

Molekuláris biológiai technikák az élelmiszer eredetvizsgálatban

Czeglédi Levente - Sziszkosz Nikolett - Kusza Szilvia

2013., korrigálva 2015., 2018.

Tartalomjegyzék

1. Genetikai alapok (Kusza Sz.)	4
2. Mendel törvényei (Kusza Sz.).....	8
2.1. Mendel törvényei.....	9
2.2. Öröklés menetek.....	10
3. Mutációk (Kusza Sz.).....	12
3.1. A mutációk hatása	13
3.2. Mutációk kialakulása.....	15
3.3. Mutációk megjelenése.....	15
4. Genom (Kusza Sz.)	15
4.1. Mérföldkövek a genomkutatásban	16
4.2. Humán genomkutatás főbb lépései	17
4.3. Állati genomprojektek.....	17
5. Biotechnika- biotechnológia (Kusza Sz.).....	19
5.1. Biotechnikai eljárások	19
5.2. Biotechnológiai eljárások.....	21
Különböző szülőktől nyert (kettőnél több ivarsejtből létrejött) teljes, vagy félembriók összeolvadása. Különböző fajtái vannak.....	21
1. Elsődleges.....	21
2. Másodlagos.....	21
6. Állati eredetű termékek nyomkövetése genetikai módszerekkel (faj- és fajtaazonosítás) (Kusza Sz.)	25
6.1. Genetikai módszerek élelmiszertermékek faj/fajtaazonosításának szolgálatában	26
7. Összegzés (Kusza Sz.).....	40
8. Felhasznált irodalom (Kusza Sz.).....	42
9. Egyéb DNS alapú módszerek pontmutációk vizsgálatához, eltérő szekvenciák azonosításához (Czeglédi L.)	47
9.1. PCR heteroduplex analízis	47
9.2. PCR hőmérséklet gradiens gélelektroforézis (TGGE) és denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE)	48
10. Proteomikai módszerek alkalmazási lehetőségei az élelmiszerek eredetének igazolásában (Czeglédi L.).....	50
10.1. A proteomika, mint tudományterület	50
10.2. Leggyakoribb proteomikai metodikák rövid ismertetése.....	51
10.2.1. Egy- és kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (1D PAGE, 2D PAGE) a proteomikában	52
10.2.2. A folyadékromatográfia alkalmazása a proteomikában	53
10.2.3. Fehérjeazonosítási módszerek.....	55
10.3. Élelmiszerekből és élelmiszeripari alapanyagokból történő fajazonosítási lehetőségek fehérjealapú vizsgálati módszerek alkalmazásával – módszerek alkalmazhatósága és korlátaik.....	56
10.3.1. Immunoassay-k alkalmazása fajazonosításra.....	57
10.3.2. Gélelektroforézis alkalmazása fajazonosításra.....	58
10.3.3. Folyadékromatográfia alkalmazása fajazonosításra.....	62
11. Felhasznált irodalom (Czeglédi L.).....	62
12. Zsírok, zsírsavak és meghatározásuk (Sziszkosz N.).....	64

12.1. A zsírok, zsírsavak általános jellemzése	64
12.2. Kromatográfia	65
13. Állati szövetek, termékek zsírsavösszetétele (Sziszkosz N.)	66
13.1. A zsírsavak előfordulása a különböző állati eredetű termékekben	67
14. Eredetigazolási lehetőségek zsírsavvizsgálatok alapján (Sziszkosz N.)	68
14.1. A hamisítások kiszűrése gázkromatográfias eljárásokkal	69
14.2. Tenyésztést, hizlalást befolyásoló tényezők hatása a zsírsavtartalomra	71
14.3. A halolajok eredetigazolása.....	73
14.4. Tenyésztett és vadon élő halak elkülönítése	75
14.5. Bio és hagyományos termékek elkülönítése	76
14.6. Növényi olajok meghatározása	77
15. Felhasznált irodalom (Sziszkosz N.).....	78

1. Genetikai alapok

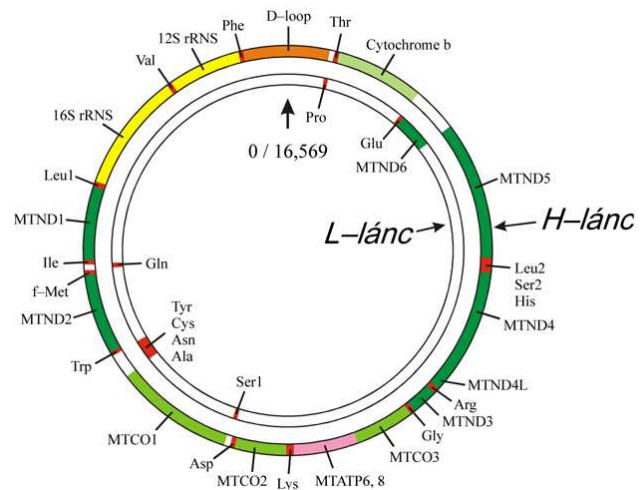
A genetika szó kapcsán többekben felmerülhet a kérdés: Mivel foglalkozik pontosan a genetika? Hogyan zajlik a tulajdonságok öröklődése? Egy-egy tulajdonság milyen valószínűséggel öröklődik? Mi mozgatja ezt a nagyon pontosan, precízen működő egységet? Mi az a genetikai anyag? Hogyan alakulnak ki a tulajdonságok? És még sorolhatnám a kérdéseket.

Röviden fogalmazva a klasszikus genetika (mendeli genetika) az a tudomány, mely a génekkel, az öröklődéssel foglalkozik az egyedek szintjén. Azonban az előbb felvázolt kérdések megválaszolásához ma már a klasszikus genetikán túl több tudomány együttes ismerethalmaza szükséges. Ilyen a sejt genetika, molekuláris genetika, orvosi genetika, kvantitatív genetika, populációgenetika, ökológiai genetika stb.

Ha szeretnénk a genetikával kapcsolatos kérdéseinkre választ kapni, illetve megérteni a napjainkban oly gyakran a különböző médiák által bemutatott genetikai vizsgálatok eredményeit, elkerülhetetlen, hogy néhány alapfogalommal, folyamattal tisztában legyünk.

A *dezoxiribonukleinsav (DNS)* az örökítőanyag, mely a genetikai információt magában hordozza. A nukleotidok szerkezeti elemei: a négyféle, nitrogéntartalmú bázis egyike (adenin, guanin, timin, citozin); egy öt szénatomos cukor, a dezoxiribóz és foszforsav. A bázisok sorrendjében vannak kódolva a genetikai információk, melyekből a fehérjék épülnek fel RNS-ek közreműködésével. Vázát két cukor- és foszfátcsoportokból felépülő lánc alkotja, mely kettős spirál formájában ellentétes lefutásban tekeredik egymás köré. A két polinukleotidlánc távolsága állandó. Minden cukormolekulához egy bázis kapcsolódik, és a két láncot a bázisok között hidrogénkötések tartják össze. Adeninnel szemben mindig timin kettős hidrogénkötéssel (A=T), citozinnal szemben pedig guanin (G=C) hármasszoros hidrogénkötéssel állhat. A DNS molekulák közti különbséget a nukleotidok kapcsolódásában bekövetkezett változás jelenti. A DNS kettős hélix szerkezeti modelljét James Watson és Francis Crick genetikusok hozták létre, Maurice Wilkins biofizikus röntgen diffrakciós vizsgálati eredményeinek felhasználásával. 1953-ban. Crick és Watson DNS modellje a Londoni Nemzeti Tudományos Múzeumban tekinthető meg. Sokak szerint ez a felfedezés a 20. század legnagyobb tudományos eredménye és a molekuláris biológiai kutatások első mérföldköve. Minden emberi sejtmag kb 6×10^9 DNS-bázispárt tartalmaz. A DNS-lánc hossza kb. 2 m, de maga körül úgy fel van csavarodva, hogy belefér egy néhány mikrométeres sejtmagba.

A **mitokondriális DNS (mtDNS)** a mitokondriumok (sejt ATP-t termelő erőműve) saját cirkuláris szerkezeti felépítésű DNS-e. Emlősökben kb. 17 000 bázispárt tartalmaz. Állatokban általában 13-14 elektrontranszportban résztvevő fehérjét, 22 transfer RNS-t, 2 riboszomális RNS-t kódol. A mitokondrium fehérjét kb. 3000 gén kódolja, melyből mindössze 37 található az mtDNS-ben.



A mitokondriális mutációk anyai ágon öröklődnek, és csak akkor adódnak tovább, ha a mutáció a megtermékenyítés előtt lévő oocitában vagy a kromoszomális DNS- mitokondriális fehérjét kódoló szakaszaiban következik be. A mtDNS mutációs rátája tízszer nagyobb, mint a nukleáris DNS-é, ezért különösen alkalmas genetikai diverzitás vizsgálatok markereként.

Egyes vírusok esetén azonban az örökítőanyagot egy másik molekula jelenti, a **ribonukleinsav (RNS)**. Szerkezeti elemei hasonlóak, mint a DNS-nek, azonban az öt szénatomos cukor itt a ribóz, és a négyféle, nitrogéntartalmú bázis közül is timin helyett uracil van (adenin, guanin, uracil, citozin). A ribonukleinsavak molekuláiban a nukleotidegységek egyetlen polinukleotid-lánccá kapcsolódnak össze. A molekula gerincét alkotó ribóz-foszfát-láncon egymástól egyenlő távolságban sorakoznak a bázisok. Az RNS-molekulák közötti különbséget itt is a nukleotidok kapcsolódási sorrendje, a bázissorrend jelenti. A szabadon álló bázisok miatt az RNS-molekulák meglehetősen reakcióképesek, kémiai szerkezetük könnyen módosul. Az egyfonalas RNS-molekulákban a polinukleotid-láncon belül kialakulhatnak bázispárok, ha a lánc önmaga mellett visszahajlik. Az adenin és az uracil között kettő, a guanin és a citozin között 3 hidrogénkötés jöhet létre. Legfőbb RNS típusok:

- hírvivő RNS (mRNS) <5%

hosszúsága, tömege változó

nehéz izolálni, legkisebb mennyiségben fordul elő a sejtekben

- riboszomális RNS (rRNS) < 80%

3 típusa van (23S, 16S, 5S)

nem túl stabil

riboszómák felépítésében fontos

- transfer RNS (tRNS) ~15%

legkisebb RNS molekula, 75-80 nukleotid egység

legalább 61 formája van

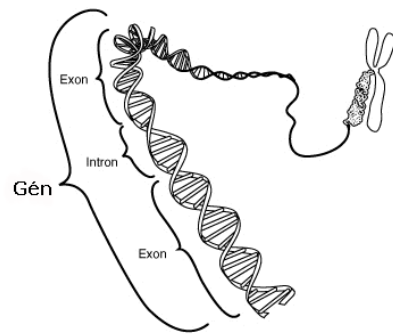
- számos RNS csoport pl kis sejtmagi RNS (snRNP)

A molekuláris biológia alap törvényszerűségét a genetikai információáramlás irányáról **centrális dogmának** nevezzük. A retrovírusok kivételével az információáramlás a transzkripció és transzláció folyamatát magába foglalva a következő:

DNS → mRNS → fehérje → tulajdonság

A DNS egy szakaszát mely egy adott fehérje aminosav sorrendjét kódolja és ezáltal egy tulajdonságot meghatároz **struktur génnek** nevezzük.

Génekkal szembeni követelmény a többszöröződés, replikációs képesség; változékonyság megtartása; az adott fajra, fajtára jellemző alakot, szerkezetet határozzon és tartson meg az utódokban.



A gének fajtái:

- Fehérje kódoló gének

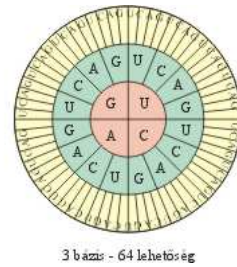
Egyéb gének:

- RNS-t kódoló gének (siRNS-small interfering RNS
snRNS-small nuclear RNS, ribozimok)
- Át nem írt gének, szabályozó szekvenciák, szegregátor gének, replikáló gének

A gének szerkezeti felépítésében megkülönböztetjük a kódoló régiót és a szabályozó régiót. A kódoló régió tartalmazza az exonokat, melyek nem vágódnak ki az mRNS-ből, és így a gén által meghatározott fehérje egységeit kódolják. Az intron a gén által meghatározott fehérje egy részét sem kódolja, mivel az mRNS-ből kivágódik. Az intronok száma és mérete igen változó a fajok között, emlősökben gyakran nagyobbak, mint az exonok. Ezek teszik lehetővé az **alternatív splicing** jelenségét is, mely során az intronok különbözőképpen vágódnak ki az exonok közül és így különböző szekvenciájú mRNS-eket és funkciójú fehérjéket hoznak létre a különböző szövetekben.

A **genetikai kód** az mRNS által szállított bázisok sorrendjét és a fehérjék aminosavait tartalmazó univerzális jelrendszer. Minden élőlényben ugyanaz a bázishármas ugyanazt az aminosavat jelenti. Az mRNS bázishármasait **kodonoknak** nevezzük. A kódszótárból kiolvasható, hogy az aminosavak jelentős részét nem egy, hanem több bázishármas is kódolja.

Egy kód négy betűt (A, G, C, U) tartalmaz, azonban a fehérjeszintézis során 20-féle aminosav épülhet be a polipeptid-láncba. Ha egy bázis jelentene egy aminosavat, akkor csak 4-féle

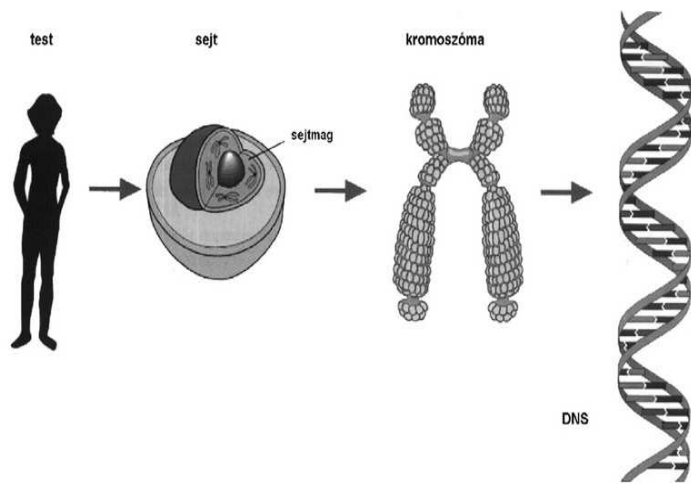


aminosav beépítésére lenne lehetőség. Ha két bázis jelölne egy aminosavat, a különböző lehetőségek száma 16 lenne. A három bázisból álló jel már 64-féle lehetőséget jelent, de van 3 stop kodon (UAA, UAG, UGA).

Az mRNS bázishármasa (kodon)					
1. bázis	2. bázis				3. bázis
	U	C	A	G	
U	fenilalanin	szerin	tirozin	cisztein	U
	fenilalanin	szerin	tirozin	cisztein	C
	leucin	szerin	STOP	STOP	A
	leucin	szerin	STOP	triptofán	G
C	leucin	prolin	hisztidin	arginin	U
	leucin	prolin	hisztidin	arginin	C
	leucin	prolin	glutamin	arginin	A
	leucin	prolin	glutamin	arginin	G
A	izoleucin	treonin	aszparagin	szerin	U
	izoleucin	treonin	aszparagin	szerin	C
	izoleucin	treonin	lizin	arginin	A
	metionin lánckezdő	treonin	lizin	arginin	G
G	valin	alanin	aszparaginsav	glicin	U
	valin	alanin	aszparaginsav	glicin	C
	valin	alanin	glutaminsav	glicin	A
	valin	alanin	glutaminsav	glicin	G

A DNS megkettőződése után létrejött két molekulát tartalmazó többszörösen összecsavarodott makromolekula a **kromoszóma**. Egy kromoszóma két azonos géneket, allélokot hordozó kromatidából áll, amely a két DNS molekulának felel meg.

Egy szervezet sematikus ábrázolása a következő:



2. Mendel törvényei

Az öröklődés, mely során a tulajdonságok a szülő nemzedékről az utódokba „kerülnek”, régóta ismert jelenség, azonban sokáig nem ismerték a pontos menetét. A 19.század elejéig azt gondolták, hogy a szülők minden tulajdonságainak az átlaga öröklődik az utódokra. Ez a hipotézis egyes tulajdonságok esetén így is van, azonban sok egyéb tényező is befolyásolja.

A genetika alapjait, törvényszerűségeit egy német szerzetes, Johann Gregor Mendel (1822-1884) fektette le. Mendel egy Brno-i ágoston-rendi kolostorban élt. A pappá szentelése utáni első miséjén annyira izgult, hogy nem tudta elvégezni a ceremóniát, ezért rendfőnöke a tanári pálya felé irányította. Azonban túlzott izgalma miatt az sem neki valónak bizonyult, így természetrajzi kutatás elvégzésére kérték fel a kolostor kertjében. Érdeklődése ekkor fordult az öröklődés felé. Kutatásai tárgya a veteményborsó lett, melyet könnyen lehet önbeporzásra készíteni, így gyorsan állíthatóak elő beltenyésztett, úgy nevezett tiszta származéksorok, kis területen sok utód keletkezik. Vizsgálataihoz Mendel elsősorban olyan tulajdonságokat választott melyeknek két változata létezik, a virág színe (bibor-fehér), a mag héja (ráncos-sima), a mag színe (zöld-sárga), hüvely alakja (egyenletesen domború-vagy befűződött), hüvely színe (zöld-sárga), növény magassága



(magas-alacsony), virág elhelyezkedése (oldalágon- csúcson) stb. Mindig tiszta származéksorokat keresztezett és feljegyezte az utódok között melyik típus milyen számban fordul elő. Munkáját, eredményeit halála után ismerték el.

