pravilnicima koji su definirali mesne proizvode i minimalne zahtjeve u pogledu njihovog sirovinskog sastava i kemijskih parametara kakvoće. Uglavnom, kakvoća je različito definirana od strane proizvođača, prerađivača hrane i potrošača. Većina definicija se zasniva na površnom određivanju vrijednosti koje se koristi kao sinonim za kakvoću. Potrebno je koristiti prihvatljive i točne metode koje će poduprijeti senzoričku ocjenu kakvoće. U propisima koji su danas na snazi uglavnom nisu propisani jasni zahtjevi u smislu sirovinskog i kemijskog sastava koji se odnose na proizvode tako da se oni mogu proizvoditi i stavljati na tržište prema proizvođačkoj dokumentaciji uz uvjet da proizvod koji u svom nazivu nosi naziv kategorije ili skupine ili podskupine ili proizvoda kojem prema svojim osobinama pripada, mora udovoljiti minimalnim uvjetima koji su propisani za tu kategoriju ili skupinu ili podskupinu ili proizvod. U tom je smislu ostavljeno mnogo prostora za krivotvorenja proizvoda.

Patvorenje proizvoda od mesa nedeklariranim vrstama predstavlja zajednički problem mnogih država svijeta. Najčešće prijevare koje se događaju su zamjena skupe sirovine jeftinijim varijantama. Meso slične boje kao npr. govedina i konjetina, govedina i ovčetina, perad i svinjetina je nemoguće raspoznati vizualnim pregledom u smislu ocjene boje, pogotovo kada su zamrznuti u velikim blokovima ili usitnjeni u mesnim proizvodima. Otkrivanje takvih vrsta prijevara danas je postala glavna okupacija laboratorija hrane diljem svijeta (BARAI i sur. 1992.). S druge strane određivanje vrste mesa vrlo je važno u religijskom smislu (košer i halal meso), ali također i kod različitih stanja (trudnoća, alergije). Potrošači moraju biti sigurni da proizvod koji kupuju sadrži isključivo sastojke navedene na deklaraciji (HARING, 1996.).

Nedavno, u mnogo država Europe u hrani deklariranoj kao goveđe meso utvrđena je konjetina. U nekim se slučajevima čak radilo o proizvodima s 100 %-tnim udjelom konjskog mesa deklariranog kao govedina. Slično se dogodilo u Ujedinjenom Kraljevstvu gdje je svinjski DNK pronađen u Halal proizvodima iako su na deklaracijama imali oznaku Halal - certifikata. Islamske i židovske zajednice imaju religijske barijere u konzumaciji svinjetine, pa tako bilo kakvo odstupanje može rezultirati smanjenom konzumacijom tih proizvoda, ali i povredom religijskih normi. Ove nedavne prijevarne radnje ukazuju na značaj pravilnog deklariranja namirnica. Nadalje, alergija na hranu odnosno na svinjetinu, iako se rijetko javlja, mora biti glavni čimbenik za otkrivanje nedeklariranog svinjskog mesa u mesnim proizvodima (KARABASANAVAR i sur., 2014.). Također, osobito je bitna kontrola proizvoda koji sadrže

meso divljači. Ono se smatra delikatesom karakterističnog, intenzivnog okusa, sadrži nižu razinu masnoća i kolesterola, a visoku razinu nezasićenih masnih kiselina. Iz tih razloga meso divljači ima višu tržišnu cijenu, te mesni proizvodi koje ga sadrže mogu biti neispravno deklarirani u smislu količine, a u svrhu postizanja većeg profita (GOMERČIĆ i sur., 2015.).

Sve navedeno ističe važnost implementacije pouzdanih analitičkih metoda za otkrivanje točnih sastojaka mesnih proizvoda, ali i kvantifikaciju individualnih komponenti sirovina što je vrlo značajno za razlikovanje nenamjernih kontaminacija od namjernog patvorenja mesnih proizvoda koje je zakonski kažnjivo (IWOBI i sur., 2015.).

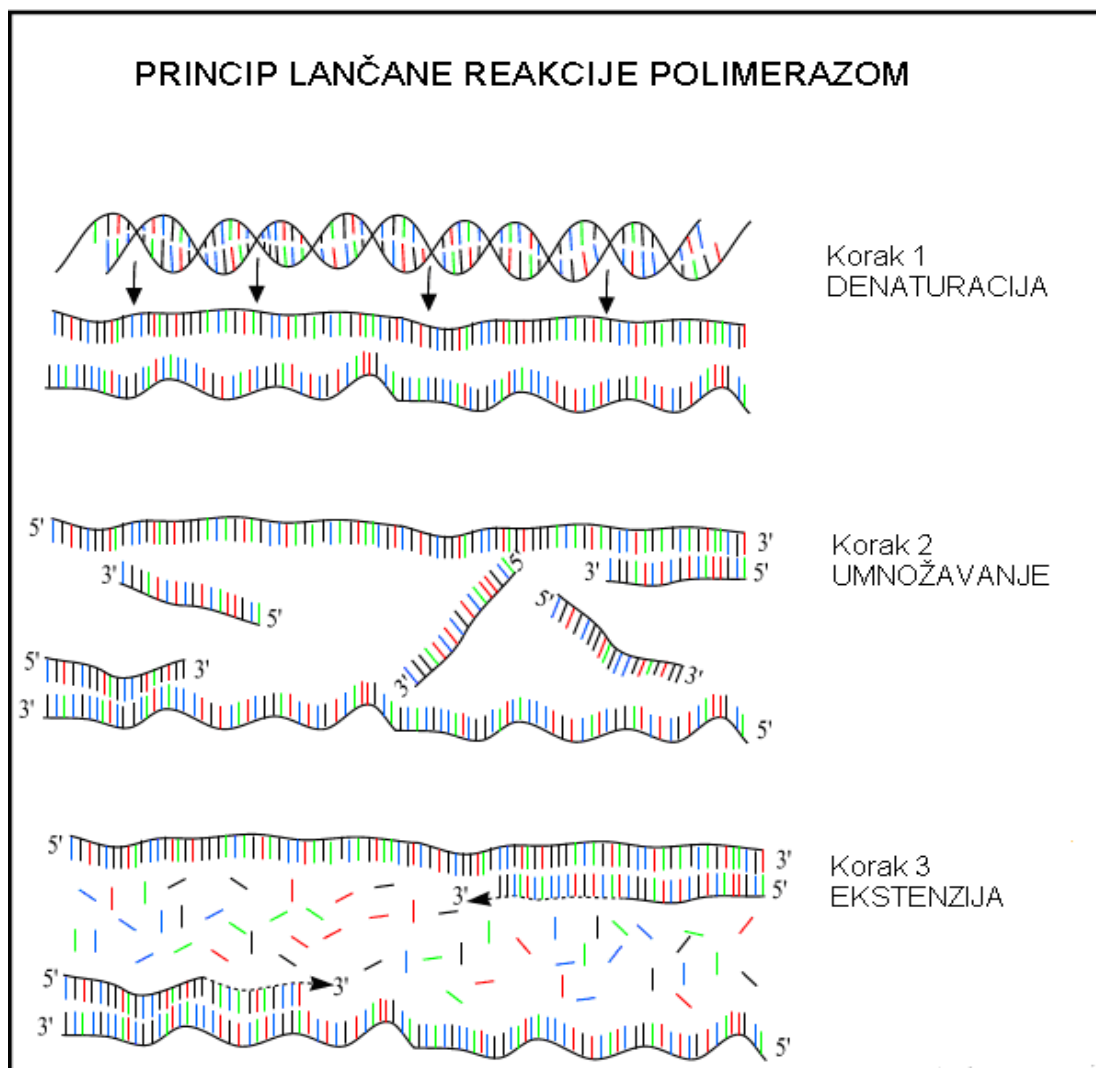
Metode za određivanje vrste mesa se razlikuju prema njihovoj specifičnosti i osjetljivosti. S druge strane limitirajući čimbenik za korištenje nekih metoda može biti tehnološka obrada proizvoda. Naime, određivanje podrijetla vrste mesa imunoenzimnim testom ELISA neće biti uspješno u mesu obrađenom na visokim temperaturama zbog denaturacije bjelančevina. Metoda lančane reakcije polimerazom se danas uspješno koristi za određivanje vrste bakterija, bilja i životinja. Posljednjih godina PCR je predložen kao jednostavna, osjetljiva i specifična metoda za određivanje podrijetla svježeg i obrađenog mesa. U istraživanjima je dokazano da PCR može detektirati 2 %-tnu količinu svinjetine u mesnim proizvodima nakon kuhanja na 121 °C kroz 10 min, dok ELISA može detektirati tek 50 %-tnu količinu u istom proizvodu (ARSLAN i sur., 2006.).

