

AKTUÁLNÍ METODY POUŽÍVANÉ PRO ODHALENÍ FALŠOVÁNÍ MASA A MASNÝCH VÝROBKŮ

DILIARA AKHATOVA^{a,b}, KAMILA ZDEŇKOVÁ^a,
MARTINA KONCOŠOVÁ^a a KATEŘINA
DEMNEROVÁ^a

^a Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6,
^b Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i., Radiová 1285/7, 102 00 Praha 10
akhatovd@vscht.cz; zdenkovk@vscht.cz

Došlo 11.5.17, přepracováno 6.11.17, přijato 20.12.17.

Klíčová slova: falšování potravin, maso, proteiny, DNA, polymerasová řetězová reakce

Obsah

1. Úvod
2. Označování masných výrobků
3. Metody používané při analýze masa
 - 3.1. Metody založené na proteinové analýze
 - 3.2. Proteomika a metabolomika
 - 3.3. Metody založené na analýze DNA
4. Závěr

1. Úvod

Maso a masné výrobky patří v současné době mezi nejdražší potraviny, což logicky podněcuje snahu nepoctivých výrobců masných polotovarů a uzenin k falšování těchto komodit. Jedním z běžných způsobů klamání zákazníků je náhrada jakostního druhu masa masem méně hodnotným, či uvádění nesprávného poměru obsahu daného druhu masa na etiketě výrobku. Takovéto nekalé praktiky pak přinášejí nepoctivým výrobcům finanční zisk na úkor spokojenosti spotřebitele.

Falšování masa je aktuálním a závažným problémem v celosvětovém měřítku. Dostupné statistické údaje ukazují, že přibližně u 19,4 % masných výrobků v USA, 22 % v Turecku, 15 % ve Švýcarsku a 8 % ve Spojeném království byly na etiketách uvedeny nesprávné údaje^{1,2}. V Evropě je nejznámějším příkladem podvodu tohoto typu případ s koňským masem z roku 2013. Tehdy bylo v hovězích masných výrobcích v tržní síti 16 států Evropské unie detegováno koňské maso. Do ČR bylo dodáno téměř 10 tun masa deklarovaného jako hovězí, přičemž se jednalo o čistou koňskou svalovinu³. Další známý případ

nesprávného označování masných výrobků v ČR souvisí s bovinní spongiformní encefalopatií, známější jako „nemoc šílených krav“. Od 8. června roku 2001 se ČR zařadila mezi země, ve kterých byl zaznamenán výskyt této nemoci⁴. Důsledkem toho bylo snížení zájmu zákazníků o hovězí maso a výrobky z něj, což vedlo k falšování potravin obsahujících tento druh masa a k nesprávnému označování tohoto zboží. V roce 2001 Státní zemědělská a potravinářská inspekce odhalila v celkem 65 testovaných vzorcích 9, které byly nesprávně označeny, na etiketě nebyl ve složení uveden obsah přítomného hovězího masa⁵.

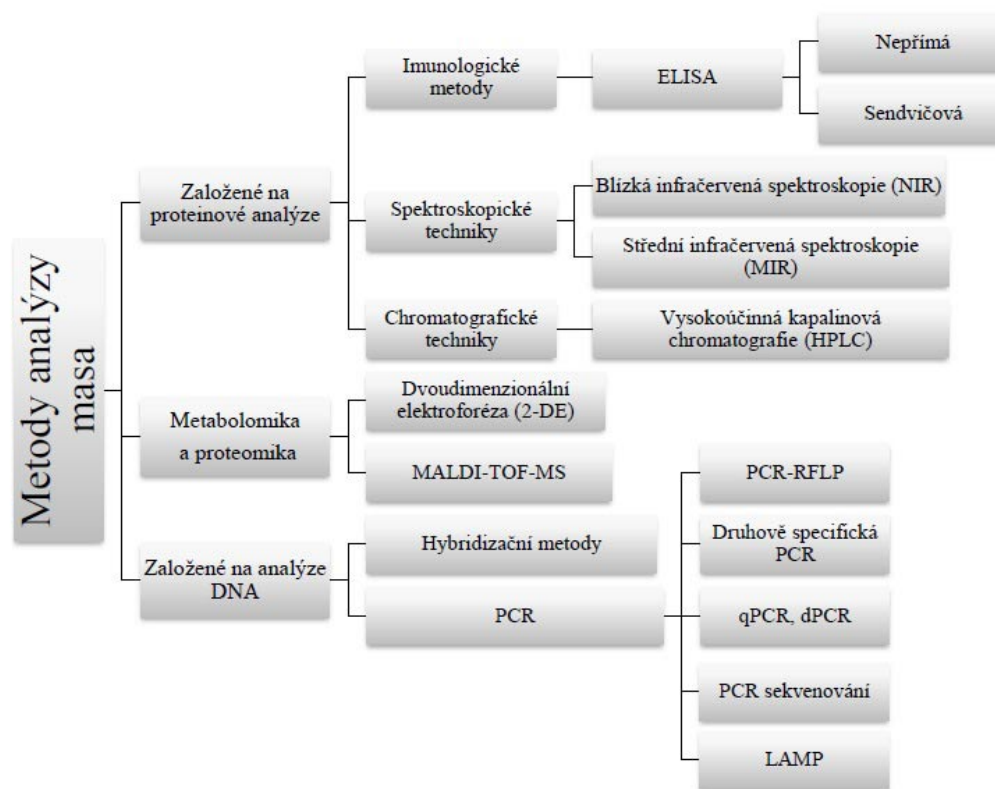
2. Označování masných výrobků

Správné a srozumitelné označení potravin, tudíž i masných výrobků, by mělo usnadnit spotřebitelům volbu při nákupu. Na etiketě musí být uvedeny veškeré důležité informace, které pomohou zákazníkům při rozhodování o případné koupi výrobku.