Mendel törvényeinek megismerése előtt tisztázzunk néhány alapfogalmat:

Az **allél** (génváltozat) a kromoszóma egy adott szakaszán (**lókuszán**) elhelyezkedő gén eltérő bázissorrendű, ennek következtében eltérő tulajdonságot kialakító változata. Általában egy génnek kétféle allélja van, de vannak olyan gének melyeknek több változata alakult ki. Például: emberi AB0 vércsoport.

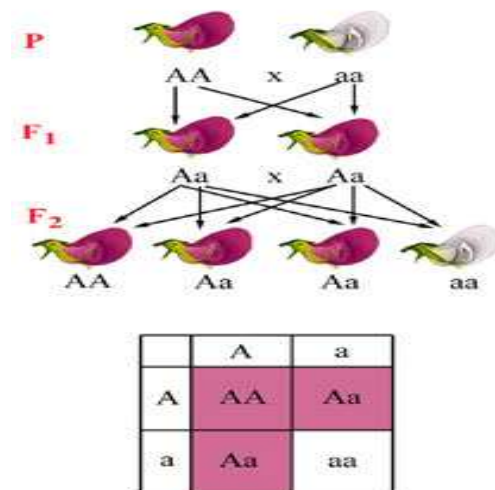
A **genotípus** egy szervezet genetikai felépítése, allélok összessége. A **fenotípus** az egyed kromoszómáin hordozott allélek jelenléte alapján kialakuló tulajdonságok összessége, azaz a megjelenési forma. A fenotípus a genetikai meghatározottságtól és a környezeti hatásoktól együttesen függ. A genotípus megszabja a fenotípust azonban a fenotípus nem csak a genotípustól függ! A genetika központi kérdése, hogy milyen módon alakítja ki a genotípus a fenotípust, és ezt milyen egyéb tényezők befolyásolhatják még?

Amikor egy sejt minden kromoszómából egy kópiát tartalmaz **haploid** sejtről beszélünk. Ilyenek az ivarsejtek. Míg amikor a sejteknek két homológ kromoszómakészletük van, (egyik apai, másik anyai eredetű) **diploid** sejteknek nevezzük. Ilyen a legtöbb testi sejt.

A **homozigóta** egyedek sejtjei diploidok és a homológ kromoszómák egy adott lókuszán ugyanazzal az alléllal rendelkeznek. Genotípusuk ugyanazokat az allélokat tartalmazza, azaz: AA vagy aa. A **heterozigóta** egyedek sejtjei diploidok azonban a homológ kromoszómák egy adott lókuszán eltérő alléllal rendelkeznek. Genotípusuk: Aa.

2.1. Mendel törvényei

Mendel borsókisérleteiben elsőként a kétféle változat homozigótáit keresztezte, majd az így kapott utódokat (heterozigóták) egymás között. Felfedezte, hogy minden tulajdonságot az egyedekben két, meglehetősen stabil „faktor” (ma már tudjuk, hogy ez a DNS) határoz meg, míg az ivarsejtekben minden tulajdonságra nézve csak egy, testi sejtekben kettő „faktor” található



(ma: haploid-diploid). Azt is észrevette, hogy a „faktorok” nem elegyednek egymással, hanem véletlenszerűen kombinálódva jutnak az utódokba, illetve ha két különböző „faktor” van jelen, akkor az egyik domináns hatású lehet a másikkal szemben. Ezen kísérleti eredményeiből születtek meg törvényei:

I. Uniformitás-törvénye

Két homozigóta (AA és aa) szülő keresztezésével az F1 utódnemzedék minden egyede egyforma geno (Aa)- és fenotípusú (lila színű).

II. Hasadás (szegregáció)-törvénye

Ha az előző kísérletből származó F1 utódnemzedék egyedeit keresztezzük, akkor az F2 utódnemzedékben megjelennek a nagyszülők mind geno- (AA, aa) mind fenotípusban (bordó és fehér virágú).

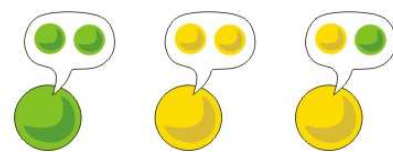
III. Szabad kombinálódás / a tulajdonságok független öröklődésének törvénye

Különböző tulajdonságok egymástól függetlenül öröklődnek.

IV. Gaméták tisztaságának törvénye

Egy tulajdonságért felelős gén allélpárjának két tagja elválik egymástól az ivarsejtképzés, azaz a meiózis során.

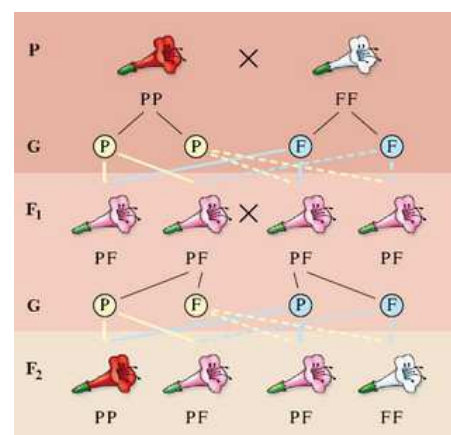
Ezek a törvényszerűségek azonban csak akkor igazak, ha a vizsgált tulajdonságokat meghatározó gének nem ugyanazon a kromoszómán, egymás közelében vannak (akkor kapcsolt öröklődés).



2.2. Öröklés menetek

Egy-egy gén kifejeződése többféle lehet. A **domináns gén** olyan tulajdonságért felel, amely homo- és heterozigóta formában is megjelenik a fenotípusban. Ezzel szemben a **recesszív gén** csak homozigóta formában jelenik meg a fenotípusban.

A **domináns-recesszív öröklésmenet** esetén egy fenotípushoz (sárga) két genotípus (AA, Aa) tartozhat, mivel a domináns allél elnyomja a recesszív allél kifejeződését.



Az *intermedier / köztes öröklésment* esetén nem a borsónál, hanem más növényeknél a különböző genotípusok (PP,(piros) FF,(fehér), egy köztes fenotípust (rózsaszín) alakítanak ki. Egyik tulajdonság sem meghatározó (domináns) nem nyomja el a másikat.

Hardy-Weinberg egyensúly

Ha nézzük egy lókuszon levő két allél (*A* és *a*) gyakoriságát (*A* allél gyakorisága *p*; *a* allél gyakorisága *q*) két egymást követő generációban, azt kapjuk, hogy az első generációban a két allél relatív gyakoriságának összege 1.

Ha két *A* allélt hordozó egyed párosodik, akkor *AA* genotípusú zigóta lesz. Ennek valószínűsége: $p \times p = p^2$. Ez igaz ha két *a* allélt hordozó egyed találkozik. Ennek valószínűsége q^2 . Azonban *Aa* genotípusú egyedek létrejöhetnek úgy, hogy *A* allélt hordozó hímivarsejt találkozik *a* allélt hordozó petesejtrel, aminek valószínűsége $p \times q$, illetve fordítva, aminek valószínűsége $q \times p$. A két valószínűség összege $2pq$.

	p (A)	q (a)
p (A)	p^2 (AA)	pq (Aa)
q (a)	pq (Aa)	q^2 (aa)

Az egyes genotípusok létrejöttének valószínűsége és arányuk a populációban a következő:

$$p^2_{AA} + 2pq_{Aa} + q^2_{aa} = 1 \text{ azaz } (p + q)^2 = 1$$

A gamétákban az *A* és *a* allélok gyakorisága ebben a generációban így alakul:

A allélt tartalmaz minden *AA* genotípusú egyed gamétája, ennek előfordulási valószínűsége p^2 , és *A* allélt hordoz az *Aa* genotípusú egyedek gamétáinak fele, azaz $2pq / 2 = pq$.

Az *A* allélt hordozó gaméták arányának összegét osztjuk az összes gaméta gyakoriságával:

$$\frac{p^2 + pq}{p^2 + 2pq + q^2} = p^2 + pq = p^2 + p(1-p) = p$$

Így azt kapjuk, hogy egy ideális populációban, aminek minden egyede azonos valószínűséggel párosodhat más egyedekkel, az allélgyakoriságok nemzedékről nemzedékre változatlanok maradnak. Ezt az összefüggést egymástól függetlenül két kutató bizonyította,

így nevük után **Hardy-Weinberg arány**nak, vagy **Hardy-Weinberg egyensúly**nak (HWE) nevezzük.

De a HWE megváltozik

- Mutáció hatására
- migráció hatására
- szelekció hatására
- Ha a populáció kicsi → génsodródás
- Nem véletlenszerű párosodás (beltenyésztés)

3. Mutációk

Egy faj egyedeinek diverzitása, sokrétősége biztosítja annak a változó körülmények közötti fennmaradását illetve az evolúció alapját képezi. A diverzitást több tényező befolyásolhatja. Növelheti a rekombináció, migráció, mutáció jelensége, míg csökkentheti a szelekció, genetikai drift. Ezen tényezők közül csupán a mutációról beszélünk részletesen ebben a fejezetben. Többféle mutáció létezik kialakulása helye, oka; hatása; időbelisége alapján.

A változás létrejöhet kromoszóma szerkezetében (**kromoszóma mutáció**) vagy számában (**genom mutáció**) illetve a DNS-ben, bázispárban (**gén vagy pont mutáció**). Ez első kettőt nagy mutációnak míg génmutációt kis mutációként kezeljük.

A kromoszóma mutáció típusai:

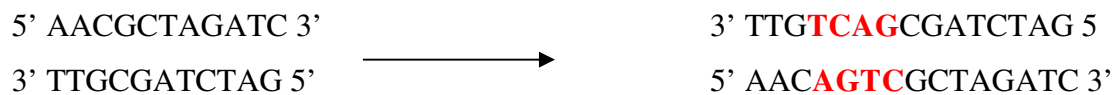
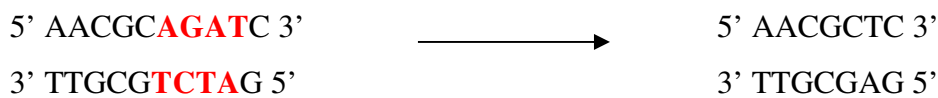
- Kromozómatörések: kiesés (deléción), megfordulás (inverzió), régió megkettőződése (duplikáció); két nem homológ kromoszóma közötti részek áthelyeződése (transzlokáció);
- Kromozómaszám változás: egy kromozómával bekövetkező változás (aneuploidia), kromozómaszerelvény-sokszorozódás (poliploidia)

Gén vagy pont mutáció (SNP) típusai

egy bázispár megváltozása

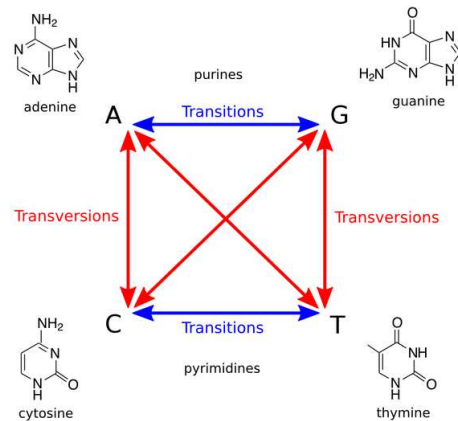


egy bázispár beékelődése vagy elvesztése



Tranzíció: purin csere purinra (A, G) vagy pirimidin csere pirimidinre (C, T). Ez a természetben gyakorabban előforduló

Tranzverzión: pirimidin csere purinra vagy purin csere pirimidinre



3.1. A mutációk hatása

1. Intergénikus

2. Intragénikus

- Kódoló régió (exon):

csendes mutáció: A triplet utolsó bázisa változik, de ugyanazt az aminosavat kódolja.

AUU (Ile)

AUC (Ile)

semleges mutáció: A kódolt aminosav hasonló jellegűre változik, de a fehérje szerkezete és funkciója nem biztos változik.

AAA (Lys *bázikus*) AGA (Arg *bázikus*)

misszensz mutáció: Egy másik nem funkcióképes aminosav kódolódik.

GAG (Glu *savas*) GTG (Val *semleges*)

nonszensz mutáció: STOP kód keletkezik.

UAC (Tyr) UAG (Stop)

kereltolódási mutáció: Egy vagy két bázis kiesése vagy hozzáadódása miatt elcsúszik a leolvasási keret.



- Nem-kódoló régió (intron)

Nincs aminosav csere, ez is *csendes* mutáció

- Promoter régiót érintő mutációk

Génexpresszióban következik be változás

A közeli rokon fajok közti különbségek döntő részét ezek okozhatják (csimpánz-ember)

Up promoter mutációk konszenzusokban az eredeti promoter erősségét növelik, transzkripció mértékét növeli

Down promoter mutációk konszenzusokban az eredeti promoter erősségét csökkentik, transzkripció mértékét csökkenti

A **mutációs ráta** mutációk bekövetkezésének esélyét mutatja, amit befolyásol a gén vagy a génen belüli mutációs hely természete, a genetikai háttér, fejlődési stádium stb.

Általában kicsi, valószínűsége: 10^{-9} /nukleotid/DNS másolás

RNS vírusoknál nagyobb: 10^{-4} /nukleotid/DNS másolás

3.2. Mutációk kialakulása

- spontán

A biológiai / kémiai folyamatokban következik be változás, de pontos kiváltó okát nem ismerjük

Pl. replikáció során

- indukált

A mutációt külső tényező okozza (mutagén)

Kémiai: akridinestékek, nitrogénmustárok, pörkanyagok

Fizikai: elektromágneses sugárzások: röntgen, UV, részecskesugárzások

3.3. Mutációk megjelenése

- Ivarsejtek mutációja (petesejt, spermium)

Ekkor a mutáció átöröklődik a következő generációra.

- Testi sejtek

A mutáció nem öröklődik a következő generációra

4. Genom

A **genom** az élőlény egyetlen sejtjében található teljes genetikai információ összessége, azaz a szervezetben található DNS-ben (vagy az RNS vírusoknál RNS-ben) tárolt örökölhető információ.

A genomika egy viszonylag új tudományág, melyről az első genomok szekvenciáinak meghatározása óta beszélhetünk. Pontos fogalmát illetően nincs egységes álláspont az egyes meghatározók között, de abban mindenki egyetért, hogy a genom szekvenciájának meghatározásával kezdődik és az annak elemzéséből származó eredményeket használja. A **genomika** tudománya a genomok szerkezetét, a gének eloszlását, számát, méretét, a gének

nem tekinthető DNS-szakaszok szerkezetét, elhelyezkedését és biológiai szerepét vizsgálja bioinformatikai eszközök segítségével. Ezzel szemben a **genetika** az egyes tulajdonságok öröklésével, egyes gének szerkezetével és működésével foglalkozik. Mindkét tudomány eredményei szükségesek az állatnemesítés során.

A genom ismeretének fontossága:

- Termelési tulajdonságokat befolyásoló gének azonosítása
- Embriológiai és evolúciós kutatások alapját képezik

A genom mérete változó az egyes fajokban:

szervezet	Kromoszómaszám	Genom mérete (milló bp)
Ember (Homo sapiens)	46 (23 pár)	3 400
Sertés (Sus scrofa)	38 (19 pár)	3 100
Szarvasmarha (Bos taurus)	60 (30 pár)	3 650
Tyúk (Gallus gallus)	78 (39 pár)	1 200
Ló (Equus caballus)	64 (32 pár)	3 310
Juh (Ovis aries)	54 (27 pár)	3 250

4.1. Mérföldkövek a genomkutatásban

1995: *Haemophilus influenzae* genom (1.8 Mb); Science 269, 496-512.

Az első szabadon élő szervezet (egy baktérium) teljes genomja

1996: *Saccharomyces cerevisiae* genom (12.1 Mb); Science 274, 546-67.

Az első teljes eukarióta genom (élesztő)

1998: *Caenorhabditis elegans* genom (97 Mb); Science 282, 2012-18.

Az első többsejtű szervezet teljes genomja

2000: *D. melanogaster* genom (180Mb); Science 287, 2185-2195.

Első szekvencia publikálása teljes genomra irányuló szekvenálással

2001: A humán genom (első „durva” szekvencia) (3Gb); Nature 409, 860-921; Science 291, 1304-51.

~ 94%-a teljes genomnak

2003: *A teljes humán genom*

A projekt 1990-ben indult el, a világ több országában. Közel hárommilliárd bázispár szekvenciát határoztak meg és ezek ismeretében a következő cél a genetikai információk értelmezése, a gének minél pontosabb funkcióinak megismerése.

Érdekes tény, hogy két ember közötti átlagos eltérés 0,001%, az ember és csimpánz között: 1,5% míg az ember és egér között: 10%.