Iako je PCR preporučena metoda za određivanja vrste mesa u proizvodima, naročito u onima kuhanim na visokim temperaturama, nije točno poznat utjecaj različitih vrsta kuhanja na preciznost PCR metode. ARSLAN i sur. (2006.) su istraživali utjecaj različitih postupaka termičke obrade mesa na preciznost PCR-a. Došli su do zaključka da temperatura i vrijeme kuhanja, te veličina umnoženih DNK fragmenata utječu na određivanje vrste metodom lančane reakcije polimerazom.

IWOBI i sur. (2015.) u svojim su istraživanjima koristili multipleks PCR u stvarnom vremenu za kvantifikaciju govedine i svinjetine u proizvodima od mljevenog mesa. Dobiveni rezultati su pokazali da je najniža granica kvantifikacije svinjetine 1 %, a govedine 2 %. PCR u stvarnom vremenu (engl. Real Time PCR) danas je najčešće korištena kvantitativna metoda određivanja DNK. Međutim skupa oprema i kemikalije su još uvijek prepreka za postavljanje ove metode u većini laboratorija. Alternativno se koriste druge vrste lančane reakcije polimerazom (SOARES i sur., 2010.).

Iako je prethodno navedeno da je PCR u stvarnom vremenu najčešće korištena metoda određivanja DNK, KESMEN i sur. (2007.) u svom istraživanju dokazuju da se vrsno specifičnim PCR-om mogu dokazati vrste mesa u mesnim proizvodima bez potrebe za skupom

opremom. KESMEN i sur. (2007.) su istraživali prisutnost svinjetine, konjetine i magarećeg mesa u kuhanim kobasicama. Došli su do zaključka da začini i termička obrada nisu utjecali na umnožavanje DNK. Slični su rezultati dobiveni korištenjem istih početnica na uzorcima fermentiranih kobasica. Također su potvrdili da se vrsno specifičnom PCR metodom mogu detektirati vrste mesa u kuhanim kobasicama bez štetnog utjecaja sastojaka kobasica i tehnološke obrade. Korištenje ove metode je brzo i učinkovito, te ne zahtijeva skupu opremu kao neke druge metode.



Slika 1. Princip lančane reakcije polimerazom (CVRTILA, 2006.)

Identifikacija rezultata lančane reakcije polimerazom u pravilu se provodi pomoću horizontalne elektroforeze na agaroznom gelu (polisaharid) čija je osnovna jedinica agarobioza (disaharid). Nakon otapanja, kuhanja i laganog hlađenja agarozna tvori gustu mrežu s porama od 100 do 300 nm, ovisno o koncentraciji otopine agaroze. Vrlo je bitno prilikom pripreme gela odrediti

gustoću gela jer o tome ovisi razdvajanje molekula DNK različitih veličina. Gusti gel bolje razdvaja bliske fragmente malih duljina, a rjeđi gel se koristi pri razdvajanju velikih fragmenata. Agarozni gel se potapa u kadicu za elektroforezu u kojoj se nalazi pufer (provodnik). Uzorci se prije početka elektroforeze pomiješaju s puferom (engl. loading buffer). On povećava gustoću uzorka čime je omogućeno da DNK uzorka padne na dno jažice i također daje boju uzorku pomoću koje se može pratiti elektroforeza. Zatim se uzorci stavljaju u jažice agaroznog gela na način da u jednu jažicu ide jedan uzorak. Osim uzoraka stavljaju se pozitivna i negativna kontrola te DNK markeri koji predstavljaju sekvence DNK poznatih duljina, odnosno poznatog broja parova baza. Na kraju se uključuje jednosmjerna struja pri određenom naponu i započinje elektroforeza. Usporedbom brzine kretanja molekula DNK koje se ispituju s brzinom kretanja DNK markera procjenjuje se veličina DNK ciljne sekvence, odnosno uzorka. Završetkom elektroforeze potrebno je napraviti vizualizaciju razdvojenih fragmenata DNK. To se radi bojanjem gela etidijevim bromidom ili srebrovim nitratom. Etidijev bromid se počeo izbjegavati i zamjenjivati drugim bojilima u praksi iz razloga što je kancerogen. On se interkalira između lanaca DNK molekula i fluorescira pod UV svjetlom. Međutim nije trajan jer boja brzo izbledi, pa se gel može čuvati samo jedan do dva dana. Bojanjem srebrovim nitratom omogućuje se trajno čuvanje gela. Gel se mora zamotati u foliju i čuvati na temperaturi od +4 °C u hladnjaku (ŽIVKOVIĆ, 2007.).

Osim gel elektroforezom, daljnje informacije o PCR produktima se mogu dobiti korištenjem konformacijskog polimorfizma jednolančanih molekula DNK (engl. Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP), sekvenciranja DNK i polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata (engl. Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP). RFLP metoda se koristi kao vrsno specifična metoda. PCR produkti se podvrgavaju djelovanju restrikcijskih enzima, te se svojstva individualna za pojedinu vrstu očitavaju gel elektroforezom. Većina RFLP metoda su kvalitativne i najbolje ih je koristiti na jednoj vrsti mesa iz razloga što u miješanom mesu dolazi do tvorbe otisaka u gelu koje nije moguće interpretirati odnosno rezultati se teško očitavaju (BALLIN i sur., 2009.).