V případě masných výrobků je základním údajem pro rozlišení jejich kvality obsah masa. Vyhláška č. 69/2016 Sb. uvádí následující definici: za maso se považují požitelné části jatečných zvířat, které slouží k lidské výživě, zejména svalovina, ale také šlachy, kosti, některé vnitřnosti, kůže a tuk. Tyto suroviny musí být úředně prohlášeny za vhodné k lidské spotřebě⁶. Tato definice však neodpovídá tomu, co si spotřebitel běžně pod pojmem „maso“ představí. S cílem zajištění informovanosti spotřebitelů o skutečné povaze masných výrobků byla přijata specifická definice „masa“, používaná výhradně pro označování obsahu masa v masných výrobcích, kde je jako maso definována kosterní svalovina s přirozeně obsaženým tukem (sádlem nebo lojem) a pojivovými tkáněmi (vazivem, které je součástí svalové struktury). K jednotlivým druhům masa jsou přiřazeny horní limity pro obsah tuku a pojivových tkání. Pokud jsou tyto limity ve výrobní surovině překročeny, musí být deklarovaný údaj o obsahu masa v daném výrobku adekvátně snížen⁷. Vzhledem k tomu, že se při uvádění podílu masa ve výrobku za maso považuje jen svalovina, je množství skutečně použitého výrobního množství masa často vyšší. Do uváděného podílu masa není započítáván ani separát, neboli maso strojně oddělené od kostí⁸. Na tuto skutečnost by měl být brán zřetel při vytváření metody kvantifikace masa v masných výrobcích.

3. Metody používané při analýze masa

Metody analýzy masa a masných výrobků můžeme rozdělit do tří skupin. Přehled těchto metod je znázorněn na obr. 1.



Obr. 1. Přehled metod používaných při analýze masa

3.1. Metody založené na proteinové analýze

Imunologické metody

Imunologické metody jsou založené na specifické interakci mezi antigenem a protilátkou. Tyto metody jsou zaměřené na identifikaci druhově specifických proteinových komponent, a tudíž mohou být využity i pro stanovení konkrétního druhu masa v potravinách. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) je velice rozšířená technika používaná pro autentizaci složek potravin pro svou citlivost, specifitu a jednoduchost provedení⁹.

První analýzy věnující se kvalitativnímu určení druhů masa ve výrobcích byly provedeny užitím polyklonálních protilátek proti sérovým proteinům. V roce 1983 popsal Whittaker a spol.¹⁰ experiment, ve kterém bylo použito specifické antisérum pro detekci koňského, hovězího, skopového, klokaního, vepřového a velbloudího masa. Přítomnost dvou druhů masa byla prokázána při množství jednoho z nich nižším než 10 %. Sendvičová ELISA byla použita např. ve studii Martín a spol.¹¹ pro kvantifikaci definovaného množství koňského masa v masových smě-

sích, které nebyly termicky zpracovány. Při aplikaci této metody byla použita protilátka značená enzymem křenuvou peroxidasou (H_2O_2 -oxidoreduktasa, EC 1.11.1.7). Následná enzymová konverze substrátu prokázala jasné rozdíly při testování směsi mletého hovězího a vepřového masa, jež obsahovaly navíc různé množství koňského masa. V roce 1988 byla ve studii Berger a spol.¹² použita sendvičová ELISA s polyklonálními protilátkami pro detekci 1 % kuřecího a vepřového masa v tepelně opracovaných hovězích frankfurtských párcích. Testy byly založeny na interakci druhově specifických polyklonálních protilátek s termorezistentními antigeny. Používané polyklonální protilátky nabízejí řadu výhod, jako je rozpoznání směsi vícero antigenů, větší toleranci k malým změnám v povaze antigenu či polymeraci nebo mírné denaturaci. Z těchto důvodů jsou proto preferovanou volbou pro detekci denaturovaných bílkovin¹³. Využití polyklonálních protilátek však na druhou stranu ztěžuje proměnlivost jejich spekter během imunitní odpovědi, což může ovlivnit reprodukovatelnost výsledků. Další nevýhodou může být požadavek na rozsáhlé čisticí kroky při odstraňování

nespecifické reaktivity¹³.

Mimo polyklonální protilátky se dále pozornost výzkumných pracovišť soustředila na identifikaci masa pomocí monoklonálních protilátek, které na rozdíl od polyklonálních cílí pouze na jeden epitop. Metody využívající monoklonální protilátky mají obvykle velmi vysokou specifitu a reprodukovatelnost. Martín a spol.¹⁴ popsal kvalitativní a kvantitativní stanovení příměsí kuřecího masa v tepelně neopracované směsi hovězího a vepřového masa. Nevýhodou monoklonálních protilátek je náročná příprava a vyšší cena¹⁵.