4.2. Humán genomkutatás főbb lépései

- 1953 DNS dupla hélix szerkezet (Watson és Crick)
- 1972 Rekombináns DNS (Berg, et al.)
- 1977 DNS szekvenálás (Maxam és Gilbert, és Sanger)
- 1980 Fizikai térképek készítése RFLP-vel (Bostein, Davis, White)
- 1985 PCR (Mullis)
- 1986 Automata DNS szekvenálók megjelenése (Hood és Smith)
- 1987 YACs (Burke, Olson, and Carle)
 - Fluoreszkáló lánc befejező dideoxinukleotidok (DuPont)
 - DNS szekvenálók kereskedelmi forgalomban (Applied Biosystems)
- 1991 Expressed Sequence Tag-expresszált szekvencia szakasz (EST, Venter et al.)
- 1992 Bakteriális mesterséges kromoszóma (BACs, Shizuya et al.)
- 1997 Kapilláris szekvenáló berendezések (Molecular Dynamics)
- 2000 Új generációs szekvenáló berendezések

4.3. Állati genomprojektek

Tyúk - 2004

2003. márciusban indult a projekt, egy nemzetközi konzorcium keretében.

Az első feltérképezett madár az Ázsiában őshonos bankivatyúk (*Gallus gallus*).

kakas



tyúkok



(forrás: <http://hu.wikipedia.org/wiki/Bankivaty%C3%BAk>)

Szarvasmarha – 2004

2003. decemberben indult a projekt, egy héttagú nemzetközi konzorcium keretében (60 millió \$).

Az először egy hereford tehén – Dominette lett feltérképezve. Majd további fajták bevonása: holstein, angus, jersey, limousin, norvég vörös, brahman

Juh –

Az egyik legnagyobb konzorcium keretében történik a projekt (45tag; 45 millió \$)

Több mint 450 mikroszatellit ismert azonban ezek száma folyamatosan nő.

Vizsgálják a gyapjú tulajdonságokat, karkasz összetételt, parazitákkal szembeni rezisztenciát, növekedési tulajdonságokat, egygénes defetusokat

Sertés –

Nemzetközi konzorcium (40 tag), 60 millió \$

Több mint 650 gén és 1500 marker ismert (>90%-a a genomnak ismert)

Az emberi összetett tulajdonságok vizsgálatánál van kiemelten fontos szerepe (elhízás, szív és érrendszeri betegségek), illetve a xenotranszplantáció esetleges megvalósulása esetén.

Evolúciós szempontból a sertés a főemlősök és rágcsálók között helyezkedik el.

Egér (*Mus musculus*) - 2002

Kutya (*Canis lupus familiaris*) - 2003

Poodle és boxer fajtákkal indult a projekt.

Csimpánz (*Pan troglodytes*) - 2004

A csimpánz a legközelebbi rokon faj az emberhez. 98%-ban megegyezik a genom, de a maradék 2%, pl. a transzkripciós faktorok működésbeli különbségei (más gének átírását szabályozó fehérjék) magyarázatot ad arra, hogy milyen különbségek vannak az agyműködésben, vagy a beszéd kialakulása az embernél.

Patkány (*Rattus norvegicus*) - 2004

5. Biotechnika- biotechnológia

Manapság gyakran találkozhatunk a biotechnika és biotechnológiai fogalmakkal. Azonban mit is jelent ez a két szó? Mindkét fogalom esetén több meghatározással is találkozhatunk. A biotechnika a genetikai ellenőrzés alatt álló biológiai folyamatok specifikus fizikai és kémiai tényezőkkel való befolyásolása. Míg mások szerint a technikai eszközök orvosi-gyógyászati alkalmazása. Ereky Károly magyar gépészmérnök (1917) meghatározása szerint: Minden munka, mely az élő szervezeteket használja fel a nyersanyag módosítására. Azt a folyamatot, amelyet olyan sejtek, vagy azoknál is kisebb elemei hajtanak végre, amelynek valamilyen öröklődő tulajdonságait a hasznosíthatóság érdekében módosítják, melynek természetes öröklésmenetét megváltoztatják. Mások szerint a technikai műveletek és ipari termelés keretében alkalmazott biológiai eljárások összefoglaló neve. A biotechnológia valójában történelem előtti idők óta folyó interdiszciplináris tevékenység. Ma már rengeteg tudományterület eredményeit hasznosítja. Míg az ő eredményei főleg a mezőgazdaságban, az orvosi gyakorlatban, a környezetvédelemben, a vegyipar, az élelmiszeripar és a gyógyszeripar termelő üzemében hasznosulnak. Alkalmazásakor szigorúan érvényesül az okság elve; az anyag és energia megmaradás elve; a termodinamika és az entrópia törvénye.

Talán jobban megérthetjük a módszerek közötti különbséget, ha ismertetjük az oda sorolható eljárásokat.

5.1. Biotechnikai eljárások

1. Mesterséges termékenyítés (Artificial insemination; AI)

Ezen eljárás során emberi segítséggel juttatjuk a termékenyítőanyagot a hüvelyen át a nőivarú egyedbe. Azonban ekkor még nem biztos, hogy a megtermékenyítés létre is jön. Ezért fontos itt kiemelni, hogy mesterséges termékenyítésről beszélünk, a gyakran hibásan használt megtermékenyítés szó helyett. Mivel megtermékenyülésről akkor beszélünk, ha a hímivarsejt átjut a zona pellucida-n, a két ivarsejt maganyaga egyesül és kialakul a zigóta.

A termékenyítőanyag levételét, felhasználását tekintve megkülönböztetünk három módot:

1. Levett ondó helyszínen való felhasználása; nincs hígítás/tartás.
2. Laborban minősített ondót hígítják/hűtik és 0°C fokon szállítható; 1-2 napig végezhető vele inszeminálás
3. Ondó mélyhűtés minősítés után, hígítás, majd -196 °C fokon hűtik N-ben, műszalmában adagolva, vagy szemcsésen fagyasztva tárolják

Előnye a módszernek, hogy kiváló teljesítményű egyedektől több utód nyerhető; termékenyítőanyagaik tárolhatóak akár több évig is (faj, sőt sok esetben fajta függő); elkerülhetőek a nemi betegségek, kiszűrhetőek ismert genetikai defektusok; tenyészcélok hamarabb elérhetőek; piaci igényekhez gyorsan lehet alkalmazkodni illetve viszonylag olcsó megoldás. Míg legfőbb hátránya, hogy szakképzett emberi munkaerőt és infrastrukturális háttérrel kíván.

2. Ivarzás szinkronizálás

Az állatnemesítés egyik fő célja a piaci igények kielégítése, profit termelés a gazdák számára. Az ivarzás szinkronizálás során természetes és mesterséges hormonkészítményekkel (gesztagénekkal) lehetőség van az ivarzást, peteleválást egy időre szinkronizálni minden nőivarú egyednél. Így idő és pénz takarítható meg, mivel pontosan tudható a termékeny időszak, a kezelt egyedek ismertek, hasonló korú utódok születnek az általunk választott időre.

3. Embrió darabolás

A megtermékenyülés után létrejött zigóta osztódása során 2-64 sejtés embrió állapotában, a teljes öröklési anyag birtokában identikus ikreket állítunk elő. Két, vagy több teljes értékű, életképes ivadék nyerhető (egypetés ikrek)

4. Szuperovuláltatás

A fajra jellemző ovulációs rátánál több petesejt érkezik meg hormonális beavatkozás hatására

5. In Vitro Fertilizáció

Akkor végezhető el, mikor mindkét szülő ivarsejtjei termékenyítésre/termékenyülésre alkalmasak. A termékenyítést laboratóriumi körülmények között végzik el, és az életképes embriókat ültetik az anyába.

5.2. Biotechnológiai eljárások

1. Kimérák előállítása

Különböző szülőktől nyert (kettőnél több ivarsejtből létrejött) teljes, vagy félembriók összeolvadása. Különböző fajtái vannak.

1. Elsődleges

-*Polispermia*: Két vagy több (három) ondósejt által megtermékenyített petesejt. Az így létrejött embrió három, illetve utóbbi esetben négy génkészlettel rendelkezik. Ilyenkor több különböző apa is előfordulhat.

- *Számfeletti sejtmagos*

Sarkitestes: Sarkitestből származik a számfeletti sejtmag. Az első két sarkitest a primer oocyta első, meiotikus osztódásával keletkezik (secunder oocyta), a haploid petesejt a meiózis végén alakul ki, amikor egy újabb sarkitest jön létre. A meiózis végterméke három sarkitest és egy petesejt. Mindhárom sarkitest részt vehet egy extra megtermékenyítésben. A sarkitestes elsődleges kimérában három génkészlet van jelen. (Egy anyai és két apai.)

Aggregációs: Két külön-külön megtermékenyített petesejt az egyedfejlődés korai szakaszában összeolvadhat, és egy utód jön létre négy ivarsejtből. Az ilyen kiméra négy génkészlettel rendelkezik, ezek az egyes sejtekben kettesével, meghatározott párokban vannak jelen.

- *Injekciós*: Mesterséges kimérák, ahol az embrióba máshonnan származó sejtek befecskendezésével juttatnak eltérő genetikai információt.

2. Másodlagos

A másodlagos kimérák az egyedfejlődés későbbi szakaszaiban alakulnak ki.

- *Sejtcseré véredényeken át*

- *Transzplantáció*

A transzplantációs kimérák a növényvilágban gyakoriak (oltványok). A beoltott vad alany az oltóvessző tulajdonságai szerint kezd működni, szélsőséges esetben előfordulhat, hogy szilvafán barack teremjen. Sejtek vagy szövetek beültetésével bármely egyedfejlődési szakaszban létrehozhatók transzplantációs kimérák. A csontvelő átültetése során például a

donor sejtjei termelik a vérsejteket, így a teljes vérrendszer más genetikai információkat hordoz, mint a gazdaszervezet.

Beszélhetünk fajkimériáról (juhkecs) és fajtakiméráról is.

2. Poliploidia (Sejtmag többszöröződés)

Ezen eljárás során elektromos, vagy kémiai kezelés hatására a sejtmagban a kromoszóma állomány $2x$, vagy többszörösére gyarapodik – óriásnövények hozhatóak létre. Elsősorban a növénynevelésben van jelentősége.

3. Parthenogenezis (szűz nemzés)

Aszexuális szaporodási forma, amikor ivaros szaporodás nélkül az egyik szülő hoz világra ivadékokat.

4. Génebesztet

Egy gént vagy DNS szekvenciákat egy másik állatba, állatfajba ültetnek át. Ilyenek a transzgénikus állatok.

5. Klónozás

Klónnak tekintjük az ugyanazon egyedtől (őstől) származó, ivartalan szaporítás által létrehozott, genetikailag azonos élőlények összességét. Így rájöhettünk, hogy a klónozással a növénytermesztésben már régóta foglalkoznak, csupán az állatnevelésben tekinthető viszonylag új eljárásnak. A klónozás során létrehozott egyedek minden tulajdonságukban megegyeznek.

Megtermékenyített (osztódni képes), vagy meg nem termékenyített, de osztódásra indukált petesejt magját eltávolítják és embrionális blasztomert vagy testi sejt magját helyezik át. Azonban a létrehozott utódok nem teljesen azonosak genetikailag. Csupán a sejtmagban örökített, nukleáris DNS-tartalmuk egyezik meg, a citoplazmában található mitokondriális DNS a recipiens petesejt, nem pedig a donorsejt mitokondriális DNS-ét tartalmazza.

Dolly bárányról valószínűleg mindenki hallott már, amit felnőtt egyed testi sejtjéből sikerült előállítani 1996-ban. Ezzel bizonyítást nyert, hogy „végdifferenciálódott” testi sejtek is képesek a teljes egyedfejlődésre. A sejtmagdonorként szolgáló sejt egy finn dorset fajtájú juh emlőszövetének tenyészetéből származott, míg a citoplazmadonor a scottish blackface fajta enukleált petesejtje volt. Dolly születése után alig egy évvel, 1997-ben már a genetikailag

módosított sejtekből sejtmagátültetéssel létrehozott juhok, Polly és Molly születéséről is értesültünk, akik transzgenikus állatok is voltak, ugyanis a fibroblaszt-tenyészetbe előzőleg a humán 9-es véralvadás faktor génjét ültették be, s ezen ún. transzgenikus sejteket használták sejtmagdonorként a kísérletekben. Ugyanebben az évben született meg Gene, az első klónozott szarvasmarha, Neti és Ditto, az első klónozott rhesus makákók (*Macaca mulatta*) és Cumulina, az első klónozott labregér is. 1998-ban pedig világot láttak az első felnőtt testi sejtől klónozott szarvasmarhák, Noto és Kaga is. Mára már igen sok fajt sikerült klónozni (teve, patkány, prérifarkas, nyúl, disznó, kutya stb.).

évszám	eredmény	forrás
1892	Hans A. E. Driesch; az első állati klónok: tengeri sün embrió blasztomerek izolálása teljes egyed fejlődését eredményezte	
1902	Hans Spemann: identikus gőtéik létrehozása embriófelezéssel	
1903	Herbert Webber: a klón fogalmának megalkotása	
1928	Hans Spemann: az első, gőtéken végzett sejtmagátültetés embrionális sejtekkel	Spemann (1938) ³
1952	Robert Briggs és Thomas King: békaembrió sejtjeivel végzett sejtmagátültetés	Briggs–King, 1952
1962-75 ⁴	John Gurdon: sejtmagátültetés karmosbékákön embrionális és bélmájsejtek alkalmazásával	
1963	Tung Ti Csu létrehozta az első klónozott halakat pontyfélékben	Tung et al, 1963 (kínaiul) ⁵
1984	Steen Willadsen: juh sejtmagátültetéses klónozás 16-18 sejtes juhembriósejtekből	Willadsen, 1984, 1896
1995	Megan és Morag: in vitro tenyésztett embrionális sejtekből létrehozott sejtmagátültetéses juhok	Campbell et al., 1996
1996	Ian Wilmut: az első felnőtt, testi sejtől klónozott emlős, Dolly megszületése	Wilmut et al., 1997
1997	Polly és Molly: az első transzgenikus juhok előállításá sejtmagátültetéssel	Schnieke et al., 1997
	Neti és Ditto: az első rhesusmajom klónok	Meng et al., 1997
	Gene: az első, magzati fibroblaszt sejtől klónozott szarvasmarha	Cibelli et al., 1998
	Cumulina: az első, kumulusz sejtől klónozott laboratóriumi egér	Wakayama et al., 1998
1998	Noto és Kaga: az első, felnőtt testi sejtől klónozott szarvasmarhák	Kato et al., 1998
	Mira: az első, embrionális sejtől klónozott kecske	Baguisi et al., 1999
2000	Alexis, Carrel, Christa, Dotcom és Millie: az első klónozott malacok	Polejaeva et al., 2000

	Yanyuan: az első felnőtt testi sejtéből klónozott kecske	
	Ombretta: az első muflon klónozása	Loi et al., 2001
2001	Noah: az első klónozott veszélyeztetett állatfaj, a gaur (<i>Bos gaurus</i>)	Lanza et al., 2001
	az első klónozott nyulak	Chesne et al., 2002
	CopyCat (más néven Carbon Copy): az első klónozott házimacska	Shin et al., 2002
2002	Az első banteng (<i>Bos javanicus</i>) klónozása	Sansinena et al., 2005
	Idaho Gem: az első klónozott öszvér	Woods et al., 2003
	Prometea: az első felnőtt testi sejtéből klónozott ló	Galli et al., 2003
	Ditteaux: az első felnőtt testi sejtéből klónozott afrikai vadmacska (<i>Felis silvestris</i>)	Gomez et al., 2004
	Dewey: az első felnőtt testi sejtéből klónozott fehérfarkú szarvas (<i>Odocoileus virginianus</i>)	
	Ralph: az első klónozott patkány	Zhou et al., 2003
2004	Tabouli és Baba Ganoush: az első kromatin átültetéssel klónozott macskafélék (házimacska – <i>Felis silvestris catus</i> és leopárd macska – <i>Prionailurus bengalensis</i>)	Yin et al., 2005
2005	Snuppy: az első klónozott kutya (afgán agár)	Lee et al., 2005
2006	Libby és Lilly: az első klónozott házi- vagy vadászgörények (<i>Mustela putorius furo</i>)	Li et al., 2006
	Klonilla: az első Magyarországon klónozott állat: felnőtt testi sejtéből klónozott laboratóriumi egér	Meng et al., 2008
2007	Snuwolf és Snuwolffy: az első klónozott farkasok (<i>Canis lupus</i>)	Kim et al., 2007
	Tapsilla: az első hazai, testi sejtéből klónozott nyúl	Meng et al., 2009
2008	Megszülettek Snuppy utódai: a tenyésztési programban csak klónozott állatokat kereszteztek egymással	
2009	Injaz: az első klónozott teve (<i>Camelus dromedarius</i>) megszületése	Wani et al., 2010
2011	Az első klónozott prérifarkas, más néven kojot (<i>Canis latrans</i>) megszületése interspecifikus klónozással	Hwang et al., 2012

Dinnyés és Kobolák (<http://www.matud.iif.hu/2013/06/03.htm>)

6. Állati eredetű termékek nyomonkövetése genetikai módszerekkel (faj- és fajtaazonosítás)

Napjainkban úgy tűnik, hogy a fogyasztók növekvő érdeklődést mutatnak a regionális és hagyományos vagy tradicionális eljárással készített élelmiszerek iránt. Ezeket olyan termékeknek tekintik, melyek minőségüket és egyediségüket az adott vidék jellegzetességeihez szorosan kapcsolódó, hagyományos gyártási eljárásoknak köszönhetik. A regionális termékek különleges organoleptikus tulajdonságokkal rendelkeznek: kivételes illatok, ízvilág és megjelenés jellemzik őket. A kíváncsiság valamint az érzelmek, melyeket az ilyen termékek kiváltanak a fogyasztókban, együttesen adhatnak magyarázatot arra, hogy a regionális és tradicionális élelmiszerek iránt nagy a kereslet, még ha többet is kell fizetni értük, mint a tömeggyártott termékekért.