Metoda nasumično umnožene polimorfne DNK (engl. Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) ima prednost korištenja proizvoljnih PCR početnica čiji konačni rezultat je veliki opseg umnoženih produkata. RAPD metoda se može koristiti kada nije poznata količina DNK u uzorku. Ova metoda se osim za domaće životinje može i koristiti za određivanje rijetkih životinjskih vrsta s obzirom da prethodno nisu potrebne informacije o DNK te vrste. RAPD metoda je korištena u istraživanjima patvorenja pašteta od mesa peradi i patke. PCR u stvarnom vremenu i metoda krivulje taljenja DNK (engl. Melting Curve Analysis) se također mogu

koristiti za određivanje vrste. Sekvenciranje DNK se može koristiti za identifikaciju vrste u nepoznatim uzorcima i zapravo je najtočniji način za analizu PCR produkata stoga se koristi kao potvrdna metoda gel elektroforeze i PCR u stvarnom vremenu (BALLIN i sur., 2009.). Nadalje, hibridizacija DNK se koristi u mnogim istraživanjima određivanja sirovog ili termički obrađenog mesa u mesnim proizvodima. Granicom detekcije DNK pomoću ove metode se smatra količina od 0,1 % do čak manje od 0,01 % ovisno o vrsti mesa. Međutim metoda hibridizacije DNK je manje osjetljiva u odnosu na PCR, te je za njeno izvođenje potrebna skupa oprema (BALLIN i sur., 2009.).

3. Materijali i metode

3.1. Uzorci

U ovom radu korišteni su komercijalno dostupni uzorci korišteni (pljeskavice) i mesni „modeli“ pripremljeni u laboratoriju.

Komercijalni uzorci, pljeskavice, označeni su brojevima od 1 do 6. Prema deklaracijama pojedinog uzorka, uzorci od 1 do 4 u svom sastavu sadrže goveđe meso, uzorak broj 5 sadrži samo pureće meso i dodatak svinjskog masnog tkiva, dok uzorak broj 6 sadrži svinjsko i goveđe meso. Uzorci su homogenizirani, te je u daljnjem postupku korišteno 10 grama uzorka.

Za određivanje granice detekcije te utvrđivanje točnosti metode u smislu pojave lažno negativnih i pozitivnih rezultata korišteni su mesni „modeli“ pripremljeni u laboratoriju. Ukupno je pripremljeno 9 uzoraka s poznatim omjerom goveđeg, svinjskog i pilećeg mesa.

Mesni „modeli“ su načinjeni od mljevenog mesa na način da je svim uzorcima osnova bila svinjsko mljeveno meso, a goveđe mljeveno meso odnosno mljevena piletina su dodavani u različitim omjerima. Smljeveni su na način da se spriječi kontaminacija korištenjem čistog pribora i laboratorijskog miksera za svaku pojedinu vrstu mesa. U daljnjem su postupku homogenizirani i korišteni u količini od 0,60 grama. Uzorci označeni slovima od A do E se sastoje od svinjskog i goveđeg mesa u sljedećim omjerima: 100 % govedina (uzorak A), 25 % svinjetine i 75 % govedine (uzorak B), 50 % svinjetine i 50 % govedine (uzorak C), 75 % svinjetina i 25 % govedina (uzorak D), 100 % svinjetina (uzorak E). Uzorci od F do I se sastoje od svinjskog i pilećeg mesa u sljedećim omjerima: uzorak F sadrži 100 % pilećeg mesa, uzorak G sadrži 25 % svinjskog mesa i 75 % pilećeg mesa, uzorak H sadrži 50 % svinjskog i 50 % pilećeg mesa, dok uzorak I sadrži 75 % svinjskog mesa i 25 % pilećeg mesa.

Tablica 1.: Udio svinjskog i goveđeg mesa u uzorcima od A do E

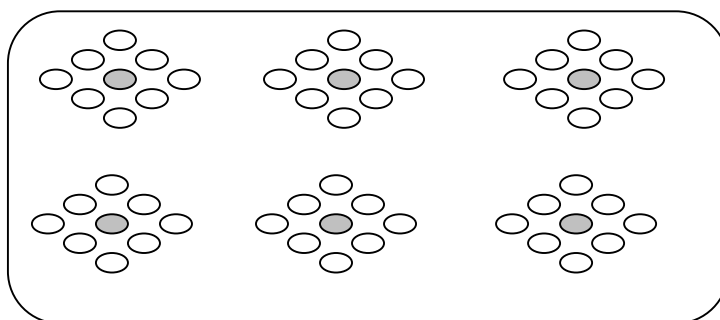
Uzorak	Udio svinjskog mesa (%)	Udio goveđeg mesa (%)
A	0	100
B	25	75
C	50	50
D	75	25
E	100	0

Tablica 2.: Udio svinjskog i pilećeg mesa u uzorcima od F do I

Uzorak	Udio svinjskog mesa (%)	Udio pilećeg mesa (%)
F	0	100
G	25	75
H	50	50
I	75	25

3.2. Micro-ouchterlony test

Micro-ouchterlony test je kvalitativna metoda za detekciju protutijela ili antigena poput imunoglobulina. Dio traga za koji se sumnja da sadrži tragove životinjskog podrijetla izrezati u epruvetu i otapati u UFH₂O. Nakon otapanja, 10 μL nadtaloga prenijeti u središnju poziciju na pločici (na slici označeno sivom bojom), a u okolne pozicije dodati po 10 μL protutijela životinja za koje se sumnja da trag potječe (npr. srna, kokoš, ovca, humani itd.). Ostaviti preko noći na tamnom mjestu, a zatim očitati rezultate. U slučaju pozitivnog rezultata stvori se tanka svjetla linija precipitata između pozicije uzorka i protutijela specifične životinje.



Slika 2. Izgled Micro - ouchterlony test pločice

3.3. Izolacija DNK

Kemikalije i reagensi

- Chelex® 100 granule; skladišti se prema uputama proizvođača
- Proteinaza K (500 mg); skladišti se dobro zatvoreno, na suhom i hladnom mjestu (+2 °C do +10 °C)
- Ultrafiltrirana H₂O - UFH₂O

Priprema 20 %-tne otopine Chelex®:

2 g Chelex® 100 granula otopiti u 10 mL UFH₂O i podesiti pH na 10-11 (pH ne smije biti manji od 9). Čuvati u hladnjaku.

Priprema 5 %-tne otopine Chelex®:

20 %-tni Chelex® razrijediti 4 x pomoću UFH₂O. Čuvati u hladnjaku.

Priprema 10 %-tne proteinaze K:

Otopiti 10 mg suhe proteinaze K u 1 mL UFH₂O. Pripremljena otopina se čuva u hladnjaku, u slučaju da se napravi veći volumen otopine alikvotne od 1 mL čuvati u zamrzivaču.