Některé společnosti jako je Strategic Diagnostics, Inc. (USA), Tepnel (Spojené království), Neogen Corporation (USA), Eurofins (Německo) a ELISA Technologies, Inc. (USA) vyvinuly testovací soupravy, které detegují a identifikují přítomnost určitých živočišných druhů v syrovém i tepelně opracovaném mase, v masných výrobcích a krmivech. Tyto metody jsou široce používané, protože nevyužívají nákladná přístrojová zařízení, jako např. hmotnostní spektrometr nebo termocykler s fluorescenčním detektorem. Další výhodou je podstatné zkrácení doby potřebné pro analýzu a vhodnost jejich použití pro rutinní analýzy velkého počtu vzorků¹⁶. ELISA metodika má však i své limity. Získané výsledky mohou být ovlivněny různými parametry, jako je například obsah tuku ve vzorku, úroveň tepelného zpracování, původ svaloviny a stupeň zralosti masa^{9,17,18}.

Spektroskopické techniky

Spektroskopie je obor, který se zabývá studiem interakcí látek s elektromagnetickým zářením. V dnešní době existuje velké množství technik, které se využívají k identifikaci chemických sloučenin, stanovují jejich elementární složení či objasňují chemické struktury molekul.

Principem blízké infračervené spektroskopie (Near-Infrared Spectroscopy, NIRS) je absorpce infračerveného záření (800–2500 nm) při průchodu vzorkem, kdy dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekul v závislosti na změně dipólového momentu. Pomocí NIRS jsou vytvářena spektra typická pro svalové tkáně živočichů ve viditelné a blízké infračervené oblasti. Identifikace druhu masa je založena na analýze pigmentů a některých složek svalu, jako jsou např. intramuskulární tuk a mastné kyseliny. Naměřená data jsou následně vyhodnocována statistickou diskriminační analýzou¹⁹. Existuje řada prací, ve kterých byla pomocí blízké infračervené spektroskopie provedena identifikace syrových mas (např. hovězího, vepřového, kuřecího a jehněčího¹⁹), či rozlišení a kvantifikace jednotlivých druhů masa (např. ve směsi jehněčího a hovězího²⁰). Restaino a spol.²¹ použili NIRS spolu s chemometrií a postupnou lineární diskriminační analýzou k rozlišení druhu masa v paštikách. Nicméně 100% úspěšnost byla získána pouze při analýze výrobků obsahujících jenom hovězí, nebo vepřové maso. Paštiky obsahující směs obou druhů masa byly správně klasifikovány pouze v 72 % případů.

V práci publikované autory Sowoidnich a Kronfeldt²² byla pro rozlišení čerstvého hovězího, vepřového, kuřecí-

ho a krůtího masa aplikována Ramanova spektroskopie v provedení SERDS (*In-Situ* Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy). Pro vyhodnocení spektrálních dat získaných při dvou excitačních vlnových délkách byla použita analýza hlavních komponent, což umožnilo jasné rozlišení těchto živočišných druhů.

Střední infračervená oblast elektromagnetického spektra leží mezi 2500 a 25 000 nm, spektra obsahují převážně signály odpovídající normálním (fundamentálním) vibracím. Střední infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (Fourier Transform-Middle Infrared Spectrometry, FT-MIR) má velký potenciál ve forenzním vyšetřování falšování masných výrobků. S použitím této metody lze rozlišit 100% hovězí maso od směsi obsahujících hovězí maso a 20 % různých potenciálních nežádoucích příměsí, jako jsou např. srdce, předžaludky, ledviny či játra^{23,24}.

Chromatografické techniky

Chromatografické metody, např. plynová nebo kapalinová chromatografie, mohou být také použity k rozlišení živočišných druhů ve vzorcích masa. Karnosin a jeho methylované analogy ansein a balenin jsou dipeptidy přítomné ve vysokých koncentracích v kosterním svalstvu mnoha savců. Relativní koncentrace všech tří dipeptidů je charakteristická pro každý savčí druh a může být tudíž využita v kvalitativní analýze masa¹⁵. Tinbergen a Slump²⁵ ve svém výzkumu stanovili jednotlivé poměry anserinu (a) a karnosinu (k) charakteristické pro hovězí, vepřové a kuřecí maso. Poměr a/k u hovězího masa se pohybuje mezi 0,06–0,2, u vepřového masa mezi 0,02–0,1 a u kuřecího může dosahovat i poměru 2,2–5,5. Vysoký poměr a/k pro kuřecí maso se ukázal jako dostatečný k detekci této složky na úrovni 5 % u vařených výrobků z vepřového masa.