1992-ben olyan irányelveket fogadtak el, melyek az Európai Unió (EU) tagállamai területén az élelmiszer-előállítás jogi védelmével kapcsolatosak és a következő három megjelölést tartalmazták: Oltalom alatt álló eredetmegjelölés (“Protected Designation of Origin”), Oltalom alatt álló földrajzi megjelölés (“Protected Geographical Indications”) és Hagyományos Különleges Termék (“Traditional Speciality Guaranteed”) (az Európa Tanács 510/2006, 509/2006 sz. rendelkezései és az EU bizottságának 1898/2006 sz. rendelkezése). Ezeknek a megjelöléseknek a célja az volt, hogy a fogyasztókat egy adott agrár- vagy élelmiszeripari termék minőségéről és eredetéről tájékoztassák. Ha a gyártók jogi védelmet biztosítanak az általuk előállított termékeknek, akkor automatikusan arra is kötelezik magukat, hogy önkéntesen ellenőrzik a gyártási folyamatot és felülvizsgálják, hogy az megfelel-e az adott termék receptjében szereplő előírásoknak.

Az Európai Unióhoz tartozó országokban meghatározó tendencia az, hogy a gyártók fokozottan hangsúlyozzák regionális kötődésüket és őrzik őseik hagyományait. A regionális és tradicionális élelmiszerek által a gyártók az adott vidék egyedülálló sajátosságait népszerűsíthetik, megbízható minőséggel és ízértékkel szavatolhatják, hogy ugyanazt a nyersanyagot, ugyanazzal a technológiával dolgozzák fel az előállítás során. Ezen termékek iránt fokozatosan növekszik a kereslet magasabb árak ellenére is, melyet a fogyasztók hajlandóak fizetni azonban ez csábítást is jelenthet arra, hogy a gyártók hamisítsák ezeket az élelmiszercikket. Ezen termékek hamisítása, amellett, hogy egyértelműen tisztességtelen gyakorlatot jelent a fogyasztóval szemben, akár bizonyos egészségügyi kockázattal is járhat. (allergiák). Az élelmiszer hamisítás elleni küzdelem nem olyan csekély jelentőségű probléma, mint milyennek elsőre gondolnánk. Ma már a különböző hatóságok is szigorú eszközökkel dolgoznak, hogy a fogyasztó közönséget anyagilag és főleg az egészsége

nézőpontjából megvédelmezzék. Hamis élelmiszernek minősül az az élelmiszer amelyet a rá vonatkozó előírásokban vagy a gyártmánylapban meghatározott minőségi előírásoknak nem megfelelően állították elő; amelyet az adott tevékenység vonatkozásában nem engedélyezett, illetve nem nyilvántartott módon állítottak elő, illetve hozták forgalomba; amely előállításánál meg nem engedett összetevőt használtak fel; amelynek átcímzése vagy átcsomagolása jogsértő módon történt; amelynek minőségmegőrzési, illetve fogyaszthatósági idejét jogellenesen meghosszabbították, illetve amelyet részben vagy egészben lejárt minőségmegőrzési, illetve fogyaszthatósági idejű anyagokból állították elő; amelynek előállítása nem emberi fogyasztásra szánt anyagok felhasználásával történt, illetve nem emberi fogyasztásra szánt termék emberi fogyasztás céljára történő forgalomba hozatala. Termékeredet vizsgálatoknak ma már különböző módszerei vannak: fizikai módszerek (szín, állag, szag, összetevők); anatómiai módszerek (fogazat, bordák száma, csigolyák száma); hisztológiai módszerek (izomrostok hossza, átmérője, sűrűsége, mintázata); kémiai módszerek (hús zsírtartalma, húsliszt hamu tartalma); biológiai módszerek (fajmeghatározás). Ezeket az utóbbi eljárásokat bővebben tárgyaljuk jegyzetünkben. A felhasznált fajok pontos meghatározása azért is fontos elvárás, mivel ez a tisztességtelen gyakorlat néhány védelem alatt álló állatfaj kereskedelmi tilalmával is szoros összefüggésben áll. Annak érdekében, hogy megvédjük a fogyasztói érdekeket és megőrizzük a vásárlók bizalmát, szükségesnek látszik bevezetni a gyártási folyamatok hatékony ellenőrzését és felülvizsgálni a regionális és tradicionális élelmiszerek faj szerinti összetételét. Szerencsére napjainkban lehetőség nyílik arra, hogy az egyes fajokat különböző eljárásokkal azonosítsuk. Például húsok esetén néhány ezen eljárások közül kizárólag a nyershús esetében teszi lehetővé az egyértelmű fajazonosítást, míg más módszerek akkor is képesek erre, ha a húsokat különféle gyártási eljárásoknak vetették alá. Hazánkban talán leggyakrabban a tej és tejtermékek (vaj, sajt) hamisítása történik. Dániában különösen nagy figyelmet kap az élelmiszer biztonság, hamisítás. Külön törvény védi a vajat, annak hamisítója fegyházbüntetést is kaphat. A fajmeghatározás céljából biológiai (szerológiai vagy immunológiai) módszereket alkalmazunk. Lehetnek kromatografikus, immunológiai, elektroforetikus és genetikai eljárások. Az immunológiai módszerek a világon az elterjedtebbek, viszont nem annyira pontosak, különösen rokon fajok esetén nem.

6.1. Genetikai módszerek élelmiszertermékek faj/fajtaazonosításának szolgálatában

Ha összevetjük a fajmeghatározás fehérje analízisen, illetve DNS analízisen alapuló módszereit, akkor a DNS egyedülálló tulajdonságainak köszönhetően

megkérdőjelezhetetlenül megmutatkoznak az utóbbi eljárás előnyei. A DNS egy adott szervezet összes genetikai információját tartalmazza és független attól a szövetől, melyből származik. Éppen ezért nem lényeges, hogy a vizsgált mintát az izomszövetekből, a vérből vagy a májból nyertük-e. A DNS sokkal több információt hordoz, mint a fehérje, ez a genetikai kód sajátosságaiból ered. A fehérjével összevetve, a DNS stabilabb és jobban ellenáll a magas hőmérsékletnek, a nagy nyomásnak és a kémia vegyületek roncsoló hatásának is. A nukleinsavak itt felsorolt tulajdonságai nem csak nyershús esetében teszik lehetővé a fajmeghatározást, hanem akkor is, ha a húst hőkezelték vagy különféle vegyületekkel elegyítették. Továbbá a genetikai módszerek lehetővé teszik, hogy szoros rokonságban álló fajok, pl. csirke és pulyka között is különbséget tegyünk, önállóan és keverékben előforduló húsokat fajok szerint azonosítsunk és végül, de nem utolsó sorban génmódosított szervezetekből származó szöveteket vizsgáljunk.

Nagyon valószínűnek tűnik, hogy a nukleinsavak vizsgálatán alapuló fajmeghatározási módszereket a jövőben egyre gyakrabban fogják alkalmazni arra, hogy a konyhakész élelmiszerek összetételét ellenőrizzék. Az a tény, hogy a genetikai módszerek minden más eljárásnál vitathatatlanul hatékonyabbak, azzal magyarázható, hogy sokrétű alkalmazást tesznek lehetővé, így például keverékek és különféle eljárásoknak alávetett húsok fajmeghatározását is képesek elvégezni. További előny az is, hogy az ilyen vizsgálatok gyorsan és könnyen végrehajthatóak.

Az élelmiszeripar igényeinek kielégítésére számos DNS alapú vizsgálatot fejlesztettek ki, melyek a fajmeghatározást teszik lehetővé. Mindazonáltal a polimeráz láncreakción alapuló (PCR) vizsgálatok különös figyelmet érdemelnek, mivel magasfokú érzékenység és specifitás jellemzi őket, valamint viszonylag rövid idő is elegendő végrehajtásukra és nem mellesleg költségghatékony is. A PCR vizsgálatok közül, az élelmiszerhamisítás felderítésére használt leggyakoribb módszerek a következők: PCR fajspecifikus primerek használatával, PCR-RFLP (restrikciós fragmenthossz polimorfizmus vizsgálat), PCR-RAPD (véletlenszerűen felszaporított polimorfikus DNS vizsgálat), PCR-SSCP (egyszálú konformációs polimorfizmus vizsgálat), szekvenálási módszerek és a valós idejű PCR, mely kvantitatív kontaminációs vizsgálatot tesz lehetővé.

PCR alapú genetikai módszerek

Polimeráz lánreakció (PCR)

A polimeráz lánreakción alapuló vizsgálat (PCR) egyike azoknak a genetikai módszereknek, melynek segítségével vizsgálható az élelmiszerek, köztük a húsok és hústermékek, összetételének eredete.

A polimeráz lánreakció egy meghatározott DNS-fragmens vagy RNS felszaporítását (amplifikálást) teszi lehetővé (az RNS először a cDNS-re íródik át egy reverz transzkripció során) in vitro körülmények között. A kiválasztott DNS szekvencia a vizsgálathoz szükséges mértékben amplifikálható egyszálú DNS molekulákra. A reakcióhoz a következő összetevők szükségesek: DNS-templát – ez tartalmazza a DNS-szakasz amplifikálandó régióját; két primer – amely meghatározza az amplifikálandó szakasz elejét és végét; DNS-polimeráz – amely lemásolja az amplifikálandó szakaszt; nukleotidok – amelyekből a DNS-polimeráz felépíti az új DNS-t; puffer – amely biztosítja a DNS-polimeráz számára megfelelő kémiai környezetet. A primereket kémiai szintézis során kapjuk és többnyire körülbelül 20 nukleotidból állnak. A DNS-fragmens szintézisének minden ciklusa három fázisból áll, melyek különböző hőmérsékleten mennek végbe:

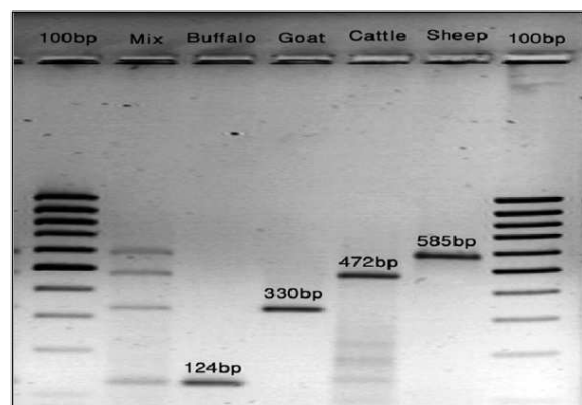
1) denaturáció, 90°C feletti hőmérsékleten; 2) primerek feltapadása, 40-60°C közötti hőmérsékleten; 3) növekedés/elongáció, kb. 70°C-os hőmérsékleten.

Leggyakrabban minden egyes PCR reakció 20- 40 ciklust foglal magában és minden egymást követő ciklusban az adott mátrix fragmentjeinek száma megduplázódik.

A PCR-t Kary Mullis találta fel és eredményéért 1993-ban megkapta a kémiai Nobel-díjat. Az ötlete az volt, hogy olyan eljárást fejlesszen, amely a DNS-t mesterségesen megsokszorozza a DNS-polimeráz enzim segítségével, megismételt duplikációs ciklusok által.

PCR fajspecifikus primerek használatával

Jelenleg a PCR-vizsgálat, mely fajspecifikus primereket alkalmaz, egyike azoknak a genetikai eljárásoknak, melyek különböző húsfélek azonosítását teszik lehetővé, legyen szó nyershúsokról vagy hőkezelt termékekről. Ezen eljárás során fontos kitétel, hogy



ismernünk kell annak a génnek a nukleotidállományát, amely alapján a fajmeghatározást végezni fogjuk. A fajspecifikus primerekre épülő PCR-vizsgálat megköveteli elegendő kontrollminta felszaporítását, ezzel kizárja a hibás eredmények lehetőségét.

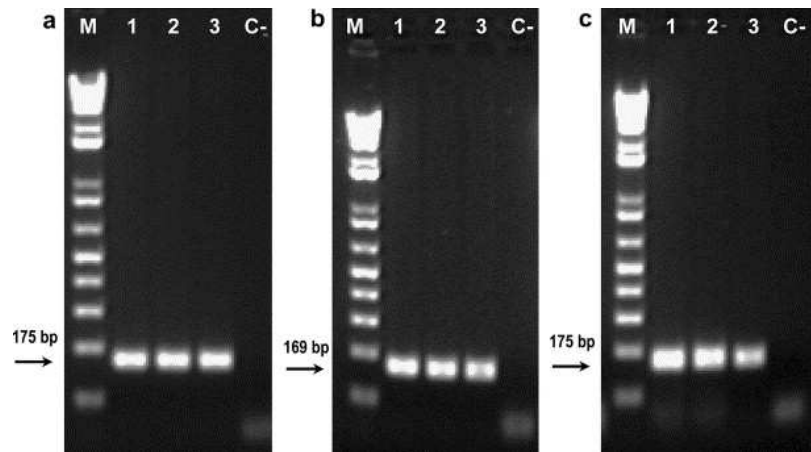
Gyakorta a tisztességtelen eljárásokat alkalmazó élelmiszergyártók olcsóbb húsfélékkel helyettesítik a drágább alapanyagokat. Többek között ez a gyakorlat fordul elő a Mortara nevű hagyományos, olasz szalámi esetében: a libahúst más szárnyasfélére cserélik például pulykára vagy kacsára. A régi hagyományoknak megfelelően ezt a szalámifajtát kétféleképpen készítik: az egyik fajta elnevezése „ecumenico”, azaz kizárólag libahúst használnak fel, a másik változatban pedig sertés- és libahúst 2:1 arányban kevernek össze. Kutatók fajspecifikus primereket terveztek a mitokondriális DNS citokróm b génje alapján és ilyen módon képesek voltak a termékben azonosítani a házi lúd (*Anser anser*) húsát.

Citokróm b gén a mitokondriális genomban található és gyakran alkalmazzák húsok fajmeghatározására végzett kísérletekben és ezért a szekvencia jellemzői sok gerinces és gerinctelen állatfaj esetében ismert. A mitokondriális DNS számos előnnyel rendelkezik a nukleáris DNS-szel szemben. A mitokondriális DNS sejtenként kópiák ezreiben fellelhető és mivel számos mutációra képes lehetővé teszi a szoros rokonságban álló fajok megkülönböztetését is. Az elvégzett vizsgálatok során a két szalámifélében izolálták a DNS-t, vagyis a sertéshússal kevert változatban és a tisztán libahúsból készültben is, továbbá ugyanezt tették a tiszta sertéshússal és a kacsahússal is. A PCR-vizsgálatot és elektroforézist követően egy olyan jellemzőhöz jutottak, mely csak is kizárólag a libahúshoz volt köthető, a többi húsféléhez pedig nem. Ezen tanulmányok eredményei igazolni látszanak azt, hogy a kifejlesztett primerek sikerrel alkalmazhatóak a libahús azonosítására.

Az alacsony zsírtartalmú élelmiszerek iránti növekvő érdeklődés miatt a fogyasztók a vadhúsból előállított termékeket keresik a piacon, köztük a gímszarvas (*Cervus elaphus*), dāmivad (*Dama dama*) és az őz (*Capreolus capreolus*) húsát. Azért, hogy megvédjük a fogyasztói érdekeket ezen nagyon is népszerű ínynchúsok esetében, azaz felderítsük a megtévesztően, jogtalanul címkézett termékeket, a kutatók a 12S rRNS gén alapján DNS-primereket fejlesztettek ki, melyekkel egyértelműen azonosíthatóak a fent nevezett húsfélék. Megegyező reverz primereket és fajspecifikus primereket használtak e vadhúsok esetében.

A három primerpár szelektív felszaporításának sikerét megerősítette az elvégzett PCR-vizsgálat, nem csupán a fent nevezett három vadhús fajmeghatározása esetében, hanem a következő fajokból nyert mintákban is: zerge, muflon, spanyol kőszáli kecske, szarvasmarha, juh, kecske, ló, házinyúl, kacs, pulyka és házilúd. Az elvégzett vizsgálatok a kívánt méretű

amplikonokat eredményezték szarvas- 175 bp, dámszarvas- 169 bp és őz- 175 bp szállhosszúsággal úgy, hogy egyidejűleg a többi elemzett faj nem volt jelen a vizsgált mintákban. Annak érdekében, hogy a kifejlesztett, a fent

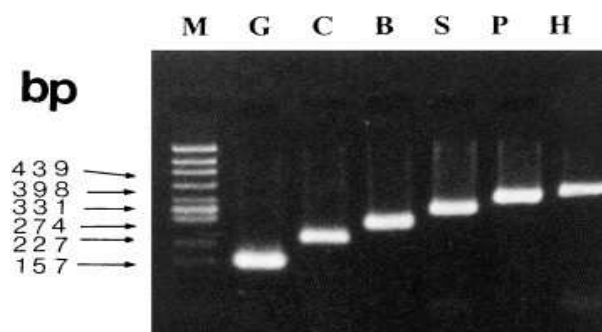


megnevezett vadhúsok azonosítására szolgáló módszer hasznosságát igazolják, kísérleti körülmények között előállított hústermékeket is vizsgáltak, melyeket pasztörizálásnak (72°C, 30 percig) és sterilizálásnak (121°C, 20 percig) vetettek alá épp úgy, mint az ipari technológiával előállított termékeket (hűtve szárított és főtt termékeket). Ezekben az esetekben is kielégítő eredményeket kaptak a kutatók, így pedig igazolást nyert, hogy a nagymértékű roncsolódást szenvedett DNS-t is lehet amplifikálni (csak a viszonylag rövid szállhosszúságú DNS szegmenseket (175 bp) amplifikálták ebben a kísérletben). A kapott eredmények igazolták, hogy a tervezett primerek egy bizonyos fajspecifitással rendelkeznek, ez pedig azt jelenti, hogy alkalmasak rutinvizsgálatok elvégzésére.