Instrumenti, oprema i pribor

Uređaj za UV zračenje - UV Crosslinker

Centrifuga

Vorteks

Treskalica

Vodena kupelj

Centrifuga - Amicon Ultra-4 100K

Škarice

Vata

Epruvete od 1,5 mL

Stalak za epruvete

Pipete

Nastavci za pipete

Plamenik

Priprema uzoraka

U epruvetu unutar koje se nalazi uzorak mesa:

- Dodati 100 μL 5 %-tne otopine Chelex[®], vorteksirati te dodati 10 μL 10 %-tne proteinaze K
- Inkubirati u vodenoj kupelji pri 56 °C najmanje 30 minuta do 2 sata
- Vorteksirati
- Denaturirati kuhanjem u kipućoj vodi 8 minuta
- Vorteksirati
- Centrifugirati 3 minute na 11000 okr/min i čuvati u hladnjaku

3.4. Provjera uspješnosti izolacije DNK (kvantifikacija)

Kvantifikacija DNK je provedena na uređaju Qubit[®] 3.0 Fluorometer nakon izolacije DNK iz svih analiziranih uzoraka (pljeskavice i „mesni modeli“ uzoraka) pomoću Qubit[®] kita. Kit sadrži boju koja fluorescira samo kada je vezana za DNA, pufer u kojem se otapa boja te dva standarda za kalibraciju fluorometra. Za mjerenje koncentracije treba koristiti posebne prozirne mikroeprevete od 0,5 mL s tankom stijenkom, Qubit[™] assay Tubes. Također, ovim smo postupkom provjeravali uspješnost same lančane reakcije polimerazom kvantifikacijom produkata nakon provedene PCR metode.

Potrebno je prirediti radnu otopinu na način da se boja razrijedi u puferu u omjeru 1:200 (1 μL Qubit[®] reagensa i 199 μL Qubit[®] pufera). Uzorak se priređuje na način da se u epruvete doda 1 μL uzorka (produkt PCR za svaki komercijalni uzorak) i 199 μL radne otopine (ukupni volumen mora iznositi 200 μL).

3.5. PCR reakcija

Priprema PCR mješavine (mix)

PCR mix je pripremljen od Go Taq G2 Start Green Master Mix u količini 6,25 μL , početnice (SIM) u količini 0,5 μL , početnice C (piletina) u količini 0,5 μL , početnice B (govedina) u količini 0,5 μL , početnice P (svinjetina) u količini 0,5 μL i UFH₂O u količini 3,75 μL . Ukupan volumen iznosi 12 μL te je u njega dodano 0,5 μL DNK.

Tablica 3.: Popis korišteni početnica specifičnih za vrstu (MATSUNAGA i sur., 1999.)

Početnica	Slijed nukleotida početnice (5'- 3')
SIM	GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA
Piletina (C)	AAGATACAGATGAAGAAGAATGAGGCG
Govedina (B)	CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG
Svinjetina (P)	GCTGATAGTAGATTTGTGATGACCGTA

Izvođenje PCR reakcije

PCR reakcija je izvedena u 35 ciklusa. 2 minute na 95 °C, 30 sekundi na 94 °C, zatim 30 sekundi na 60 °C, pa 30 sekundi na 72 °C, pa 10 minuta na 72 °C. Na kraju se temperatura spušta na 4 °C.

Tablica 4.: Uvjeti PCR reakcije

Uvjeti lančane reakcije polimerazom	95 °C x 2 min	denaturacija DNA razdvajanjem dvostruke uzvojnice
	94 °C x 30 s	komplementarno vezanje početnica na točno određena mjesta razdvojenih lanaca i sintezu novih lanaca
	60 °C x 30 s	
	72 °C x 30 s	
	72 °C x 10 min	završna sinteza novih lanaca
	4 °C ∞	hlađenje

PCR produkte očekujemo s brojem baznih parova za piletinu 227 bp, govedinu 274 bp, svinjetinu 398 bp (MATSUNAGA i sur., 1999.).

3.6. Elektroforeza

Za elektroforezu pri naponu od 80 V u vremenu od 40 minuta je korišten 2 % agarozna - gel koji je načinjen od 60 ml pufera (1 x TAE) i 1,2 g agaroze. Agarozu je potrebno zagrijavati do prozirne boje. Prije izlivanja gela u kadicu za elektroforezu u agarozna - gel je dodano 2 μ L Midori Green DNA Stain boje za detekciju DNK. Zatim se sve izlije u kadicu za elektroforezu te ostavi otprilike 45 minuta da se gel stvrdne. U uzorke je dodana Thermo Scientific 6X DNA Loading Dye boja koja služi za vizualizaciju uzoraka za vrijeme migracije istih kroz agarozna - gel. Od markera je korišten Thermo Scientific GeneRuler 50bp DNA Ladder. Očitavanje elektroforeze obavljeno je pod UV svjetlom.

4. Rezultati

4.1. Micro-ouchterlony test

Ovaj smo test proveli smo na komercijalnim uzorcima (pljeskavice). Rezultati su bili relativno slabo vidljivi, no pažljivim proučavanjem reakcije primijećena je pojava tanke svijetle linije precipitata između pozicije uzorka i protutijela specifične životinje. Za uzorke brojeva od 1 do 4 pojavila se linija na mjestu govedih protutijela, za uzorak broj 5 nije se pojavila linija, dok je za uzorak broj 6 linija nastala na mjestu protutijela za goveda i svinje.

4.2. Kvantifikacija DNK

U tablicama 5. i 6. prikazani su rezultati kvantifikacije DNK nakon lančane reakcije polimerazom za uzorke pljeskavica i „mesnih modela“.

Tablica 5.: Udio DNK u uzorcima pljeskavica nakon PCR

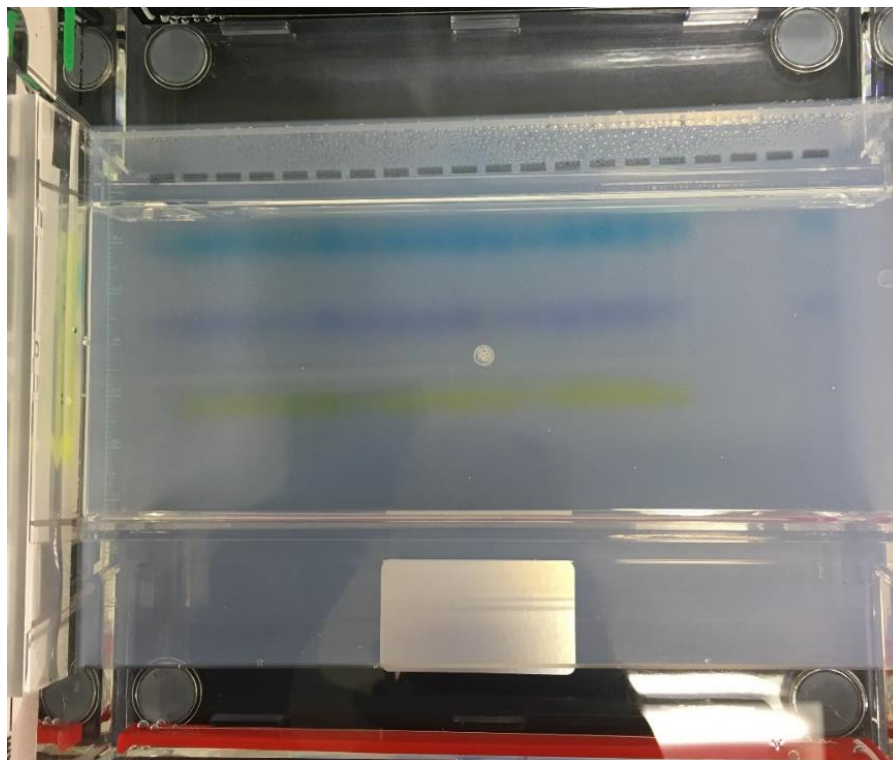
Uzorak	Udio DNK (ng/ μ L)
1	27,60
2	51,80
3	47,20
4	28,40
5	10,60
6	68,00