3.2. Proteomika a metabolomika

Proteomika je považována za účinný nástroj pro ověřování kvality potravin a pro odhalování jejich falšování²⁶. Jako biomarkery pro identifikaci původu masa se používají peptidové sekvence specifické pro určitý druh zvířat. Prostřednictvím metod identifikace peptidů hmotnostní spektrometrií lze rozlišit různé tkáně stejného zvířecího druhu¹⁸. Balize a spol.²⁷ byli schopni na základě identifikace druhově specifických peptidů odvozených od osteokalcinu detegovat v mase přítomnou kostní moučku a rozlišit její původ (hovězí nebo vepřová). Buckley a spol.²⁸ popisuje robustní metodu analýzy rodově specifických kolagenových peptidů s využitím hmotnostní spektrometrie s matriční asistovanou laserovou desorpce s průletovým analyzáto-rem MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) po předchozí purifikaci extraktu kapalinovou chromatografií. Analýzou kolagenu z 32 různých druhů savců bylo možné určit celkem 92 peptidových markerů, které by mohly být použity k identifikaci živočišných druhů ve zpracovaných potravinách a krmivech. Ortea a spol.²⁹ a Montowska

a Pospiech³⁰ při analýzách syrového i tepelně opracovaného masa a masných výrobků s využitím dvoudimenzionální elektroforézy (Two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE) zjistili mezidruhové rozdíly v 2-DE proteinových spektrech skotu, vepře, kuřete, krůty, kachny a husy. Některé z těchto proteinů byly stabilní v průběhu zrání masa a byly odolné proti tepelnému opracování. Část z těchto proteinů byla dokonce identifikována i v průmyslově zpracovaných produktech, jako jsou fermentované uzeniny.

Proteomický přístup má velký potenciál z hlediska robustnosti a spolehlivosti při analýze zpracovaného masa. Moderní hmotnostní spektrometry mají vysokou přesnost a citlivost, která významně přispívá k detekci malého množství kontaminujícího masa a/nebo jiných příměsí nedeklarovaných na etiketě masných výrobků. Nicméně existují i určitá omezení, jakými jsou vysoké náklady na moderní MS zařízení a nezbytnost vyhodnocování provedené analýzy kvalifikovanými pracovníky¹⁸.

Metabolomika je vědní disciplína, která se zabývá analýzou metabolomu, čili analýzou kompletního souboru metabolitů přítomných v daném čase v buňce, tkáni nebo jiném biologickém systému. Obecnou strategií metabolomických analytických metod používaných pro analýzu masa je identifikace maximálního počtu nízkomolekulárních sloučenin, které mohou být užitečné k rozlišení mezi jednotlivými vzorky. Desorpční ionizační technika přímé analýzy v reálném čase (Direct Analysis in Real Time, DART), která se používá ve spojení s průletovým analyzátozem TOF-MS, využívá k ionizaci složek vzorku plasmou excitované atomy helia a komponenty atmosféry. DART-MS ve spojení s multivariačními statistickými metodami umožňuje rychlé a elegantní ověření autenticity potravin³¹. V roce 2013 Čajka a spol.³² popsali novou strategii využívající postup DART-TOF-MS k rozlišení masa pocházejícího z kuřat vykrmovaných kuřecí kostní moučkou. Václavík a spol.³³ dále použili kombinaci DART-TOF-MS a chemometrie pro ověřování původu živočišných tuků (sádlo a hovězí lůj). Tyto techniky byly použity pro profilování triacylglycerolů a polárních sloučenin přítomných v tukových vzorcích a jejich směsí. Použitím DART-TOF-MS je možné detegovat přidání 10 % vepřového tuku k hovězímu a naopak. Gonzalez-Dominguez a spol.³⁴ publikovali studii, kde popisují rychlou a účinnou strategii k posouzení pravosti Jamóna ibérico, speciálního druhu španělské sušené šunky vyráběné z černých iberských prasat. K analýze byla použita tandemová hmotnostní spektrometrie ve spojení s kvadrupólovým průletovým analyzátozem. Za použití tohoto přístroje byly získány charakteristické intramuskulární profily tuku v závislosti na typu krmení. Jamón ibérico je typický produkt některých oblastí Španělska vyhlášený díky své vysoké kvalitě. Autentizace výrobků je otázkou vysokého ekonomického dopadu a tudíž není překvapivé, že použití metabolomických přístupů se v této oblasti rychle vyvíjí. To platí také pro jiné masné výrobky, které mají chráněné označení původu po celém světě¹⁸.

3.3. Metody založené na analýze DNA

Metody využívající analýzu DNA mají určité výhody oproti metodám založeným na proteinové analýze. K těmto především patří vyšší termostabilita molekuly DNA oproti proteinům, což z ní dělá vhodnější marker pro rozboru tepelně opracovaných výrobků³⁵. Díky přítomnosti konzervativních a variabilních oblastí je možné rozlišovat i velmi blízké živočišné druhy³⁶.

Hybridizační metody

Metody založené na hybridizaci DNA se sondou byly popsány v několika vědeckých publikacích^{37,38} zabývajících se zkoumáním neopracovaných a tepelně opracovaných masných výrobků. Kvalitativní studie využívající hybridizaci DNA pro detekci různých druhů masa používají relativně jednoduché postupy, kdy je genomová DNA extrahována, purifikována, imobilizována na nylonovou membránu a následně hybridizována se značenou sondou. Ebbehøj a spol.³⁹ popsali způsob kvantifikace příměsí vepřového masa ve směsi s hovězím pomocí hybridizační metody. Detekční limit byl stanoven přibližně na 0,1 % příměsí vepřového masa v tepelně neopracovaných směsích, zatímco pro tepelně ošetřené vzorky byl limit detekce stanoven přibližně na 0,5 % příměsí vepřového masa v hovězím.

Metody založené na polymerasové řetězové reakci

Analýza DNA je však nejčastěji prováděna prostřednictvím polymerasové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR), jež umožňuje cílené namnožení definovaných úseků DNA.