A PCR-vizsgálat lehetőséget nyújt arra, hogy olyan szoros rokonságban álló állatfajokat különítsünk el egymástól, melyek nukleotid szekvenciái nagymértékű egyezést mutatnak, ilyenrel találkozunk a csirkék és pulykák esetében. Egyes kutatók olyan módszert fejlesztettek ki, mely a nukleinsav zöld megfestésével láthatóvá teszi az eredményeket és ezáltal jelentősen lerövidíti a vizsgálat időtartamát. A cytochróm b alapján készült két primer pár csirke esetében 120 bp, a pulyka esetében pedig 101 bp szállhosszúságú szaporítást tett lehetővé, mindkét esetben nyers és főtt húsokat, valamint autoklávkezelésnek alávetett mintákat vizsgáltak és azonosították sikerrel a szóban forgó két fajt.

A fent említett állatfajok esetében az amplikonok kimutatását fluoreszcens jel kibocsátást mérő vizsgálattal is elvégezték. Ez azért volt lehetséges, mert a zöldfesték reakcióba lépett a PCR-termékekkel.

A hő hatására bekövetkező denaturáció jelenti a húsféleségek fajmeghatározásának egyik kritikus



pontját mind a fehérje, mind a DNS vizsgálatán alapuló mérések esetén akkor, ha a húsokat a gyártás során hőkezelésnek vetik alá. Hopwood és mtsai. [1999] arról számoltak be, hogy sikerül a 30 percen át, 120 °C fokra melegített csirkehúst azonosítaniuk. Matsunaga és mtsai. (1999) pedig olyan módszert mutattak be, mellyel egyszerűen és gyorsan elvégezhető hat húsfajta kvalitatív azonosítása (szarvasmarha-B, sertés-P, csirke-C, juh-S, kecske-G és ló-H) mind nyers, mind pedig 100 °C ill. 120 °C fokra történő 30 perces melegítés után is. A módszer hét megfelelő arányú primer használatát foglalja magában, azaz egy a mitokondriális DNS citokróm b génje alapján tervezett primerre és hat reverz primerre vagy szükség, melyek mindegyike a vizsgált fajok valamelyiként jellegzetességeit hordozza. Ez teszi tehát lehetővé a hat húsfajta egyidejű azonosítását.

Egyedül a lóhús 30 percen áttartó, 120°C fokra melegítése során bizonyult használhatatlannak az ebben a tanulmányban bemutatott módszer. A lehetséges magyarázat az lehet, hogy a lóhúsból kinyert DNS esetében az amplifikált termék hossza nagyobb volt (439 bp), mint a többi vizsgált faj mintáiban.

Marhahúsból származó DNS nagymértékben ellen áll azon magas hőfokokkal szemben, melyeken a különféle húsok hőkezelésének hatásait vizsgálták. A fajelemzéshez olvasztott zsiradékot és marhahús-kivonatot gyűjtöttek. A primereket a mitokondriális DNS alapján nagyon jól sikerült szaporítani, a 80 percig zsiradékban sült hús kivételével a 271 bp hosszú framenseket választották ki a mintákból a vizsgálathoz.

Kutatók a mitokondriális citokróm b génen alapulva egy sorozat fajspecifikus primert terveztek, ami csirke, pulyka, kacska, liba, fácán, fűj és gyöngytyúk nyers és feldolgozott húsanak egymástól való elkülönítését, azonosítását tette lehetővé. A PCR-termékek detektálását poliakrilamid gél segítségével elektroforetikus elválasztással végezték el, a géleket pedig etidium bromiddal festették meg.

PCR Restrikciós fragment hossz polimorfizmus - PCR-RFLP

A PCR-RFLP eljárás azt jelenti, hogy egy DNS-fragmentum először felszaporítanak, majd egy restrikciós enzimmel emésztik. A PCR-RFLP eljárás alkalmazása lehetővé teszi, hogy emlősökből, szárnyasokból és halfélékből származó húsokat azonosítsunk. Az eljárás hátránya abban rejlik, hogy esetlegesen az emésztés nem maradéktalan vagy intraspecifikus különbségek fordulhatnak elő, mely hasító helyek kialakulásához vagy eltűnéséhez vezethetnek.

A 12S rRNS gén alapján különböző szárnyasféléket azonosítottak: házityúk (*Gallus gallus*), házikacska (*Anas platyrhynchos*), házipulyka (*Meleagris gallopavo*), gyöngytyúk (*Numida*

meleagris) és japán fürj húsát (*Coturnix japonica*). Ezt az öt húsfajtát nyers formában és a házityúk esetében feldolgozott formában is próbálták elkülöníteni: 1) pástétom formájában (kb. 70 g) – 15 percig 120°C fokon melegítve és ezt követően további 10 percig 72°C fokon kezelve a terméken belül 2) hústömb (kb. 600 g) – 30 percen keresztül párolva 90°C fokon; 3) húspogácsa formájában (kb. 600 g) – hőkezelés 30 percen keresztül 120°C fokon; 4) krokett formában (kb. 15 g) 5 percen keresztül 180°C fokos zsiradékban kisütve. A mitokondriális 12S rRNS-t univerzális primerek és polimeráz láncreakció segítségével amplifikálták. A 456 bp hosszúságú PCR-terméket kiválasztott restriktív enzimekkel emésztették (HinfI, MphI103I, MvaI, Eco47I). A PCR-RFLP eljárás használatával nyert elektroforetikus elemzés a nyers húsokban mind az öt esetben azonosította a szárnyasféléket. A csirkehús kimutatása a melegített/ hőkezelt termékekben is lehetséges volt, habár az autokláv (csirátlanított) mintában a kötés alig volt látható.

A PCR-RFLP eljárás három emlősfaj együttes azonosítását is lehetővé tette: marha-, birka- és sertéshús esetében. A vizsgálati eljárás az ATP8 szintáz mitokondriális gén fragmensének elemzését foglalta magában. Az így nyert PCR-terméket (176 bp szálhosszúságú) MseI és Sau3AI restriktív enzimekkel emésztették, így elektroforetikus kötések hozva létre, ami már lehetővé tette a fajazonosítást.

Ezzel az eljárással 25 állatfaj azonosítását végezték el fagyasztott húsminták és fagyasztva szárított fehérjekivonatok esetében. Az itt leírt vizsgálatban a mitokondriális genom egy bizonyos régiója volt a molekuláris target. (tRNAGlu/cytokóm b). Az amplifikálás révén nyert DNS-fragmenst (464 bp) 11 különböző restriktív endonukleázzal kezelték. Az enzimek kiválasztásának szempontja volt a viszonylag alacsony ár, a beszerezhetőség illetve a PCR-termékben mutatott aktivitás, valamint az, hogy a vizsgált fajok azonosítását a kiválasztott enzimek a lehető legjobban elősegítsék. A szerzők szerint két restriktív enzim használata elegendőnek bizonyult ahhoz, hogy mind a 25 vizsgált fajt azonosítsák. A PCR-RFLP eljárás lehetővé tette továbbá azt is, hogy HinfI és MseI enzimek használatával két- (őz és marha), illetve háromkomposú (őz, tarka lantszarvú antilop és fekete lóantilop) húskeverékben is azonosítsák a fajokat.

Vizsgálatok során 50 kereskedelmi forgalomban lévő hústerméket elemeztek, melyek közül 9 nyers vagy szárított termék volt és további 41 vizsgált hústerméket pedig valamilyen ipari technológiával kezeltek, pl.: előfőzték, fagyasztották, füstölték, dehidratálták vagy sterilizálták őket. A vizsgált 50 termék közül 20 valamilyen húskeverék volt. Univerzális primereket használva, a kutatók a mitokondriális DNS-t amplifikálták a citokrom b kódolásával. A fajazonosítást a következő négy enzim segítségével végezték el: PstI, MboI,

Hinfl és AluI. A végeredményt azt mutatta, hogy 30 termékből, melyek állítólag csak egyféle húst tartalmaznak, tízben találtak hozzáadott pulyka- vagy sertéshúst. Ez azt jelenti, hogy a drágább húsokat (csirke, marha és fűj) olcsóbb pulyka- vagy sertéshúsokkal helyettesítették. Hús termék esetében, melyek csomagolásán legalább két húsfélét tüntetnek fel, 5 esetben téves információkat igazoltak a vizsgálatok. Mind az öt hibásan címkézett termékben az egyik feltüntetett húsféle hiányzott; három esetben a drágább húsok nem szerepeltek a termékben (őz- és marhahús), míg a maradék két termékben pedig nem mutattak ki sem csirke-, sem pulyahúst. A jelenlegi vizsgálatok tehát bizonyították, hogy a PCR-RFLP-vizsgálat megfelel arra, hogy a kereskedelmi forgalomban lévő, előzőleg valamilyen ipari eljárásnak alávetett és maximum három húsféléből álló termékekben a fajazonosítást elvégezzük.

Azonban vannak kutatások melyek a módszer hátrányára hívják fel a figyelmet. A kutatók 22 állatfaj esetében végeztek fajmeghatározási vizsgálatokat a Haell és a Hinfl restriktív enzim segítségével. Vizsgálati mintáik a következők voltak: nyers hús, mikrohullámú sütőben, 30 perc alatt elkészített hús illetve különböző húskeverékek. Két primerpárt használtak a kísérletekben: CYT b1 - CYT b2, valamint C1 és C2 primereket, melyek amplifikálják a citokróm b gént és 359 bp és 464 bp szálhosszúságú terméket eredményezve. Az „ujjlenyomatok”, azaz a poliakrilamid gélen hagyott nyomok, melyeket a restriktív enzimek hoztak létre mind a nyers, mind a feldolgozott hús esetében megegyeztek és a kenguru és a bivaly kivételével minden esetben sikerült azonosítani a fajokat a felhasznált mintákban.

Kétkomponensű, kereskedelmi szempontból fontos húskeverékekkel is végeztek vizsgálatokat, ide tartoznak a marha-, sertés-, bány- és csirkehúsból készült termékek, melyekben az egyes húsfélék aránya 1-től 99%-ig terjedt. Cytb1 és Cytb2 primerek és restriktív enzimeket használva már 1%-os sertéshús tartalmat is ki tudtak mutatni és gyakran ez a húsféle tűnt a legmeghatározóbbnak a vizsgált hústermékekben. A marhahúst nem sikerült kimutatni egy olyan sertéshúsos keverékben, melyben 80% volt a marhahústartalom. A csirkehúsos keverékben azonban 50%-os arány esetén kimutatták, bányhússal keverve pedig akkor is, ha a keverékben a marhahús csak 5%-ot tett ki. C1 és C2 primerekkel is tesztelték ugyanezeket a mintákat és keverékeket, a marhahúst ekkor minden keverékben sikeresen kimutatták, már 1%-os arány esetén is. A második primerpár tehát elősegítette a marhahús kimutatását, de akadályozta a csirke- és sertéshús detektálását. Ezek a belátások azt jelzik, hogy a PCR-RFLP módszer néhány esetben nem lehet megfelelő eszköze a fajmeghatározásnak, mert gyakran olyan eredményeket kapunk, melyek azonban nem tükrözik a vizsgált termékek valós összetételét.

A PCR-RFLP-módszer különösen hasznos a különféle halfajták azonosítása során. A lazacfélék családjába tartozó két hal, a közönséges lazac (*Salmo salar*) és a szivárványos lazac (*Oncorhynchus mykiss*) füstölt és nyers húsának az azonosítását is. A vizsgálatokhoz használható a 16S rRNS konzerváló gén egyik fragmense vagy a mitokondriális citokróom oxidáz II allélja (COII). Miután a megfelelően szelektált endonukleázokat felvitték az amplifikált DNS-mintára, egy olyan kötést nyertek, mely az elektroforetikus gélen található lazac- és pisztrángminták elkülönítését tette lehetővé. A lepényhalak rendjébe tartozó fajokkal is végeztek ilyen vizsgálatokat, például nyelvhallal (*Solea solea*) és grönlandi laposhallal (*Reinhardtius hippoglossides*). Az azonosítást ezekben az esetekben a mitokondriális 12S rRNS gén és a Acil valamint MwoI restriktív enzimek alkalmazásával sikerült elérni.

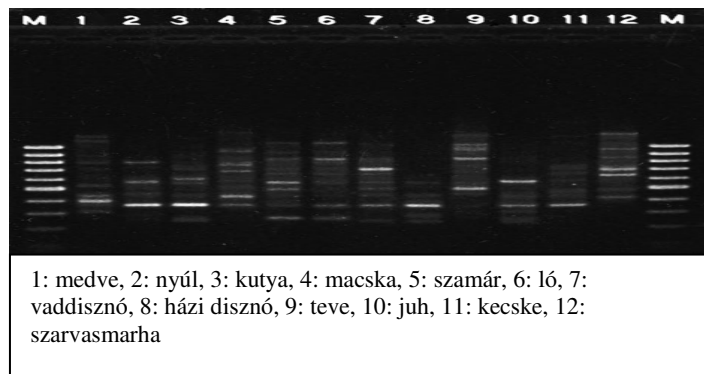
A PCR-RFLP-vizsgálattal sikerült azonosítani olyan halhúsokat is, melyeket az emlősökből és szárnyasokból származó mintákhoz hasonlóan magas hőfokon kezeltek, pl. sterilizáltak.

Random amplifikált polimorf DNS - RAPD

A PCR-vizsgálatok között egyedül csak a véletlenszerűen felszaporított polimorf DNS vizsgálat (PCR RAPD) az, amely összetett húskeverékekben vagy erősen roncsolt DNS esetében nem alkalmas a termék eredetének meghatározására. A PCR-RAPD vizsgálat a PCR-vizsgálat egyik módja, mely során egyetlen véletlenszerű primert használnak, ami azt jelenti, hogy a felszaporított fragmens mindkét szálán ugyanaz a primer iniciálja a reakciót. A véletlenszerű primerek fajspecifikus

„ujjlenyomatokat/ mintázatokat” hoznak létre, melyek láthatóvá válnak az elektroforézist követően.

Ez a megoldás kiiktatja a szekvenálást, a hibridizációt vagy a restriktív enzimek használatát az



egymást követő szakaszokban. A PCR-RAPD-vizsgálat legfőbb előnye, hogy viszonylag olcsó és egyszerűen elvégezhető, és ami még fontosabb, a vizsgált DNS szekvenciájának előzetes ismerete nélkül képes feltárni a genetikai változatosságot. Sajnos ennek a módszernek is megvannak a hiányosságai: nem lehet vele a fajokat azonosítani, ha nincs folyamatosan birtokunkban egy ismert sztenderd, vagy pedig ha húskeverékeket vagy magas hőfokon kezelt (csirátlanított/ autokláv hőkezeléssel feldolgozott) húsokat szeretnénk vizsgálni. Továbbá néhány kutató kimutatta, hogy a módszer érzékeny az amplifikációs körülmények változásaira és ezért a kapott eredmények igen rosszul ismételtetőek meg.

Többek között a PCR-RADP módszer lehetővé tette öt különböző húsfajta egyszerre történő azonosítását (sertés, marha, birka, csirke és pulyka). Nyershúsokból illetve hústermékekből származó DNS-t használtak fel (többek között hamburgerek, nyers kolbászkok, szárazon érlelt kolbászkok és főtt hústermékek vizsgálatát végezték el). Az így kapott DNS-profil megismételhető, egymástól elkülönülő kötések mutatott a vizsgált fajokban, így lehetővé téve a fajok beazonosítását.

A PCR-RADP vizsgálatot további nyershúsok azonosítására is alkalmazták: vaddisznó, házi sertés, ló, bölény, szarvasmarha, kutya, macska, házi nyúl és kenguru. A vizsgálatokban primerek kereskedelemben is hozzáférhető csoportját használták arra, hogy a jellemző elektroforetikus mintázatot megkapják és így a különböző húsokat azonosítani tudják. A PCR-RADP vizsgálatot halfajták azonosítására is alkalmazták véletlenszerű primerek használatával azért, hogy megkülönböztessék egymástól a lazacfélék következő három fajtát: közép-ázsiai pisztráng (*Brachymystax lenok*), szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) és amago (*Oncorhynchus masou ishikawai*).

Szekvenálás

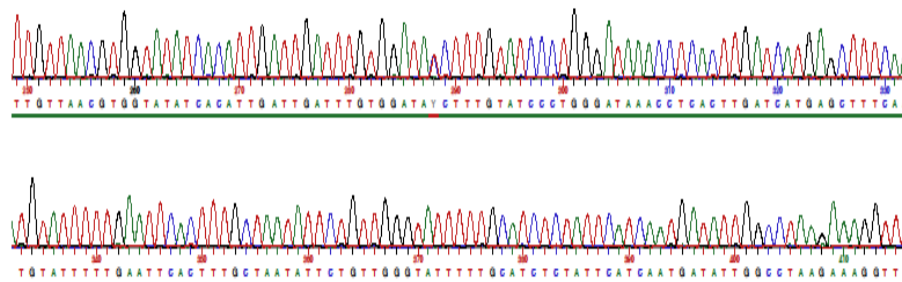
Élelmiszer eredet vizsgálatokban még nem elterjedt metodika, azonban röviden bemutatjuk a legelterjedtebb szekvenálási eljárásokat (bázissorrendek meghatározása).