Tablica 6.: Udio DNK u uzorcima „mesnih modela“ nakon PCR

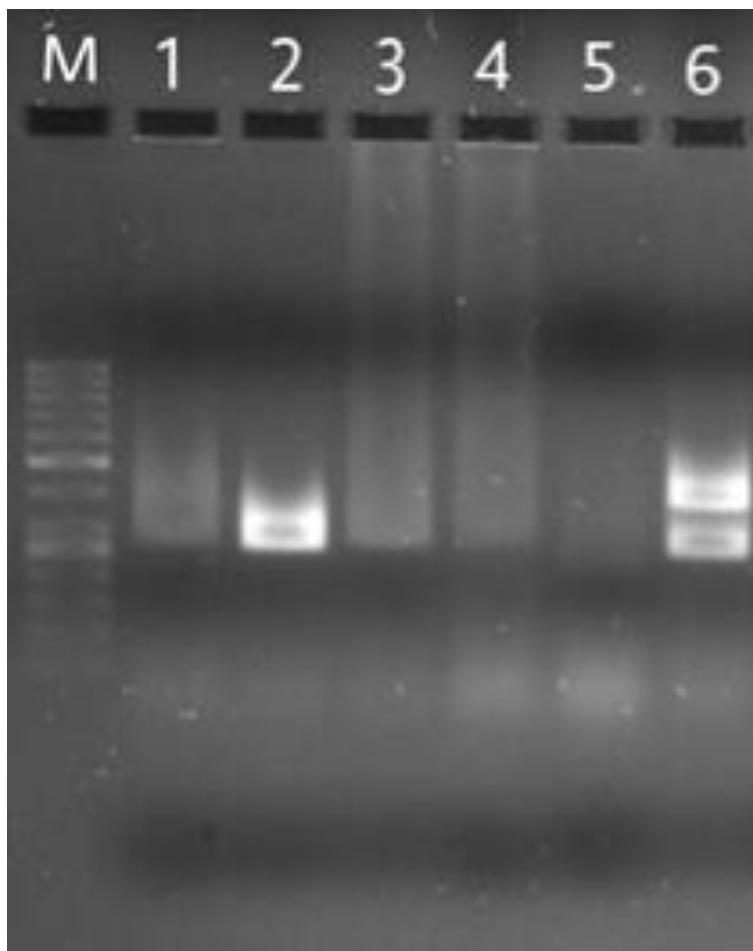
Uzorak	Udio svinjskog mesa (%)	Udio goveđeg mesa (%)	Udio pilećeg mesa (%)	Udio DNK (ng/ μ L)
A	0	100	0	3,76
B	25	75	0	4,00
C	50	50	0	37,80
D	75	25	0	15,20
E	100	0	0	5,32
F	0	0	100	7,30
G	25	0	75	5,66
H	50	0	50	10,40
I	75	0	25	49,20

4.3. Elektroforeza

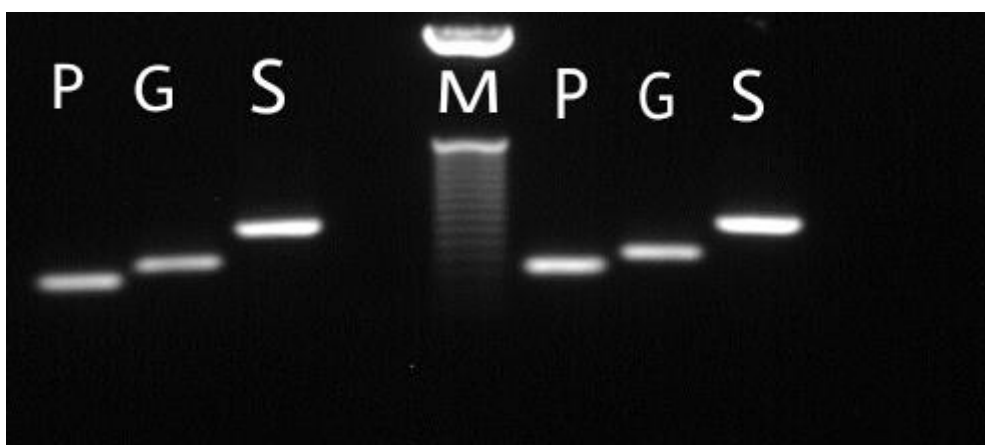
Vizualizacija rezultata PCR provedena je pomoću elektroforeze što je prikazano na slikama od 3. do 6.