PCR-RFLP mitochondriální DNA. Vhodnou strategií pro identifikaci mnoha živočišných druhů je tzv. PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), neboli analýza polymorfismu délky restrikčních fragmentů amplifikovaných pomocí PCR. Tato technika využívá specifické enzymy – restrikční endonukleasy, které specificky štěpí DNA, pokud DNA obsahuje místo s přesně definovanou sekvencí nukleotidů. Mutace, delece, inserce a jednonukleotidové polymorfismy jsou často spojené se vznikem nebo naopak zrušením těchto restrikčních míst⁴⁰.

Jednou z prvních publikací popisujících využití metody PCR-RFLP k rozlišení živočišných druhů byla studie autorů Meyer a spol.⁴¹, ve které byl amplifikován fragment mitochondriálního genu cytochromoxidas b. Získaný amplikon byl následně štěpen restrikčními enzymy *RsaI*, *TaqI*, *AluI*, *HinfI*. Došlo k úspěšnému rozlišení prasete domácího a divokého, skotu, buvola, ovce, kozy, koně, kuřete a krůty. PCR-RFLP analýza mitochondriální 12S rRNA byla použita také pro identifikaci hovězího, buvolího, skopového a kozího masa ve studii Girish a spol.⁴². Zde byly analyzovány tepelně opracované vzorky, přičemž bylo zjištěno, že intenzita signálu se snižovala se zvyšující se teplotou vaření. Nejnížší signál byl získán u vzorku zahřívání na 120 °C po dobu 30 min.

Druhově specifické PCR primery. Tradiční PCR s jedním párem primerů umožňuje analýzu jedné sekven-

ce. Přidání násobného množství párů primerů do reakční směsi umožňuje analýzu více parametrů najednou, např. simultánní autentizaci hovězího, vepřového, kuřecího a koňského masa. Tato modifikace je nazývána multiplex PCR a je v současné době často používána při analýze potravin nejen k autentizaci jejich složek, ale také např. při detekci geneticky modifikovaných organismů. S ohledem na velký počet známých volně dostupných genomových sekvencí a softwarových programů je proces návrhu druhově specifických primerů v současné době poměrně jednoduchý a zavedení vhodné metodiky je tím do značné míry usnadněno⁴³. První multiplexní PCR pro identifikaci druhu masa byla publikována v roce 1999 autory Matsunaga a spol.⁴⁴, kteří provedli simultánní identifikaci šesti druhů masa (hovězího, vepřového, drůbežního, ovčího, koziho a koňského) s detekčním limitem 0,25 ng DNA. Pro analýzu byl zvolen gen pro mitochondriální cytochrom b. V experimentu byl použit jeden tzv. „forward“ primer společný všem testovaným živočišným druhům spolu s různými druhově specifickými reverzními primery. S cílem ověřit použitelnost protokolu i pro tepelně opracované masné výrobky byla multiplexní PCR úspěšně provedena se vzorky tepelně zpracovanými (120 °C). Další použití multiplexní PCR popsali např. Dalmasso a spol.⁴⁵. Ve své publikaci autoři navrhli druhově specifické primery komplementární k různým oblastem mitochondriální DNA (12S ribozomální RNA (rRNA), transferová RNA přenášející valin (tRNA-Val) a 16S rRNA). Metoda umožnila detegovat hovězí, drůbeží, rybí a vepřovou DNA ve směsi s detekčním limitem 0,004 % pro ryby a 0,002 % pro ostatní analyzované druhy. V multiplex uspořádání založeném na amplifikaci cytochromu b došlo k úspěšnému rozlišení masa 18 běžných druhů evropských savců (jezevec, kočka, kráva, pes, osel, liška, koza, morče, myš, ježek, kůň, člověk, prase, králik, potkan, jelen a ovce)⁴⁶. Také Hou a spol.⁴⁷ vyvinuli metodu pro simultánní detekci kuřecí, kachní a husí DNA ve výrobcích z hovězího, vepřového, skopového a křepelčího masa.

Nejčastěji využívané mitochondriální markery pro určení druhové specifiky zvířat jsou cytochrom b, 12S rRNA, 16S rRNA, tRNA-Val, ND5, ND2, a ATPasy 6/ATPasy 8. Nejčastěji používané jaderné markery jsou 18S rRNA, krátké rozptýlené jaderné elementy (short interspersed nuclear elements, SINE) a dlouhé rozptýlené jaderné elementy (long interspersed nuclear elements, LINE)².

Kvantitativní PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase (qPCR). Systém qPCR umožňuje sledování reakce v jejím průběhu – v reálném čase. Reakce je kombinována s emisí fluorescence, která je na začátku amplifikace přímo úměrná množství produktů PCR vznikajících v jednotlivých cyklech probíhající reakce⁴⁸. V průběhu PCR teoreticky vzrůstá množství ampikonů exponenciálně, tzn. že při každém dalším cyklu dojde ke zdvojnásobení jejich počtu. Proto je možné s využitím informací o počtu proběhlých cyklů reakce a porovnáním množství vzniklých produktů se standardem (vzorkem o známém množství DNA) vypočítat počáteční množství DNA přidané do reakce, což umožňuje provádět kvantitativní analýzy nukleo-

vých kyselin.