A *Sanger-féle klasszikus* láncterminációs módszer radioaktívan jelölt DNS primer, egyszálú DNS templát, DNS polimeráz, valamint a dezoxi- és radioaktívan jelzett didezoxinukleotidok segítségével szekvenált DNS-t. A 4 nukleotidnak (A, C, G, T) megfelelően 4 külön csőben különböző hosszúságú DNS-fragmentek képződtek a szálon leálló szintézis nyomán a didezoxinukleotid-

beépülés miatt. A négy nukleotid alapján

párhuzamos futtatott

lemezeken végzett



gélelektroforetikus szeparációt követte az autoradiográfiai előhívás. Így 24 órával a kísérlet megkezdését követően manuálisan olvashatóvá váltak a DNS-szekvenciák. Ugyan így csak 500 bázist lehet leolvasni egyszerre, ennek ellenére az elvét napjainkban is még mindig használják. 1986-ban, majdnem tíz évvel Sanger után, vezették be a DNS-darabok fluoreszcens jelölését. A négy különböző bázishoz más-más színű fluorofort kovalensen

kötöttek, így egy közös csőben egyszerre lehetett elvégezni a szintézist, majd a gélelektroforézis után kapott úgynevezett kromatogramból számítógép segítségével nyerték ki a szekvenciákat. Az 1994-ben bevezetett új, 3' végén módosított dezoxinukleotid-trifoszfát tette lehetővé a bázisspecifikus terminációt és a 3' protektív csoport hatékony fotolitikus eltávolítását. Így lehetővé vált az újbóli DNSszintézis, ami az alapjává vált a későbbiekben alkalmazott sokciklusos szekvenálásnak. A 90-es évek másik újítása a kapilláriselektroforézis-technika kifejlesztése, amely során lineáris poliakrilamidot használtak szűrőmátrixként a DNS-szekvenáláshoz. Ennek segítségével igen kis DNS-mennyiségek is rövidebb idő alatt szétválaszthatóvá váltak, és több mint 1000 bázis vált leolvashatóvá 80 perc alatt. 1995-ben az addigiaknál megbízhatóbb olyan fluoreszcens jelölőfestéket fejlesztettek ki, ami az energiatranszfer révén optimálisabb abszorpciós és emissziós értékekkel rendelkezett. Ezt követte még egy újabb automatizált szekvenálásra is alkalmas fluoreszcens festék megjelenése. 1996-ban olyan 4 színű konfokális kapilláris array olvasót használtak amely automatikusan végezte a szekvencialeolvasást.

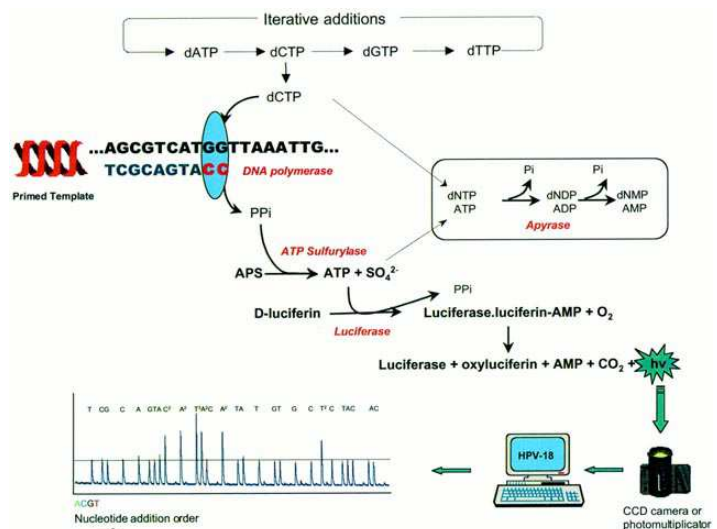
Piroszekvenálás

A módszert 1996-ban dolgozták ki, mely azon az elven alapul, hogy amikor egy nukleotid beépül a szálba leszakad egy pirofoszfát és ezt a luciferáz enzim felvillanása jelez. A leszakadó pirofoszfát mennyisége mérhető is egy kapcsolt reakcióval. Ennek a működési elve teljes mértékben eltér a Sanger-féle szekvenálástól.

Megkülönböztetjük a szilárd és folyadék fázisú eljárást.

A piroszekvenálás hátránya, hogy

még ma is költséges módszer, nagyon kis térfogatban zajlanak a reakciók, és rövidebb szakaszok (300-500 nt) szekvenálása végezhető el mint a Sanger-féle módszernél (800-1200 nt).



Új generációs szekvenálás

Párhuzamosan sok minta szekvenálása történik, nagy átteresztőképességű (HTP: *high-throughput*) módszerek. A láncszintézis és a detektálás terén is eltér működési elvük a hagyományos Sanger-féle szekvenálástól. Használatukhoz fejlett robottechnika és igen nagy

számítógép-kapacitás szükséges. Hátrányuk, hogy valamivel több hibát ejtenek és egy reakció során viszonylag rövid (néhány 100 bázis) DNS-darabot szekvenálnak, azonban párhuzamosan akár 1 milliót is. Az új-generációs módszerek bevezetésével robbanásszerűen megnövekedett a DNS-alapú vizsgálatok hatékonysága és csökkent a fajlagos költsége. Egy új-generációs szekvenátorral pár hét vagy akár pár óra alatt szekvenálni lehet akár az emberi genomot is. Ezek a módszerek nem csak DNS szekvenálására, hanem mRNS (RNAseq), kis RNS-ek (*small RNA-Seq*), és az ún. CHIPseq szekvenálásra is alkalmasak, melyből közvetlenül következtethetünk egy sejt, vagy a vizsgálandó anyag expressziós állapotára, és DNS szabályozó régióira.

Kvantitatív / real time PCR (q PCR, q RT PCR)

A valós idejű PCR-vizsgálat a génkópiák kvantitatív vizsgálatára vagy a DNS expressziós mérések elvégzésére alkalmas. A fluoreszcens festékanyag által kibocsátott jelzések erősségének mérésével monitorálható a ciklusonként képződő PCR-termék mennyisége. A fluoreszcencia folyamatos mérése lehetővé teszi, hogy kihagyjunk egyes olyan lépéseket, melyeket a polimeráz láncreakció után általában szükségesek, azaz például ilyen az elektroforezis és a gélfestés. Továbbá a valós idejű PCR-vizsgálat esetében a kontamináció esetleges veszélye jelentősen csökken, hiszen a vizsgálati keverékminták az eljárás során végig lezárva maradnak.

A valós idejű PCR-vizsgálatot eddig arra használták, hogy kimutassák a szoros rokoni kapcsolatban álló állatfajok jelenlétét egy adott mintában vagyis, hogy a ló és szamár húsát kereskedelmi forgalomban lévő termékekben azonosítsák. A kutatók szükségesnek látták, hogy egy olyan módszert fejlesszenek ki, mely alkalmas a ló- és szamárhúsból származó maradékok detektálására, ugyanis egyes országokban sokan kifejezetten irtóznak e két húsféléttől (pl. Nagy-Britanniában). Az alkalmazott módszerben a primereket módosították, mivel így sikerült a reakciók specificitását növelni. Az így tervezett, fajspecifikus primerekkel sikeresen amplifikálták a citokróm b gént és ezáltal ló esetében 69 bp, szamár esetében pedig 119 bp szálhosszúságú ampliconokat eredményezve. A DNS specifikus primerek lóhús esetén 25 pg, a szamárhús esetében pedig 1 pg értékig voltak alkalmasak a vízben oldott minták vizsgálatára. A primereket sikeresen tesztelték olyan keverékeken is, melyek 4, 2 illetve 1 százalékban tartalmaztak ló- és szamárhúst. A vizsgálatot sikerrel alkalmazták kereskedelmi forgalomban lévő termékeken is.

Más kutatók is a citokróm b gént használták a kacsahússal, tőkésrécével (*Anas platyrhynchos*) és pézsmarécével (*Cairina moschate*) foglalkozó kísérleteikben. Ezeket a húsokat eddig csak

kivételes alkalmakkor fogyasztották, azonban az állattenyésztés jelenkori fejlődésének köszönhetően ezek a húsok egyre népszerűbbé válnak és így szükséges a kacsahúsok azonosítására szolgáló eljárásokat is kidolgozni. Végeredményben a kacsahúsból származó, 0,0001%-os DNS-tartalom kimutatását is lehetővé tette a valós idejű PCR-vizsgálat még a különböző feldolgozottságú, kereskedelmi forgalomban kapható termékekben is.

Sertéshús azonosítását célzó vizsgálatok a 12S rRNS gén mitokondriális fragmensének amplifikálásán alapult. A módszerrel a kétkomponensű, előzőleg sterilizált (20 percig 121 °C fokon hőkezelt) sertés/marha húskeverékekben már 0,5 %-os sertéshústartalom is kimutatható.

Szarvasmarha-, sertés-, bárány-, csirke- és pulykahúsból készült nyers keverékekből is sikeresen kimutatható már az egyik féle ha az 0,5%-ban van jelen.

Egyszálú konformációs polimorfizmus vizsgálat - PCR-SSCP

A PCR-SSCP eljárás lehető teszi a mutációk és a DNS-polimorfizmus kimutatását is. A vizsgálat során egy kétszálú DNS fragmenst savval amplifikálnak az elektroforézis előtt majd denaturálják egy denaturációs ágens (formamid vagy nátrium hidroxid) jelenlétében azért, hogy egyszálú DNS-t (ssDNS-t) kapjanak. Natív elektroforézis esetén az egyszálú DNS belső párokat hoz létre, mely specifikus konformációkat eredményez. A mutációkat vagy polimorfizmust tartalmazó egyszálú DNS-minták eltérő konformációkat eredményeznek, melyek a molekuláris mobilitás megváltozásával és a poliacrilamid gélen létrejövő eltérő mintázatokkal mutathatók ki.

A PCR-vizsgálattól, a denaturációtól és az elektroforézistől függően egynél több egyszálú DNS konformáció fordulhat elő. Azonban ha van kontroll mintánk, melyeket amplifikáltunk, denaturáltunk és elektroforézisnek vetettünk alá ugyanolyan körülmények között mint a vizsgálati mintákat, akkor lehetséges a fajok meghatározása.

Többek között a hőmérséklet határozza meg a konformációk kialakulásának minőségét és hatékonyságát. A magas hőmérséklet csökkenti a konformációkat és olyan kötéseket idézhet elő, melyek megnehezítik a kapott eredmények kiértékelését. A PCR-SSCP-eljárást rövid DNS-fragmensek esetében alkalmazhatjuk (95%-os kimutathatóság 100-300bp szálhosszúságú minták esetében), így az eljárás alkalmas magas hőfokon kezelt (sterilizált, pasztörizált) minták elemzésére.

A PCR-SSCP módszert makréla-félék vizsgálatára szintén sikeresen alkalmazták. A vizsgálatot 123 bp szálhosszúságú ampikonon végezték, melyet a citokróm b gén PCR segítségével történő multiplikációjának eredményeként kaptak. A vizsgálatot hét halmintán

végezték el, köztük két kétkomponensű húskeveréssel is. Hőkezelt termékeket is vizsgáltak, ami jelentős kihívást jelentett, ugyanis az ilyen termékek nagymértékben roncsolódott fehérjét és nukleinsavakat tartalmaznak. A PCR-SSCP módszer megbízhatóságát úgy mérték le, hogy nyolc európai laboratóriumban végezték el ugyanazokat a méréseket.

A vizsgált halakat (8 fajt) morfológiai szempontból azonosították majd kibelették és gőzben 90 percig párolták 102-103 °C fokon (a halminta belsejében a hőmérséklet körülbelül 65 °C fok volt). A lehűtést követően a vizsgált halakat kifilézték, a bőriket eltávolították és a mintákat fémdobozokba helyezték 2 g nátrium-klorid hozzáadásával, majd olajjal töltötték meg az edényt úgy, hogy az teljesen ellepje a húsmintákat. Ezt követően a konzervdobozokat lezárták 115 °C fokon sterilizálták 50 percen keresztül. A kóddal ellátott mintákat végül elküldték a kísérletben résztvevő laboratóriumoknak a megfelelő kontrollmintákkal együtt.

A kapott eredmények 90,3%-os arányban mutatták ki a vizsgált halakat. A résztvevő nyolc laboratórium közül kettő teljesen különböző kötésmintázatot kapott az elektroforetikus gélen. Ezeknek a különbségeknek az okai a PCR-vizsgálat, a denaturáció és az elektroforezis körülményeiben keresendő, melyek az egyszálú DNS egynél több konformációját eredményezhetik.

Mindazonáltal az így nyert mintázatok különbségeitől eltekintve a kapott eredmények lehetővé tették a fajok beazonosítását. Az egyedüli kivétel a kékúszójú tonhal (*Thunnus thynnus*) és a sárgaúszójú tonhal (*Thunnus albacares*) volt. Mindkét halfaj ugyanazzal a DNS-szekvenciával rendelkezik, ami magyarázza a gélen kimutatott azonos kötések. Továbbá az elvégzett vizsgálatok két tonhalfaj esetében (a csíkos hasú tonhal (*Katsuwonus pelamis*) és a atlanti bonító (*Sarda sarda*)) kimutatták az elektroforetikus mintázat intraspecifikus variációt is, melyek a két hal földrajzi előfordulásától függenek.

A PCR-SSCP módszert közeli rokonságban álló halfajok húsának azonosítása során is alkalmazták. A vizsgált családok és fajok: Anguillidae (*Anguilla anguilla*, *Anguilla japonica*, *Anguilla rostrata*, *Anguilla australis*), Salmonidae (*Salvelinus fontinalis*, *Salmo trutta*, *Oncorhynchus mykiss*, *Salmon salar*). Továbbá hőkezelt konzervként forgalmazott halak a következő családokból: Clupeidae (*Sardina pilchardus*, *Clupea harengus*), Gadidae (*Gadus morhua*) és Scombridae (*Scomber scombrus*, *Thunnus thynnus*, *Thunnus albacares*, *Thunnus obesus*, *Thunnus alalunga*, *Euthynnus alleteratus*, *Katsuwonus pelamis*, *Auxis thazard*, *Sarda sarda*). Vizsgáltak még olyan haltermékeket is, melyek nem tartalmaznak izomszövetet; azaz dolgoztak kaviárral, melyet az Acipenseridae halak családjába tartozó halakból nyertek. Ebben a vizsgálatban rövid, azaz 123 bp, 148 bp és 358 bp szálhosszúságú mintákat amplifikáltak. Mind a nyershús, mind pedig a konzervhal esetében sikeresen azonosították a

fajokat a PCR-SSCP-eljárással. A vizsgált halfajok mindegyike jellegzetes, fajspecifikus kötémintázatot eredményezett a gélen. Ezen felül a kaviármintákban is sikeresen azonosították az Acipenseridae halfélék egyes fajait.

A skandináv országokban, pl. Norvégiában vagy Izlandon, továbbá Görögországban, Kanadában és Japánban is a hagyományos étrend szerves részét képezi a különféle tengeri emlősök húsa. A fogyasztók nagyra becsülik az ilyen élelmiszertermékeket, viszont nem ritka, hogy a fókahúst bálnahúsként hozzák forgalomba, ahogy az sem szokatlan, hogy a tisztességtelen kereskedők veszélyeztetett állatok húsát viszik piacra.

Az SSCP és RAPD-vizsgálatok összehasonlítását is elvégezték, hogy kiderüljön melyik ad pontosabb eredményt. A vizsgálatok során a következő fajok húsát használták referenciamintaként: grönlandi fóka (*Phoca groenlandica*), kék bálna (*Balaenoptera borealis*), csukabálna (*Balaenoptera acutorostrata*) és közönséges barázdás bálna (*Balaenoptera physalus*). Továbbá a kísérletben szerepeltek olyan hústermékek is, melyek címkéjén a gyártók és forgalmazók ezeket a fajokat valamint további cetféléket tüntették fel. Ezeket a termékeket a grönlandi és norvég helyi üzletekben szerezték be. A referenciaminták vagy fagyasztott, vagy etanolban tárolt húsokat tartalmaztak. Az azonosításra szánt minták grönlandi fókából (szárított, füstölt, sózott és pácolt formában), csukabálnából (szárított formában), barázdás bálnából (szárított hús és izom formájában) származtak, melyeket általában bálnahúsként árusítanak (füstölt vagy pácolt formában). Vizsgáltak továbbá sózott bálnaolajat is.

Mind a RAPD és a SSCP-eljárásban a mitokondriális DNS citokróm b fragmensét amplifikálták és a PCR-RAPD vizsgálat előnyeiről számoltak be a PCR-SSCP vizsgálattal szemben.

7. Összegzés

A polimeráz láncreakción alapuló (PCR) módszereket gyakran alkalmazzák a hús és tejtermékekben megtalálható fajok azonosítására, éppen ezért ezek az eljárások alkalmasak lehetnek a regionális és tradicionális hústermékek eredetigazolására is, ha az összetevőket és azok arányát szeretnénk felülvizsgálni.