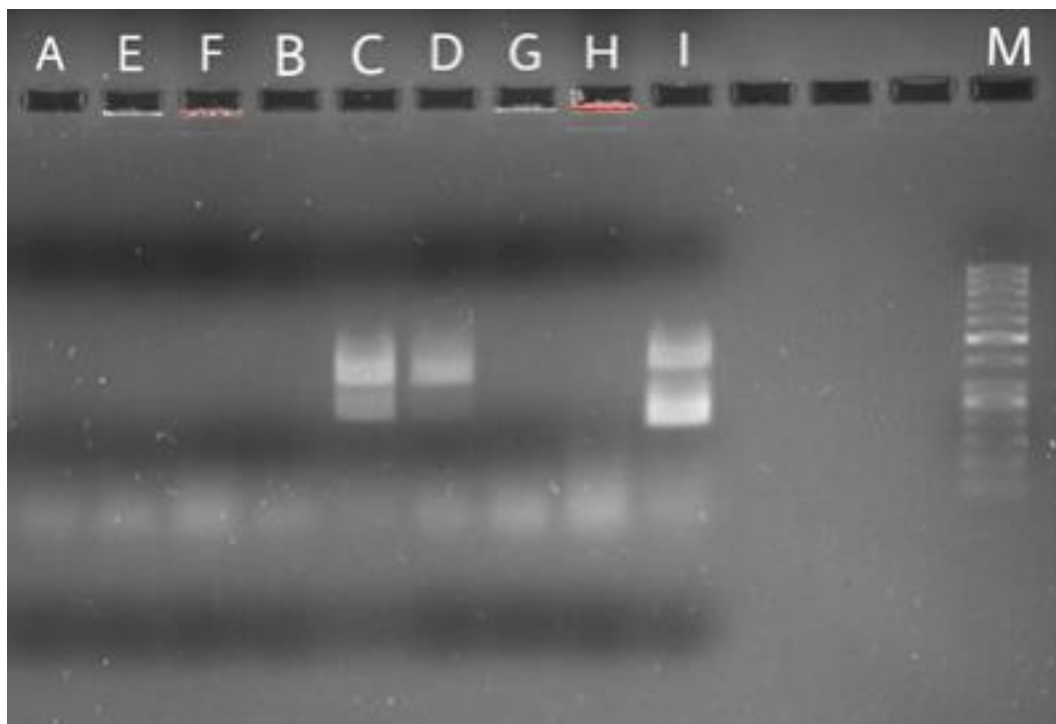
Slika 3. Elektroforeza u agarozu - gelu



Slika 4. Očitavanje elektroforeze uzoraka iz prometa
(oznaka M= marker, 1-6= komercijalni uzorci, pljeskavice)



Slika 5. Očitavanje elektroforeze uzoraka čistih „mesnih modela“ A, E i F
(oznaka M= marker, oznaka P= model F, oznaka G= model A, oznaka S= model E)



Slika 6. Očitavanje elektroforeze uzoraka „mesnih modela“
(oznaka M= marker, oznake A – I= uzorci mesnih „modela“)

5. Rasprava

Kao prvi kvalitativni test za utvrđivanje vrsta mesa u mesnim proizvodima napravljen je Micro-ouchterlony test. Po napravljenju inkubaciji bile su vidljive tanke svijetle linije precipitata između pozicije uzorka i protutijela specifične životinje. Time smo zapravo dokazali prisustvo protutijela u uzorku.

Nakon provedene lančane reakcije polimerazom pljeskavica i „mesnih modela“ napravljena je kvantifikacija DNK i iz tih je rezultata vidljivo da je izolacija uspješna iako su u nekim uzorcima koncentracije DNK vrlo niske.

Slika 4. prikazuje vizualizaciju produkata lančane reakcije polimerazom za uzorke pljeskavica iz prometa provedene elektroforezom. Iz tih je rezultata vidljivo da je u uzorcima od 1 do 4 utvrđeno prisustvo junećeg mesa što je potpuno u skladu s deklaracijom. U uzorku 5 nije utvrđena niti jedna od vrsta mesa za koje smo imali početnice (piletina, svinjetina, govedina) što je također bilo očekivano jer je taj uzorak pljeskavice proizveden od purećeg mesa. U deklaraciji tog uzorka bilo je navedeno da je pri proizvodnji korišteno svinjsko masno tkivo što ovom metodom nismo mogli niti potvrditi niti opovrgnuti. Zapravo nama to i nije bilo značajno jer nismo željeli utvrditi vrste mesa s obzirom na religijsko značenje njihovog nalaza u proizvodima. Uzorak broj 6 je proizveden od smjese goveđeg i svinjskog mesa što je i vidljivo iz naših rezultata. Prema intenzitetu linija na gelu mogli bismo zaključiti da su obje vrste mesa korištene u podjednakim količinama pri proizvodnji te vrste pljeskavice.

Nakon uzoraka iz prometa prvo smo analizirali „mesne modele“ u 100 %-tnim količinama pojedinih vrsta mesa. Slika 5. nam prikazuje rezultate gel elektroforeze nakon PCR-a za mesne modele u 100 % količinama pojedine vrste mesa (P - piletina; G – govedina; S – svinjetina). Kao što je i ranije rečeno prema ovom protokolu PCR produkte očekujemo s brojem baznih parova za piletinu 227 bp, govedinu 274 bp, svinjetinu 398 bp (MATSUNAGA i sur., 1999.). Na osnovi dobivenih rezultata možemo reći da se ova metoda pokazala vrlo točnom.

Prema dostupnim podacima iz literature, KARABASANAVAR i sur. (2014.), koristeći vrsno specifičan PCR, su određivali prisutnost svinjskog mesa u mesnim proizvodima. S obzirom na važnost određivanja svinjetine vrsno specifičan PCR nudi mnogo prednosti kao što su: jednostavnost izvođenja metode i interpretacije rezultata, prikladnost rutinskog testiranja, primjenjivost na sirovom, kuhanom (čak i autoklaviranom), te patvorenom (do 0,1 %) uzorku s prihvatljivom granicom osjetljivosti (10 pg). Navedene prednosti čine vrsno specifičan PCR metodom koja se može koristiti za rutinsko testiranje. Osim za dokazivanje svinjetine u mesnim proizvodima vrsno specifičan PCR se može koristiti i za otkrivanje drugih vrsta mesa. Tako su

KESMEN i sur. (2007.) istraživali prisutnost svinjetine, konjetine i magarećeg mesa u kuhanim kobasicama i utvrdili da je metoda osjetljiva za 0,01 ng DNK za pojedinu vrstu te da se granica detekcije kretala od 0,1 do 5 %.

GHOVVATI i sur., (2014.) u svom radu koriste multipleks PCR na komercijalnim uzorcima mljevenog mesa, narezaka i kobasica. Dokazuju da je ova metoda vrlo osjetljiva i pouzdana u vrsnoj identifikaciji s vrlo niskom granicom detekcije DNK. Također zbog svoje jednostavnosti primjenjiva je u laboratorijima kontrole kakvoće hrane za kontrolu industrijskih mesnih proizvoda kao što su kobasice, mljeveno meso te sva ostala hrana u kojoj se pokušava otkriti podrijetlo sirovine. Prilogu osjetljivosti multipleks PCR metode idu i rezultati istraživanja IWOBI i sur. (2015.) koji otkrivaju najnižu granicu detekcije svinjetine od 1 % i govedine 2 %. Međutim, oni su u svom istraživanju koristili PCR u stvarnom vremenu koji zahtijeva skupu opremu, a cijena kemikalija potrebnih za izvođenje metode je visoka. Iako je PCR u stvarnom vremenu danas najčešće korištena metoda još uvijek se ne provodi rutinski u većini laboratorija. Iz tog razloga se alternativno koriste druge vrste PCR metoda (SOARES i sur., 2010.). Ipak, KESMEN i sur. (2007.) u svom istraživanju dokazuju da se vrsno specifičnim PCR-om mogu dokazati vrste mesa u mesnim proizvodima bez potrebe za skupom opremom, korištenjem ove metode koja je brza i učinkovita.