Za účelem identifikace a kvantifikace druhu masa obsaženého v potravinách bylo provedeno několik experimentů založených na qPCR s použitím interkalačního barviva SYBR® Green. Walker a spol.⁴⁹ použili qPCR pro amplifikaci krátkých rozptýlených prvků pro specifickou detekci a kvantifikaci DNA skotu, ovce, jelena, praseta a drůbeže. Koppel a spol.⁵⁰ navrhli heptaplex qPCR s využitím fluorescenčně značených hybridizačních sond pro simultánní identifikaci a kvantifikaci DNA skotu, praseta, kuřete, krůty, koně, ovce a kozy. V roce 2015 Iwobi a spol.⁵¹ úspěšně kvantifikovali poměr hovězího a vepřového v mletém masu. Duplex qPCR byla použita také pro simultánní stanovení obsahu srnčího a jeleního masa ve výrobcích ze zvěřiny⁵².

Celoevropská záležitost týkající se nehlášené přítomnosti koňského masa v produktech z hovězího masa v roce 2013 zdůraznila potřebu vypracování přesných analytických přístupů kvantitativní detekce falšování masa. Jedním z nich je metoda qPCR pro kvantifikaci koňské DNA v poměru k celkovému množství DNA savců v syrovém masu, která byla vyvinuta ve Spojeném království v rámci řešení projektu financovaného Ministerstvem pro životní prostředí, potraviny a venkov (Department for Environment, Food and Rural Affairs, DEFRA)⁵³. Komerční firmy věnují velkou pozornost identifikaci i jiných živočišných druhů. V současné době existuje velké množství kitů, které již obsahují všechny potřebné chemikálie a pozitivní kontroly, např. firma Pacific Image Electronics Co., Ltd. (Německo) vyvinula Chipron Meat 5.0 LCD Kit pro rychlou identifikaci 24 druhů masa.

Ostatní používané metody

LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) je technikou pro amplifikaci zvoleného úseku DNA, která se provádí za konstantní teploty (60–65 °C) při použití dvou nebo tří sad primerů a polymerasy s vysokou procesivitou. Pozitivní amplifikace bývá detegována srážecí reakcí nebo fluorescenčně za pomoci interkalačního barviva. Jedná se o rychlou, citlivou, specifickou a cenově dostupnou metodu, která je vhodná pro kvalitativní analýzy přítomnosti vybraného úseku DNA ve vzorku.

Technika byla použita pro rozlišení osmi druhů masa: hovězího, vepřového, koňského, koziho, ovčího, kuřecího, kachního a krůtího⁵⁴. Taktéž byl publikován protokol detekce vepřové DNA v halal potravinách. Analytická citlivost LAMP testu pro detekci vepřové DNA byla stanovena na 0,5 pg, přičemž výsledky nebyly ovlivněny teplotou opracování⁵⁵.

Digitální PCR (dPCR) využívá rozdělení analyzovaného vzorku do velkého počtu separátních reakčních „komor“, a to buď na čipu (dPCR) nebo prostřednictvím emulgační reakce digital droplet PCR (ddPCR), kterých bývá několik tisíc v amplifikační reakci. Přítomnost cílového úseku DNA je měřena přímo, což znamená, že není potřeba porovnání se standardní křivkou sestavenou z referenčního materiálu a výsledky jsou tudíž jen minimálně ovlivněny. Metoda dPCR je vhodná i pro kvantifi-

kaci velmi nízké koncentrace cílového úseku ve vysokém množství doprovodné nukleové kyseliny. Relativní kvantifikace bývá určena poměrem absolutních kvantifikací dvou cílových úseků. C. Floren a spol.⁵⁶ v roce 2015 popsali experiment pro identifikaci a kvantifikaci 14 druhů masa v tepelně upravených masných výrobcích metodou ddPCR s využitím jaderné DNA. Společnost ThermoFisher vyvinula metodu pro kvantifikaci koňské DNA ve směsi s hovězí.

PCR sekvenování může být též velkým přínosem pro identifikaci různých živočišných druhů. Informace získané tímto způsobem mohou být použity pro identifikaci masa ze zvířecích druhů, které jsou jinak v Evropě považovány za exotické (např. velryba, krokodýl, delfin a pštros emu)^{57,58}. Obvykle je sekvenován určitý úsek genomu, který je následně porovnán se známými sekvencemi v databázích. Ve srovnání s rutinními technikami je sekvenace dražší, pracnější a časově náročnější. Další nevýhodou je nemožnost oddělení smíšených vzorků a fakt, že ne vždy je možné ze vzorků izolovat DNA žádané kvality a kvantitativně pro sekvenaci^{59,60}.

4. Závěr

V dnešní době existuje mnoho metod, které umožňují kvalitativní určení živočišných druhů v potravinách. Tyto přístupy se liší ve své robustnosti, spolehlivosti, citlivosti, ceně analýzy či pořizovací ceně potřebného přístrojového vybavení. Techniky založené na analýze proteinů nejsou s ohledem na denaturaci bílkovin vhodné pro identifikaci druhů masa v tepelně opracovaných výrobcích. Tento problém obcházejí techniky založené na analýze DNA, která je teplotně stabilnější než proteiny. Detekce nedeklarovaného druhu masa v potravinách je dnes relativně jednoduchou záležitostí, avšak kvantifikace jednotlivých druhů masa ve směsích či masných výrobcích zůstává stále komplexní problematikou.