A PCR-vizsgálatok ilyen célú alkalmazása azért lehetséges, mert ezen eljárásokkal a különböző, sőt esetlegesen szoros rokoni kapcsolatban álló állatfajokat is ki lehet mutatni. Az eredetvizsgálatokat a nyers húsból és a különféle gyártási eljárásoknak alávetett húsmintákból származó mintákkal egyaránt el lehet végezni. A vizsgálatok viszonylagos egyszerűsége és

gyorsasága arra enged következtetni, hogy ezeket a DNS-vizsgálatokon alapuló módszereket a jövőben széles körben fogják alkalmazni az élelmiszerek minőségellenőrzése során. Mindazonáltal a PCR-vizsgálatokon alapuló módszerek megkérdőjelezhetetlen előnyei ellenére, nem szabad elfeledkeznünk néhány hiányosságról sem. Általánosságban elmondhatjuk, hogy a PCR-RAPD vizsgálat húskeverékek és magas hőfokon kezelt (sterilizált) termékek esetében a fajok azonosítására nem ajánlható. Néhány kutató szerint pedig a PCR-RLFP-vizsgálat sem alkalmas arra, hogy húskeverékek összetételét vizsgáljuk, mivel a kísérletek során kapott eredmények nem minden esetben tükrözik a keverékek valós összetételét. A PCR-RFLP vizsgálat során fenn áll annak a veszélye, hogy intraspecifikus különbségek fordulnak elő vagy pedig az emésztés nem maradéktalan és ez a restrikciós enzimek hasítóhelyének megjelenését vagy eltűnését eredményezheti. A PCR-SSCP és PCR-RAPD-vizsgálatok segítségével végzett fajazonosítás szükséges feltétele, hogy vizsgált mintákkal megegyező elektroforetikus gélen található referencia mintákkal rendelkezünk. A PCR-SSCP-vizsgálatok esetében a kapott eredmények megismételhetőségét befolyásolják azok a körülmények, melyek között a vizsgálatot végezzük, ilyenek például a felhasznált reagensek koncentrációja és hőmérséklete.

Hangsúlyozni kell végül, hogy habár a PCR-vizsgálatok az egyedüli olyan vizsgálati módszerek, melyek képesek az élelmiszertermékek összetételét kimutatni, a regionális és tradicionális hústermékek átfogó vizsgálata azonban más módszereket is magában foglal, mert csak ezekkel együttesen állapítható meg, hogy vajon a fogyasztó tényleg azt kapja-e, amit a termék címkézése ígér.

8. Felhasznált irodalom

- Arslan A., Ilhak O.I., Calicioglu M., 2006. Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. *Meat Science*. 72, 326-330.
- Carrera E., García T., Céspedes A., González I., Fernández A., Hernández P.E., Martín R., 1999 a. PCR-RFLP of the mitochondrial cytochrome oxidase gene: a simple method for discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79, 1654-1658.
- Carrera E., García T., Céspedes A., González I., Fernández A., Hernández P.E., Martín R., 1999 b. Salmon and trout analysis by PCR-RFLP for identity authentication. *Journal of Food Science*. 64, 3, 410-413.
- Céspedes A., García T., Carrera E., González I., Fernández A., Asensio L., Hernández P.E., Martín R., 2000. Genetic differentiation between sole (*Solea solea*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR-RFLP analysis of a 12S rRNA gene fragment. *Journal of Food Science*. 80, 29-32.
- Chisholm J., Conyers C., Booth C., Lawley W., Hird H., 2005. The detection of horse and donkey using real-time PCR. *Meat Science*. 70, 727-732.
- Colombo F., Marchisio E., Pizzini A., Cantoni C., 2002. Identification of the goose species (*Anser anser*) in Italian "Mortara" salami by DNA sequencing and a Polymerase Chain Reaction with an original primer pair. *Meat Science*. 61, 291-294.
- Council Regulation (EC) No 1898/2006 of 14 December 2006 laying down detailed rules of implementation of Council Regulation (EC) No 510/2006 on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 369, 1-19.
- Council Regulation (EC) No 509/2006 of 20 March 2006 on agricultural products and foodstuffs as traditional species guaranteed. *Official Journal of the European Union*, L 93, 1-11.
- Council Regulation (EC) No 510/2006 of 20 March 2006 on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 93, 12-25.
- Dooley J.J., Paine K.E., Garrett S.D., Brown H.M., 2004. Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science* 68, 431-438.

Fajardo V., González I., López-Calleja I., Martín I., Rojas M., Hernández P.E., García T., Martín R., 2007. Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Sci.* 76, 234-240.

Gąsiorowski M., 2006 a. Produkty z duszą [Food products with spirit]. *Agro Smak* 1, 4-6 [in Polish].

Gąsiorowski M., 2006 b. Ochrona produktów regionalnych i tradycyjnych [Protection of regional and traditional products]. *Agro Smak* 2, 4-7 [in Polish].

Gil L.A., 2007. PCR – based methods for fish and fishery products authentication. *Trends Food Sci. Technol.* 18, 558-566.

Girish P.S., Anjaneyulu A.S.R., Viswas K.N., Santhosh F.H., Bhilegaonkar K.N., Agarwal R.K., Kondaiah N., Nagappa K., 2007. Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism of mitochondrial 12S gene: A simple method for identification of poultry meat species. *Veterinary Research Communications.* 31, 447-455.

Greaser M.L., Krzesinski P.R., Warren C.M., Kirkpatrick B., Campbell K.S., Moss R.L. 2005. Developmental changes in rat cardiac titin/connectin: transitions in normal animals and in mutants with a delayed pattern of isoform transition. *Journal of Muscle Research and Cell Motility.* 26, 325-332.

Hird H., Chisholm J., Brown J., 2005. The detection of commercial duck species in food using single probe – multiple species – specific primer real-time PCR assay. *European Food Research and Technology.* 221, 559-563.

Hird H., Goodier R., Hill M., 2003. Rapid detection of chicken and turkey in heated meat products using the polymerase chain reaction followed by amplicon visualization with *visstra green*. *Meat Science.* 65, 1117-1123.

Hird H., Goodier R., Schneede K., Boltz C., Chisholm J., Lloyd J., Popping B., 2004. Truncation of oligonucleotide primers confers specificity on real-time PCR assays for food authentication. *Food Additives & Contaminants.* 21, 1035-1040.

Hopwood A.J., Fairbrother K.S., Lockley A.K., Bardsley R.G., 1999. An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken meat mixtures. *Meat Science.* 53, 227-231.

Matsunaga T., Chikuni K., Tanabe R., Muroya S., Shibata K., Yamada J., Shinmura Y., 1999. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science.* 51, 143-148.

<http://ecodevoevo.blogspot.com/2012/05/what-do-we-know-about-gregor-mendel-and.html>
<http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/gentechnologia/ch05s03.html>
http://hu.wikipedia.org/wiki/F%C3%A1jl:Gene_hu.png
<http://mek.oszk.hu/00500/00545/html/genhu2.htm>
<http://termtud.akg.hu/okt/10/5/2.htm>
<http://tudasbazis.sulinet.hu/hu/termesztudomanyok/biologia/biologia-11-evfolyam/a-sejtek-anyagcsere-folyamatai/a-genetikai-kod-es-a-feherjeszintezis>
<http://tudasbazis.sulinet.hu/hu/termesztudomanyok/biologia/biologia-12-evfolyam/egy-gen-által-meghatározott-jellegek-oroklodese/dominans-recessziv-oroklesmenet>
<http://www.behav.org/gene/pop/H-W/!!!start.htm>
<http://www.hamisitasellen.hu/fogyasztoknak/mit-jelent-az-elelmiszer-hamisitas-milyen-elelmiszer-a-hamis-elelmiszer-mit-tegyek-ha-hamis-elelmiszerre-bukkantam/>
<http://www.matud.iif.hu/2013/06/03.htm>
http://www.mozaweb.hu/Lecke-Biologia-Biologia_12-Egy_gen_által_meghatározott_tulajdonsag_oroklodese_allelikus_kolcsonhatasok-102643
http://www.mvsz.hu/m7vk/pop_16.html
http://www.nature.com/labinvest/journal/v81/n5/fig_tab/3780276f1.html

Jin L.-G., Cho J.-Y., Seong K.-B., Park J.-Y., Kong I.-S., Hong Y.-K., 2006. 18S rRNA gene sequences and random amplified polymorphic DNA used in discriminating Manchurian trout from other freshwater salmonids. *Fisheries Science*. 72, 903-905.

Koh M.C., Lim C.H., Chua S.B., Chew S.T., Phang S.T.W., 1998. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species. *Meat Science*. 48, 3/4, 275-285.

Komlósi I.- Veress L.: Általános állattenyésztés.

Lockley A.K., Bardsley R.G., 2000. DNA – based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology*. 11, 67-77.

Martinez I., Daniélsdóttir A.K., 2000. Identification of marine mammal species in food products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80, 527-533.

Matsunaga T., Chikuni K., Tanabe R., Muroya S., Shibata K., Yamada J., Shinmura Y., 1999. Napierała D., Kaczmarek M., Kalak R., Jura J., Słomski R., 2004. Wykrywanie mutacji punktowych i polimorfizmu DNA metodą SSCP [Detection of point mutations and DNA polymorphism using the SSCP method]. In: *Przykłady analiz DNA*. Ed. R. Słomski. Wyd. AR Poznań, 95-101 [in Polish].

Natonek-Wiśniewska M., Ząbek T., Słota E., 2007. Species identification of mammalian mtDNA using PCR-RFLP. *Annals of Animal Science*. 7, 2, 305-311.

Partis L., Croan D., Guo Z., Clark R., Coldham T., Murby J., 2000. Evaluation of a DNA finger- printing method for determining the species origin of meats. *Meat Science*. 54, 369-376.

Pascoal A., Prado M. Castro J., Cepeda A., Barros-Velázquez J., 2004. Survey of authenticity of meat species in food products subjected to different technological processes, by means of PCR-RFLP analysis. *European Food Research and Technology*. 218, 306-312.

Quinterio J., Sotelo C.G., Rehbein H., Pryde S.E., Medina I., Pérez-Martín R.I., Rey-Mendez M., Mackie I.M., 1998. Use of mtDNA direct polimerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 1662-1669.

Rehbein H., Kress G., Schmidt T., 1997. Application of PCR-SSCP to species identification of fishery products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 74, 35-41.

Rehbein H., Mackie I.M., Pryde S., Gonzales-Sotelo C., Medina I., Perez-Martin R., Quinteiro J., Rey-Mendez M., 1999. Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: validation by a collaborative study and investigation of intra-species variability of the DNA-patterns. *Food Chemistry*. 64, 263-268.

Rehbein H., Mackie I.M., Pryde S., Gonzales-Sotelo C., Perez-Martin R., Quinteiro J., Rey-Mendez M., 1998. Comparison of different methods to produce single-standard DNA for identification of canned tuna by single-standard conformation polymorphism analysis. *Electrophoresis* 19, 1381-1384.

Rodríguez M.A., García T., Gonzalez I., Hernández P.E., Martín R., 2005. TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. *Meat Science*. 70, 113-120.

Russel V.J., Hold G.L., Pryde S.E., Rehbein H., Quinteiro J., Rey-Mendez M., Sotelo C.G., Perez-Martin R.I., Santos A.T., Rosa C., 2000. Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 2184-2188.

Saez R., Sanz Y., Toldrá F., 2004. PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Science*. 66, 659-665.

Schwägele F., Stirtzel S., Andrée S., 2007. Authentication of domestic poultry species in meat and meat products. In: *Proceedings of 53rd Intern. Congress Meat Sci. and Technol. Beijing, China*, 617-618.

- Słomski R., Szalata M., Napierała D., Kaczmarek M., Kowalska K., Wielgus K., 2004. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) [Polymerase chain reaction (PCR)]. In: Przykłady analiz DNA. Ed. R. Słomski. Wyd. AR Poznań, 79-89 [in Polish].
- Spychaj A., Mozdziak P.E., Pospiech E. Identification of poultry meat from pork and beef on the basis of the titin PEVK region using PCR. *J. Muscle Foods* [in press].
- Szabad János (1988.). „Mozaikok és kimérák”. *Scientific American (magyar kiadás)* (2), 59-62. o.
- Tanabe R., Muroya S., Nakajima I., Chikuni K., Nakai H., 1997. Skeletal muscle connectin primary structures as related to animal species and muscle type. *Journal of Food Science*. 62, 451-454.
- Unsel M., Beyermann B., Brandt P., Hiesel R., 1995. Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *PCR Methods Applications*. 4, 241-243.
- Warren C.M., Krzesinski P.R., Greaser M.L., 2003. Vertical agarose gel electrophoresis and electroblotting of high molecular weight proteins. *Electrophoresis* 24, 11, 1695-1702.
- Wolf Ch., Rentsch J., Hübner P., 1999. PCR-RFLP Analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 1350-1355.
- Wolko Ł., Witucka-Wall H., Siemieniako B., Wolko B., Słomski R., 2004. Poszukiwanie markerów cech użytkowych metodą RAPD-PCR [Searching of markers of applied traits using the RAPD-PCR method]. In: Przykłady analiz DNA. Ed. R. Słomski. Wyd. AR Poznań, 185-191 [in Polish].
- Zin J., 2005. Szanse dla regionalnych i tradycyjnych przetworów mięsnych [Perspectives for regional and traditional meat products]. *Gosp. Mięsna* 10, 26-28 [in Polish].

9. Egyéb DNS alapú módszerek pontmutációk vizsgálatához, eltérő szekvenciák azonosításához

9.1. PCR heteroduplex analízis

A heteroduplex analízis, hasonlóan a PCR SSCP technikához, egy gyakran használt elektroforézisen alapuló mutáció-detektálási metodika. Számos esetben együtt alkalmazzák a két módszert. Mindkettőnek előnye az alacsony beruházási költség, a metodika egyszerűsége, a kimutatás érzékenysége és a vizsgálati mintánként felmerülő kis fogyóeszközköltség. Hátrányként azt lehetne említeni, hogy minden egyes kimutatást (géneenként, mutációnként) adaptálni kell az adott laboratóriumi körülményekhez (elektroforézis rendszer, reagensek). Egy részletesen leírt protokoll két különböző laborban történő kivitelezése nem pontosan ugyanazt a gélképet eredményezi, habár az nem szükségszerű, hogy ez csökkenti a detektálás hatékonyságát.

A kimutatás azon az elven alapul, hogy a teljesen komplementer DNS szálak az egyszálúsítás után egymással homoduplexeket képeznek, míg a nem teljesen komplementer, vagyis attól egy vagy néhány bázisban eltérő szálak heteroduplexet alkotnak. A gyakorlatban ez úgy játszódik le, hogy a PCR során felszaporított fragmenseket magas hőmérsékleten denaturáljuk (95 °C), majd hűtjük, miközben lejátszódik a kettős szálak kialakulása. Egyes protokollok lassú, egyenletes hűtést tartanak kedvezőnek (vízfürdőben, PCR készülékben), míg mások a gyors eljárást részesítik előnyben (hűtés szobahőmérsékleten, esetleg jégen). Amennyiben a vizsgálati minta genotípusa heterozigóta, vagyis két különböző allélt hordoz az egyed, úgy a heteroduplexek kialakulhatnak úgy is, hogy mindössze a vizsgálati minta DNS-e vesz részt a protokollban. Természetesen ezek mellett kialakulnak homoduplexek kettős szálak is. Gyakori eljárás, hogy nem önmagában a vizsgálati minta PCR terméke van jelen, hanem a PCR után összekevernek egy ismert genotípusú homozigóta mintát a vizsgálati mintával és így alakítanak ki hetero-, illetve homoduplexeket. A poliakrilamid gélen történő migráció során a heteroduplexek lassabban haladnak, mint a homoduplexek, így azok elkülönülnek. A kisebb távolság megtételének az oka a heteroduplex alakjában keresendő: a nem komplementer részeknél megjelenő hurok, konformáció-változás lassítja a migrációt. Az előforduló mutáció típusa alapvetően meghatározza a heteroduplex stabilitását, a szubsztitúció, azaz a báziscsere okozta eltérés kimutatása több optimalizációt igényel, ellenben a deléció és a beékelődés megjelenése biztosabban detektálható.

PCR heteroduplex felhasználása fajazonosításhoz (példa alkalmazott metodikára)

Több tanulmány bizonyította, hogy a mitokondriális citokróm b génre tervezett heteroduplex analízis lehetőséget ad mind a közeli rokonságban álló, mind nem rokon fajok elkülönítésére. A gén szekvenciája számos faj esetén ismert, így széles körben használható eredetigazolással kapcsolatos vizsgálatokban. Heteroduplexek kialakításakor felmerül a kérdés, hogy milyen mintával történjen a duplex képzése. Ez lehet ember, illetve más faj is, de amennyiben a kontroll PCR termék olyan fajtól származik, amely az ételmisszerben is előfordulhat, úgy abban az esetben kizárólag homoduplexek kialakulásával lehet számolni. Természetesen a kontroll PCR termék szekvenciájának pontos ismerete elengedhetetlen.

Érdekes kérdés a detektálhatóság alsó határa, amit a vizsgálati metodika mellett befolyásol a vizsgált gén, illetve a faj. A citokróm b heteroduplex elemzésekor 10 fg kiindulási DNS elegendő volt a legtöbb emlősfaj és a házityúk azonosítására. Alacsonyabb rendű élőlényeknél egy-két nagyságrenddel nagyobb mennyiségű DNS-re van szükség.