Uz spomenute 100 %-tne mesne modele mi smo u našem radu analizirali i mesne modele s različitim omjerima pojedinih vrsta mesa (tablice 1 i 2). Ti su rezultati prikazani na slici 6. Naime za uzorke A, E i F (100 %-tni udjeli pojedine vrste mesa) nakon PCR-a u ovom slučaju nismo dobili nikakav izlaz na gelu. To možemo objasniti izrazito niskom koncentracijom DNK nakon PCR-a „mesnih modela“. Sličan se problem dogodio i za uzorke B, G i H. Jedino što možemo reći kao objašnjenje ovakvih rezultata jest da smo sve mesne modele priređivali ranije te ih nakon homogenizacije zamrznuli. Kako smo izolaciju radili u nekoliko navrata tako smo i uzorke „mesnih modela“ nekoliko puta zamrzavali i odmrzavali. Poznato je da takav postupak može dovesti do degradacije DNK molekula. Tome bismo u daljnjim istraživanjima posvetili posebnu pozornost te na taj način isključili ili potvrdili ovu pretpostavku. Rezultati za uzorak C, D i I su u skladu s našim očekivanjima. Naime, uzorak C je smjesa svinjetine i govedine u omjeru 50 : 50 što je zapravo vrlo lijepo vidljivo iz slike na gelu. Uzorak D je smjesa svinjetine i govedine u omjeru 75 : 25 te se to također da zaključiti na osnovu slike. Linija koja pokazuje prisustvo svinjetine značajno je jačeg intenziteta nego li je to linija koja ukazuje na prisustvo govedine u „mesnom modelu“. Uzorak I načinjen je iz smjese svinjetine i piletine u omjeru 75 : 25. To je također potvrđeno slikom na gelu nakon elektroforeze.

Na osnovu svih naših rezultata možemo reći da je PCR metoda vrlo jednostavna za primjenu i relativno lako izvediva. Ne zahtijeva skupocjenu opremu te se rutinski može provoditi u laboratorijima za kontrolu hrane. Konvencionalnom PCR metodom može se odrediti samo prisutnost, ali ne i količina pojedinih vrsta DNK u uzorcima što može predstavljati problem pri nekim istraživanjima. Za kvantifikaciju pojedinih vrsta DNK se moramo poslužiti PCR-om u stvarnom vremenu koji zahtijeva bolju opremljenost laboratorija i realno mnogo je skuplja metoda te time podiže cijenu i same analize.

6. Zaključak

Patvorenje proizvoda od mesa nedeklariranim vrstama predstavlja zajednički problem mnogih država svijeta, a najčešće prijevarne radnje su zamjena skupe sirovine jeftinijom. Iz tog razloga vrlo je važna implementacija pouzdanih analitičkih metoda za utvrđivanje točnog sastava mesnih proizvoda te time i ispravnosti deklaracije. Osim vrsnog određivanja sirovine značajno je odrediti i njezin udio odnosno kvantificirati količinu. Naime, konzumiranje proizvoda koji sadrže nedeklarirane animalne ili biljne bjelančevine lako može uzrokovati i alergijske reakcije kod senzibiliziranih pojedinaca. Ne smiju se zanemariti ni religijski običaji i zakoni. Metode određivanja DNK u mesnim proizvodima danas se sve više koriste u svrhu određivanja nedeklariranih vrsta mesa. U ovom istraživanju u niti jednom uzorku nismo dokazali patvorenje u smislu dodavanja nedeklariranih vrsta mesa u ispitivane mesne proizvode.

7. Literatura

1. ARSLAN A., O. I. ILHAK, M. CALICIOGLU (2006): Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. *Meat Science*, 72, 326-330.
2. ASHOOR, S.H., W.C.MONTE, P.G. STILES (1988): Liquid Chromatographic Identification of Meats. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71, 397-402.
3. BALLIN N. Z., F. K. VOGENSEN, A. H. KARLSSON (2009): Species determination- Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Science*, 83, 165-174.
4. BARAI B. K., R. R. NAYAK, R. S. SINGHAL, P. R. KULKARNI (1992): Approaches to the detection of meat adulteration. *Trends in Food Science & Technology*, 3, 69-72.
5. COLLINS E. J. T. (1993): Food adulteration and food safety in Britain in the 19th and early 20th centuries. *Food Policy*, April, 95-109.
6. CVRTILA Ž. (2006): Identifikacija laktobacila u tijeku zrenja trajnih kobasica pomoću lančane reakcije polimerazom. Disertacija Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, 2006. Rukopis strojem, str. 96.
7. DELIĆ, V. (1997): Genetičko inženjerstvo u biotehnologiji. Priručnik Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Str.139.
8. GHOVVATI S., M.R. NASSIRI, S.Z. MIRHOSEINI, A. HERAVI MOUSSAVI, A. JAVADMANESH (2009): Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. *Food Control*, 20, 696–699.
9. GRUJIĆ R., S. GRUJIĆ, D. VUJADINOVIĆ (2012): Funkcionalni proizvodi od mesa. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*. 1, 1, 44-45.
10. HARGIN K. D. (1996): Authenticity issues in meat and meat Products. *Meat Science*, 43, 277-289.
11. HITCHOCK, C.H.S., A.A. Crimes (1984): Methodology for meat identification. In: *Biochemical identification of meat species*. Elsevier Applied Science Publishers. Edited by: Patterson R.L.S.

12. HOFMANN, K. (1985): Principal problems in the using identification of meat species of slaughter animals using electrophoretic methods. U: Patterson, R.L.S.: Biochemical identification of meat species. Elsevier applied science publishers LTD. England.
13. HOFMANN, K., K. FISCHER, E. MULLER, V. KEMPER (1996): Experiments to demonstrate the effectiveness of heat treatments applied to canned meats and meat-and-bone meals. *Fleischwirtschaft*, 76(9):920-923.
14. HOFMANN, K., K. FISCHER, E. MULLER, W. BABEL (1999): ELISA-test for cooked meat species identification on gelatine and gelatine products. *Nahrung* 43, Nr.6, S. 406-409.
15. IWOBI A., D. SEBAH, I. KRAEMER, C. LOSHER, G. FISCHER, U. BUSCH, I. HUBER (2015): A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat. *Food Chemistry*, 169, 305–313.
16. KARABASANAVAR N. S., S.P. SINGH, DEEPAK KUMAR, SUNIL N. SHEBANAVAR (2014): Detection of pork adulteration by highly-specific PCR assay of mitochondrial D-loop. *Food Chemistry*, 145, 530–534.
17. KARADJOLE, I., M. HADŽIOSMANOVIĆ (1999): Značenje mesa i mesnih bjelančevina u prehrani. U: Senat AMZH. Odbor za dijetetiku. Proteini u prehrani i dijetetici. Urednici R. Živković, Z. Biđin, V. Oberiter. Zagreb, 1999. Str. 53-66.
18. KESMEN Z., F. SAHIN, H. YETIM (2007): PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. *Meat Science*, 77, 649–653.
19. KOVAČIĆ, L., A. SENTA (1999): Potrošnja i proizvodnja proteina u svijetu i Hrvatskoj. U: Senat AMZH. Odbor za dijetetiku. Proteini u prehrani i dijetetici. Urednici R. Živković, Z. Biđin, V. Oberiter. Zagreb, 1999. Str. 17-25.
20. KULIER, I. (1996): Tablice kemijskog sastava namirnica. Standard Euro-Food Composition Tables. Izdavač: Hrvatski farmer d.d., Zagreb.
21. LEE, J.W., J.H. PARK, C.J. KIM, H.K. SHIN (1998): Monitoring thermally induced conformational changes in bovine muscle myosin solutions by competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (Ci-ELISA). *Int. J. Food Sci. Technol.* 33 (4):414-418.
22. MANE B. G., S. K. MENDIRATTA, A. K. TIWARI (2009): Polymerase chain reaction assay for identification of chicken meat in meat and meat products. *Food Chemistry*, 116, 806-810.