Tato práce vznikla z podpory grantu MZe (NAZV) QJ1530272: Komplexní strategie pro efektivní odhalování falšování potravin v řetězci (prvo)výroba – spotřebitel a také z finančních prostředků MZe RO0317.

Seznam použitých zkratk

| | |
|--------|--|
| DART | Direct Analysis in Real Time, desorpční ionizační technika přímé analýzy v reálném čase |
| DEFRA | Department for Environment, Food and Rural Affairs, Ministerstvo pro životní prostředí, potraviny a venkov |
| 2-DE | Two-dimensional gel electrophoresis, dvou-dimenzionální gelová elektroforéza |
| ELISA | Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, enzymový imunisorbentní test |
| FT-MIR | Fourier Transform-Middle Infrared Spectrometry, střední infračervená spektrometrie |

| | |
|-----------------|--|
| LAMP | s Fourierovou transformací Loop-Mediated Isothermal Amplification, izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou |
| LINE | long interspersed nuclear elements, dlouhé rozptýlené jaderné elementy |
| MALDI-TOF-MS/MS | Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie s maticí asistovanou laserovou desorpcí s průletovým analyzátozem |
| NIRS | Near-Infrared Spectroscopy, blízká infračervená spektroskopie |
| PCR | Polymerase Chain Reaction, polymerasová řetězová reakce |
| dPCR | digital Polymerase Chain Reaction, digitální polymerasová řetězová reakce |
| ddPCR | droplet digital Polymerase Chain Reaction, kapková digitální polymerasová řetězová reakce |
| qPCR | quantitative Polymerase Chain Reaction, kvantitativní polymerasová řetězová reakce |
| PCR-RFLP | Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism, analýza polymorfismu délky restričních fragmentů amplifikovaných pomocí PCR |
| SERDS | In-Situ Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy, diferenční Ramanova spektroskopie s posunutými excitačními zdroji |
| SINE | short interspersed nuclear elements, krátké rozptýlené jaderné elementy |

LITERATURA

- Ballin N. Z., Vogensen F. K., Karlsson A. H.: *Meat Sci.* 83, 165 (2009).
- Ali M. E., Razzak M. A., Hamid S. B. A.: *Food Anal. Method.* 7, 1933 (2014).
- <http://ekonomika.idnes.cz>, staženo 10. února 2017.
- Kulovaná E., <http://naschov.cz>, staženo 8. února 2017.
- Kolejková D., <http://www.szpi.gov.cz>, staženo 8. února 2017.
- Vyhláška č. 69/2016 Sb *o požadavcích na maso, masné výrobky, produkty rybolovu a akvakultury a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich*. Sbírka zákonů 2017, částka 26, str. 714.
- Katina J.: *Označování masných výrobků*. Sdružení českých spotřebitelů, Praha 2010.
- <http://www.bezpecnostpotravin.cz>, staženo 8. února 2017.
- Giovannacci I., Guizard C., Carlier M., Duval V., Martin J.-L., Demeulemester C.: *Int. J. Food Sci. Technol.* 39, 863 (2004).
- Whittaker R. G., Spencer T. L., Copland J. W.: *J. Sci. Food Agric.* 34, 1143 (1983).
- Martín R., Azcona J. I., García T., Hernández P. E.,

- Sanz B.: *Meat Sci.* 22, 143 (1998).
12. Berger R. G., Mageau R. P., Schwab B., Johnston R. W.: *J. - Assoc. Off. Anal. Chem.* 71, 406 (1988).
 13. Lane D., Harlow E. (ed.): *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1999.
 14. Martín R., Wardale R. J., Jones S. J., Hernández P. E., Patterson R. L. S.: *Meat Sci.* 30, 23 (1991).
 15. Kesmen Z., Yeti H., v knize: *Handbook of Meat and Meat Processing* (Hui Y. H., ed.), kap. 12. CRC Press, Boca Raton 2012.
 16. Asensio L., González I., García T., Martín R.: *Food Control* 19, 1 (2008).
 17. Nakyinsige K., Man Y. B., Sazili A. Q.: *Meat Sci.* 91, 207 (2012).
 18. Sentandreu M. A., Sentandreu E.: *Food Res. Int.* 60, 19 (2014).
 19. Cozzolino D., Murray I.: *LWT - Food Sci. Technol.* 37, 447 (2004).
 20. Gayo J., Hale S. A.: *J. Agric. Food. Chem.* 55, 585 (2007).
 21. Restaino E., Fassio A., Cozzolino D.: *CyTA - J. Food* 9, 210 (2011).
 22. Sowoidnich K., Kronfeldt H. D.: *Appl. Phys. B* 108, 975 (2012).
 23. Al-Jowder O., Defernez M., Kemsley E. K., Wilson R. H.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 3210 (1999).
 24. Al-Jowder O., Defernez M., Kemsley E. K., Wilson R. H.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 3210 (1999).
 25. Tinbergen B. J., Slump P.: *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* 161, 7 (1976).
 26. Rubert J., Zachariasova M., Hajslova J.: *Food Addit. Contam., Part A* 32, 1685 (2015).
 27. Balizs G., Weise C., Rozycki C., Opialla T., Sawada S., Zagon J., Lampen A.: *Anal. Chim. Acta* 693, 89 (2011).
 28. Buckley M., Collins M., Thomas-Oates J., Wilson J. C.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 3843 (2009).
 29. Ortea I., O'Connor G., Maquet A.: *J. Proteomics* 147, 212 (2016).
 30. Montowska M., Pospiech E.: *Food Chem.* 136, 1461 (2013).
 31. Škorpilová T., Pipek P., Rajhl A.: *Chem. Listy* 109, 129 (2015).
 32. Cajka T., Danhelova H., Zachariasova M., Riddelova K., Hajslova J.: *Metabolomics* 9, 545 (2013).
 33. Vaclavik L., Hrbek V., Cajka T., Rohlik B. A., Pipek P., Hajslova J.: *J. Agric. Food Chem.* 59, 5919 (2011).
 34. Gonzalez-Dominguez R., Garcia-Barrera T., Gomez-Ariza J. L.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26, 835 (2012).
 35. Lockley A. K., Bardsley R. G.: *Trends Food Sci. Technol.* 11, 67 (2000).
 36. Lenstra J. A., v knize: *Food Authenticity and Traceability* (LeesM., ed.), kap. 2, CRC Press, Boca Raton 2003.
 37. Buntjer J. B., Lamine A., Haagsma N., Lenstra J. A.: *J. Sci. Food Agric.* 79, 57 (1999).
 38. Hunt D. J., Parkes H. C., Lumley I. D.: *Food Chem.* 60, 437 (1997).
 39. Ebbehøj K. F., Thomsen P. D.: *Meat Sci.* 30, 221 (1991).
 40. Rasmussen H. B., v knize: *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*, (Magdeldin S., ed.), kap. 18, InTech, Rijeka 2012.
 41. Meyer R., Höfelein C., Lüthy J., Candrian U.: *J. AOAC Int.* 78, 1542 (1994).
 42. Girish P., Anjaneyulu A., Viswas K., Shivakumar B., Anand M., Patel M., Sharma B.: *Meat Sci.* 70, 107 (2005).
 43. Pereira F., Carneiro J., Amorim A.: *Recent Pat. DNA Gene Sequences* 2, 187 (2008).
 44. Matsunaga T., Chikuni K., Tanabe R., Muroya S., Shibata K., Yamada J., Shinmura Y.: *Meat Sci.* 51, 143 (1999).
 45. Dalmaso A., Fontanella E., Piatti P., Civera T., Rosati S., Bottero M. T.: *Mol. Cell. Probes* 18, 81 (2004).
 46. Tobe S. S., Linacre A. M. T.: *Electrophoresis* 29, 340 (2008).
 47. Hou B., Meng X. R., Zhang L. Y., Guo J. Y., Li S. W., Jin H.: *Meat Sci.* 101, 90 (2015).
 48. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P. S., Griffith R.: *Biotechnology (N Y)* 10, 413 (1992).
 49. Walker J. A., Hughes D. A., Anders B. A., Shewale J., Sinha S. K., Batzer M. A.: *Anal. Biochem.* 316, 259 (2003).
 50. Koppel R., Zimmerli F., Breitenmoser A.: *Eur. Food Res. Technol.* 230, 125 (2009).
 51. Iwobi A., Sebah D., Kraemer I., Loshier C., Fischer G., Busch U., Huber I.: *Food Chem.* 169, 305 (2015).
 52. Druml B., Hochegger R., Cichna-Markl M.: *Food Control* 57, 370 (2015).
 53. Nixon G. J., Wilkes T. M., Burns M. J.: *Anal. Methods* 7, 8590 (2015).
 54. Cho A. R., Dong H. J., Cho S.: *Korean J. Food Sci. An.* 34, 799 (2014).
 55. Ran G. Y., Ren L. Z., Han X. L., Liu X. X., Li Z., Pang D. X., Ouyang H. S., Tang X. C.: *Food Anal. Methods* 9, 565 (2016).
 56. Floren C., Wiedemann I., Brenig B., Schutz E., Beck J.: *Food Chem.* 173, 1054 (2015).
 57. Forrest A. R., Carnegie P. R.: *BioTechniques* 16, 24 (1994).
 58. Baker C.S., Cipriano F., Palumbi S. R.: *Mol. Ecol.* 5, 671 (1996).
 59. Farag M., Alagawany M., Abd El-Hack M., Tiwari R., Dhama K.: *Adv. Anim. Vet. Sci.* 3, 334 (2015).
 60. Lenstra J. A., Buntjer J. B., Janssen F. W.: *VetSci* 2, 1 (2001).

D. Akhatova^{a,b}, K. Zdeňková^a, M. Koncošová^a, and K. Demnerová^a (^a *Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague,* ^b *Food Research Institute Prague*): **The Current Methods Used for Disclosure of Meat and Meat Products Adulteration**

Meat and meat products belong to the group of the most expensive foods and, consequently, they are the most frequently counterfeited products. One of the most common ways to deceive the customers is to replace the meat

of high quality by low quality ones. Another problem is giving misleading information concerning the meat content on the product label. Nowadays, there is a possibility to use many methods for meat recognition. Our paper gives an overview on current methods used for meat analysis including examples of their use. They are divided according to the detected analyte, such as proteins, metabolites and DNA. Presently, the authentication of meat origin is a simple task. On the other hand, the quantification of varying origin of meat or meat products in a mixture still represents a complex and difficult issue.