23. MILLER S. A., D. D. DYKES, H. F. POLESKY (1988): A sample salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215.
24. MULLIS, K.B., F.A. FALOONA, S.J. SCHARF, R.N. SAIKI, G.T. HORN, H.A. ERLICH (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.* 51, 263.
25. NAGLIĆ, T., D. HAJSIG (1993): Veterinarska imunologija. Udžbenik Sveučilišta u Zagrebu. Školska knjiga, Zagreb.
26. OLSEN, J. E. (2000): DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. *Food Research International* 33, 257-266.
27. RAHELIC, S. (1978): Osnove tehnologije mesa. Mišić – sastav i postmortalne promjene. Udžbenici Universiteta u Novom Sadu. Školska knjiga, Zagreb.
28. SAMBROOK J., D.W. RUSSELL(2001): *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
29. SENG-HOUR, T. (1985): Identification of animal species by electrophoresis. Patterson, R.L.S.: *Biochemical identification of meat species*. Elsevier applied science publishers LTD. England.
30. SOARES S., J. S. AMARAL, I. MAFRA, M. B. P.P. OLIVEIRA (2010): Quantitative detection of poultry meat adulteration with pork by a duplex PCR assay. *Meat Science*, 85, 531–536.
31. T. GOMERČIĆ, M. SINDIČIĆ, T. TRUPEC, I. VRANEŠEVIĆ, D. KONJEVIĆ, Z. JANICKI (2015): Identifikacija mesa lopatara molekularnim metodama. *MESO XVII*, 4,350-352.
32. TORTI, N. (2007): Crveno meso je dobro za vaše zdravlje. *Meso IX*, 4, 181-183.
33. VIZZIANI, A., P. AVELLINI, M. SEVERINI, G. CENCI (1985): The use of electrophoretic techniques for identifying raw wild boar and domestic pig meat. Patterson, R.L.S.: *Biochemical identification of meat species*. Elsevier applied science publishers LTD. England.
34. WILLIAMS J.G.K., A.R. KUBELIK, K.J. LIVAK, J.A. RAFALSKI, S.V. TINGEY (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531-6535.

35. ŽIVKOVIĆ M. (2007): Osnovni principi PCR metode i njena primena u kliničkoj praksi.
(<http://www.medicinskicasopis.org/pdf/br%207/sr/Full/Osnovni%20principi%20pcr%20metode%20i%20njena%20primena%20u%20klinickoj%20praksi.pdf>
pristupljeno dana 15.04.2016.)
36. ŽIVKOVIĆ, J. (1986): Higijena i tehnologija mesa. II dio. Kakvoća i prerada. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu. GRO "Tipografija" - Đakovo. Zagreb, 1986.
37. ŽIVKOVIĆ, J. (2001): Higijena i tehnologija mesa. I dio. Veterinarsko – sanitarni nadzor životinja za klanje i mesa. Pripremio i nadopunio prof.dr.sc. M. Hadžiosmanović. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu. GRO "Orbis" – Zagreb. Zagreb, 2001.

8. Sažetak

UTVRĐIVANJE PATVORENJA MESNIH PROIZVODA NEDEKLARIRANIM VRSTAMA MESA POMOĆU POSTUPKA LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM

Izvornost hrane podrazumijeva vjerodostojnost svih podataka istaknutih na oznakama hrane. Proizvođač upotrebom nekog važećim propisima definiranog naziva hrane na sebe preuzima obavezu da taj proizvod udovoljava propisima za taj naziv. Patvorenje hrane uključuje upotrebu sastojaka niže kakvoće odnosno prodaju proizvoda pod lažnim nazivom. U tom je smislu utvrđivanje patvorenja proizvoda od mesa s nedeklariranim vrstama mesa vrlo značajno s ekonomskog i religioznog stanovišta te želje da se zaštiti zdravlje potrošača. Cilj ovog rada bio je utvrditi prisustvo nedeklariranih vrsta mesa u mesnim proizvodima pomoću PCR s vrsno specifičnim početnicama za različite vrste životinja (piletina, govedina i svinjetina). U ovom istraživanju u niti jednom uzorku nije utvrđeno patvorenje u smislu dodavanja nedeklariranih vrsta mesa u ispitivane mesne proizvode.

9. Summary

IDENTIFICATION ADULTERATION MEAT PRODUCTS WITH UNDECLARED ANIMAL SPECIES BY POLYMERASE CHAIN REACTION

The authenticity of food involves the credibility of all the data specified on food labels. The producer takes responsibility by giving the product a certain label which should comply with the legislation of this product. Food adulteration includes using ingredients of lower quality and selling such under false label. Establishment of meat adulteration using undeclared meat is very important from an economic and religious point of view, and also for consumers protection. The aim of this work was to identify undeclared meat types in meat products using species specific PCR for different animal species (chicken, cattle, pork). In this study meat adulteration using undeclared meat hasn't been proved in any sample.

10. Životopis

Antoneta Segarić je rođena 13.05.1990. u Zadru. Osnovnu školu završila je u Zadru, gdje je također završila i Gimnaziju Jurja Barakovića. Godine 2009. upisuje Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Apsolventica je integriranog preddiplomskog i diplomskog studija Veterinarske medicine, smjer Veterinarsko javno zdravstvo i sigurnost hrane. Zajedno s kolegicom Monikom Tomić napisala je rad za Rektorovu nagradu naziva „Prikaz kakvoće pršuta različitih regija Republike Hrvatske“ 2014. godine, a 2015. godine rad „Kakvoća šokola - jedinstvenog tradicijskog proizvoda grada Nina i okolice“. Iste godine njihov rad o šokolima je nagrađen srebrnom medaljom na Međunarodnom sajmu inovacija u poljoprivredi, prehrambenoj industriji i poljoprivrednoj mehanizaciji „AGRO ARCA 2015“. Tijekom srpnja 2015. godine pohađala je ljetnu školu higijene hrane u organizaciji Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno. U listopadu 2015. godine sudjelovala je u radu međunarodnog kongresa „Veterinarska znanost i struka“ s usmenim izlaganjem „Određivanje kakvoće šokola- tradicijskog proizvoda grada Nina“.