9.2. PCR hőmérséklet grádiens gélelektroforézis (TGGE) és denaturáló grádiens gélelektroforézis (DGGE)

A PCR TGGE és DGGE igen hasonló mutáció-detektálási módszerek. Szemben az SSCP-vel, ahol egyszálú DNS mobilitását vizsgáljuk, ezek a módszerek részlegesen egyszálú fragmentek migrációján alapulnak. A mutáns és a vad típusú egyed/minta közötti eltérés azon alapszik, hogy a kezdetben kétszálú PCR fragment mikor kezd részlegesen egyszálúvá válni. Amint ez a nyitódás elkezdődik, úgy lassul le a DNS vándorlási sebessége a poliakrilamid gélben. A két DNS szál teljes denaturációját a PCR során alkalmazott speciális primer/primerek akadályozzák meg. Ez a primer, a komplementer szakasz mellett egy 30-50 bázispár hosszúságú guaninból és citozinból álló fragmentet is tartalmaz, melynek a szerepe, hogy a hármas hidrogénhid kötésekkel egyben tartja a két szálát, mely az ellenkező végén kezd kinyílni, így mintegy Y alakzatot vesz fel a PCR termék. Előfordul olyan applikáció, amikor a fragment mindkét végére GC clamp-et tartalmazó primer kerül, ilyen esetekben az olvadás a fragment középső részében kezdődik, majd az szélesedik és végül ovális/kör alakzatot vesz fel.

Hasonlóan az SSCP-hez és a heteroduplex analízishez, ezek a módszerek is kis eszköz-igényűek, költségtakarékosak és megfelelő optimalizációt követően, közel 100%-os hatékonysággal mutatják ki egy, illetve néhány bázist érintő mutációk jelenlétét.

Mind a DGGE, mind a TGGE az olvadási pont és a GC szakasz tervezése folytán kissé komplikáltabb az SSCP-től.

A PCR TGGE esetében az elektroforézis során térben folyamatosan változik a hőmérséklet, úgy hogy a mintafelviteli hely közelében alacsonyabb, majd attól távolodva egyre melegebb a gél. Az elválasztáshoz ideális hőmérséklet-tartományt szoftverek segítségével lehet megtervezni. A TGGE-hez igencsak hasonlít az ún. PCR TTGE (temporal temperature gradient gelelectrophoresis) protokoll, melynél a hőmérsékleti tartomány nem a gélben változik, hanem a futtatási idő előrehaladtával növekszik (pl. $0,1^{\circ}\text{C}/10$ perc). A DGGE denaturáló gélt jelöl, melyben fentről lefelé nő a poliakrilamid gélben lévő denaturáló komponens koncentrációja. Denaturáló ágensként általában a karbamidot vagy a formamidot használják.

PCR TGGE és DGGE gyakorlati alkalmazhatósága eredetigazolásra

Termékhamisításkor a leggyakrabban előforduló jelenség, hogy egy értékesebb, drágább terméket egy alacsonyabb áruval helyettesítenek részben vagy teljesen. Halaknál, haltermékeknél előfordulhat, hogy a lazacot szivárványos pisztráng húásával hamisítanak/helyettesítenek. A termék eredetének felismerésében, illetve egyes fajok kizárásában szerepe lehet a vizuális vizsgálatnak. A pisztráng húsa világosabb a lazacétól, így nyerstermék esetén felismerhető lenne a hamisítás, ezért előfordult, hogy festékanyagot adtak a pisztrángok takarmányába, amely sötétítette annak húsát. Ez az eset is indokolja megbízható laboratóriumi módszerek kidolgozását.

A citokróm b génre tervezett PCR primerek (egyik GC clamp-et hordoz) azonos méretű amplicont adhatnak lazacra és szivárványos pisztrángra is, mely a gradiens elektroforézis technikánál nem bír jelentőséggel, mivel a diszkrimináció alapja a bázissorrend. A kifejlesztett módszer hatékonysága nem tartozik a legérzékenyebbek közé, a 100%-os hatékonyságú detektáláshoz minimum 20%-os pisztráng jelenlét kellett. A vizsgált keverék a két faj húsából izolált DNS összekeverésével került beállításra. A pisztráng DNS 1%-os előfordulása az esetek kisebb hányadában adott pozitív eredményt. Más halfajok azonosítása során megerősítették azt a tényt, hogy DGGE módszerrel kimutatható az a kismértékű változás a fragment olvadási doménjében, amelyet akár egyetlen pontmutáció eredményez.

Bizonyos esetekben a vizsgált mutációra specifikusabb sávokat eredményezhet a DGGE, mint az SSCP módszer. DGGE esetében is, mint a hasonló SNP okozta elektroforetikus mobilitás megváltozására alapozott technikáknál, több sávmintázattal találkozhatunk egy adott fajon belül is. Ez az értékelést megzavarhatja, mindaddig, amíg minden mintázathoz nem tudunk pontos DNS szekvenciát rendelni. A nagyobb beruházásigényű és mintánként nagyobb költségű szekvenálásnál mindez kiküszöbölhető.

10. Proteomikai módszerek alkalmazási lehetőségei az élelmiszerek eredetének igazolásában

10.1. A proteomika, mint tudományterület

A proteomika egy olyan tudományág, mely a biológiai mintában jelenlévő teljes proteomot vizsgálja. A proteom szó egy adott pillanatban expresszáldó proteinek és azok módosulásainak összességét jelenti, melyet értelmezhetünk a teljes organizmusra, szövetre, illetve sejtre is.

A molekuláris biológiai eszköztárban a proteomika a genomika, transzkriptomika és metabolomika mellett helyezkedik el. A genomika DNS szinten vizsgálja az eltéréseket, a DNS bázissorrenddel, a pontmutációk leírásával foglalkozik. A transzkriptomika, a transzkriptommal, vagyis a genetikai állományról expresszáldó RNS-eket azonosítja és mennyiségi meghatározást végez. A metabolomikának az „omikák” között egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak a kutatók. A tudományterület a metabolom-ra, kis méretű molekulák vizsgálatára fókuszál. Ezen molekulák lehetnek kiindulási, intermedier és reakciók végtermékei is, többségükben cukrok, aminosavak, nukleinsavak, hormonok, lényegében azok a molekulák, melyek mérete 1 kDa alatti.

Az élelmiszerekkel és az élelmiszeripari nyersanyagok előállításával foglalkozó tudományos közleményekben az elmúlt évtizedben kezdett erőteljesen növekedni a proteomikai alkalmazások száma. A humán-egészségügyi kutatásokban már korábban teret nyert a proteomikai eszköztár, mint biomarkerek keresésében és leírásában alkalmazható hatékony megközelítés.

A proteomika, illetve azon belül az állati eredetű élelmiszer-előállítás proteomikai kutatásának intenzitása jól jellemezhető a nemzetközi publikációs adatbázisok keresési találatáival. A PubMed adatbázis, mely főként a biológiai kutatások és egészségügy témakörbe tartozó folyóiratokat foglal magába, több, mint 66 ezer közleményt talál a proteom* kifejezésre, míg a ScienceDirect, egy szélesebb tematikájú, tudományterületű

adatbázis, több, mint 96 ezer rekordot közöl. Az első közlemények a 90'-es évek közepére tehetőek. A gazdasági állatfajok proteomikai publikációi a PubMed adatbázis alapján legmagasabb számú a házi tyúknál (173 közlemény), követi a szarvasmarha (141 közlemény), sertés (124 közlemény) és a juh (87 közlemény). A sertés (70 közlemény), szarvasmarha (58 közlemény), házi tyúk (46 közlemény) és juh (41 közlemény) a kvantitatív sorrend a ScienceDirect oldalon. Ezek a számok is érzékeltetik azt a hozzávetőlegesen 1% körüli arányt, amit a gazdasági állatfajok proteomikai kutatása elfoglal a teljes tudományterületen belül.

10.2. Leggyakoribb proteomikai metodikák rövid ismertetése

A proteomikai módszerek többségükben gél alapú vagy folyadék kromatográfia alapú elválasztástechnika után tömegspektrometriai elemzést jelentenek.

A munka lépései alapvetően az élelmiszerminták proteinjeinek szeparálása, azonosítása és mennyiségi elemzése. A következőkben ezek az eljárások kerülnek ismertetésre.

A szeparálás a munka essenciája, nélkülözhetetlen a komplexitás folytán: a szövetminták, értsük ez alatt az élelmiszermintát, több ezer, illetve több tízezer közötti expresszált egyedi proteint tartalmaz. Amennyiben figyelembe vesszük a poszttranszlációs módosulásokat ez a szám 50 000 – 100 000 közé tehető. A szeparálási eljárás lehet szelektív és nem szelektív. A szelektív szeparálás célja egy adott fehérje elkülönítése egy protein-komplexből, melynek elve a fehérjekötődés specifikusságában vagy valamilyen biokémiai tulajdonságában rejlik. A nem szelektív szeparálás olyan eljárás, amelynél a proteom összességét kívánjuk vizsgálni, így valójában az adott mintában jelenlévő egyedi fehérjéket frakcionáljuk. A frakcionálás történhet izoelektromos pont, szubcelluláris frakció, méret, oldhatóság és egyéb proteinekre jellemző karakterek alapján.

Ezek az eljárások arra törekednek, hogy ideális esetben minden egyes protein elkülöníthető legyen a többitől. Ilyen, az esetek többségében igen nehezen érhető el, ebből következik, hogy számos technika hiába képes valamilyen szinten megbontani a minta komplexitását, azonban önmagában nem elegendő szeparálást eredményez, így a proteomikai munkában csak csatoltan, más eljárással együtt vezet eredményhez. A legfontosabb követelmény ezekkel a módszerekkel szemben a nagy felbontóképesség.

10.2.1. Egy- és kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (1D PAGE, 2D PAGE) a proteomikában

Az egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézis során a protein komplex (vizsgálati minta) fehérjei méretük szerint kerülnek elkülönítésre, az alapján, hogy miként vándorolnak a gélben az elektromos erőtér hatására. Ez az eljárás jelen van a kétdimenziós elektroforézisnél (2D PAGE) is, melynél azt megelőzi egy izoelektromos pont szerinti elválasztás-technika.

Az elektroforézissel történő fehérje-elválasztás elve azon alapszik, hogy a töltéssel rendelkező molekulák a létrehozott elektromos erőtérben a töltésükkel ellentétes irányban közlekednek. Amennyiben a folyamat poliakrilamid gélben történik, a különböző pórusméret folytán az egyedi fehérjék a molekulatömegük alapján tesznek meg rövidebb, illetve hosszabb utat.

A poliakrilamid gélben futtatott fehérjék, nem a töltésük alapján közlekednek. A denaturált fehérjéket detergenssel kezeljük, ami a leggyakrabban az SDS (sodium dodecyl sulphate) és ez a polipeptid láncnak negatív töltést ad. A kisebb polipeptidek kevesebb SDS-t kötnek meg, míg a nagyobbak többet, következésképpen a töltéssűrűség azonos lesz mindegyik protein esetében. A poliakrilamid gél pórusmérete alapvetően a gél akrilamid koncentrációjától függ, de befolyásolja a migrációt a keresztkötésekért felelős bisz-akrilamid jelenléte is.

A fehérjék töltés szerinti elválasztása az izoelektromos fókuszálás során játszódik le. Az izoelektromos fókuszálás (IEF) a 2D PAGE első dimenziója. Az izoelektromos fókuszálás során a fehérjék rendeződése független azok tömegétől. A mintában található fehérjék elektroforézise egy pH gradiensben történik, melynek során minden egyes fehérje a számára semleges, vagyis ahol töltésük nulla, izoelektromos pontba vándorol. Ebben a pontban a protein izoelektromos pont értéke megegyezik az ott található pH értékkel. A savas és bázikus aminosavak jelenléte határozza meg egy-egy fehérje számára semleges pH értéket. A folyamathoz jellemzően immobilizált pH gradiens géleket használnak, ami szintén poliakrilamid gél alapú rendszer. Manapság az izoelektromos fókuszálás hatékonysága eléri a 0,001 pH egységet, így már az egy ezrelék pH értékben eltérő fehérjéket is sikeresen különválasztja.

Az izoelektromos fókuszálást szinte minden esetben az SDS PAGE követi, azonban van egy olyan eljárás, ahol közvetlenül tömegspektrometriai (MS – mass spectrometry) analízis következik az IEF után. Ez az IEF-MS. A módszer elve, hogy a töltésük alapján szétválasztott proteinkomplex olyan kisebb proteinhalmazokat jelent, amelyekben a méret széles spektrumot

vesz fel, míg az izoelektromos pont állandó. Ezeknek egy tömeg szerinti listázását végzi el a tömegspektrométerrel történő vizsgálat. Következésképpen egy virtuális második dimenziós futtatás zajlik le.

A gélben található fehérjék festése, így láthatóvá tétele többféle protokollal lehetséges. Gyakori a coomassie blue festék, mellyel a jelölés egyszerű, kompatibilis az esetleges későbbi tömegspektrometriai eljárásokkal, azonban hátránya a magas kimutatási határ vagyis a kis koncentrációban jelenlévő fehérjék (kis méretű folt a gélen) láthatatlanok maradnak. Az ezüsttel (ezüst-nitrát) történő festés érzékeny, kivitelezése több lépéses folyamat. Ezüstfestés esetén létezik tömegspektrometriával kompatibilis és nem kompatibilis metodika is. A fluorescens festékek előnye az alacsony detektálási limit, hátránya a detektor igény. Az utóbbi időkben kifejlesztett metodika a DIGE (difference gel electrophoresis), melynek nagy előnye, hogy ugyanazon gélben futtatunk egy kontroll és egy kísérleti mintát, így a gélek száma feleződik és a gélek közötti variabilitást is csökkenti. A DIGE három fluorescens festéket használ, így lehetőség van egy belső standard használatára, mely a kontroll és kísérleti minta mellett minden gélen jelen van és proteomja az összes mintát reprezentálja, mivel számos, illetve az összes minta összekeveréséből állítják elő.

A kétdimenziós gélelektroforézis széles körben használt proteomikai megközelítés, azonban ennek is vannak korlátai. A módszer alkalmazásának első időszakában az ismételhetőség okozott komolyabb nehézségeket, a mai rendszerekben még jelenlévő korlát az szeparálás hatékonysága. Az izoelektromos pont és tömeg alapján berendeződött fehérjék a poliakrilamid gélen foltként jelentkeznek. Ideális esetben egy folt egy fehérjét jelentene, azonban gyakran több fehérje is jelen van a foltban. Ez a jelenség egyértelmű problémát jelent, amennyiben a munka expressziós megközelítést, vagyis mennyiségi meghatározást céloz meg. Jellemzően nem sikerül a biológiai minta teljes proteomját vizsgálnunk 2D PAGE-el, általában annak a töredékét láthatjuk a gélen. A minta típusától függően ezek száma a néhány tíztől a néhány százig terjed, esetleg eléri az ezret.

10.2.2. A folyadékkromatográfia alkalmazása a proteomikában

A kromatográfias eljárásoknál két fázissal találkozunk, álló fázissal és mozgó fázissal. A minta komponensei kölcsönhatásban állnak mind az oldószerrel, mind az álló fázissal, az affinitásuk a különböző fázisokhoz eltérő, ami az elválasztás alapját adja. A fehérjeszeparálási metodikák, melyek nem használnak gél mátrixot, jellemzően kromatográfias eljárások,

melyeknél az oldószerben található proteinek affinitása adja a mozgásuk gyorsaságát. Azok a fehérjék, melyek a legkevésbé kötődnek az álló fázishoz, nem kötődnek ki az oszlopra, gyorsan mozognak és inkább a mozgó fázisban maradnak. Az eredmény a vizsgálati minta számos frakciója, melyek eluálhatóak és egyedileg legyűjthetőek. A számos kromatográfiás eljárás közül a folyadék kromatográfiát használják proteomikában, mivel ez a tömegspektrometriával kompatibilis és sokoldalúan alkalmazható technika. A gél alapú proteomikai metodikákkal szemben előnye, hogy fehérjéket és peptideket is képes elválasztani. Azon lehetőség mellett, hogy a gél alapú rendszerek helyett használjuk, lehetőség van arra is, hogy a gélelektroforézis előtti vagy utáni lépésbe beiktassuk. A 2D PAGE elé beiktatva prefrakcionálható a minta, ami a felbontást nagymértékben megnöveli, amennyiben a 2D PAGE után visszük fel a fehérjefolt proteinjeit folyadék kromatográfiára, úgy az abban található fehérjék egymástól elválaszthatóak, és egyedileg azonosíthatóak lesznek. A következőkben néhány, különböző elven működő elválasztás, úgy mint affinitás kromatográfia, ioncserés kromatográfia, méretkizárásos kromatográfia, reverz fázisú kromatográfia és multidimenziós kromatográfia kerül rövid bemutatásra.

- Affinitás kromatográfia

Az affinitás kromatográfia egy szelektív elválasztástechnika, mivel a fehérjéket a ligand-kötő affinitásuk alapján választja el. Az oszlopban lévő ligandok szerint megválasztható a folyamat specifikussága. Az oszlopról történő eluálás nem grádiens, hanem jellemzően két lépéses folyamat. Első eluátumban megjelennek mindazon fehérjék, amelyek nem mutattak affinitást, így nem kötődtek ki az oszlophoz, míg a második fázisban azok a fehérjék jönnek le, melyek kölcsönhatásba léptek oszlopban lévő mátrixal. Speciális formája az affinitás kromatográfiának, amikor az álló fázishoz antitestet kötnek ki és így a komplex mintából lehetséges egyetlen protein vagy peptid izolálása is.

- Ioncserés kromatográfia

A grádiens elválasztás alapja a fehérjék töltése. A reverzibilis folyamat során, a töltéssel rendelkező kémiai csoportokat tartalmazó álló fázishoz kötődik az oldatban lévő fehérje, majd az oszlopról történő eluálás változó ionerősségű oldattal játszódik le.

- Méretkizárásos kromatográfia

A méret szerinti elválasztás során kémiai interakció nem játszódik le a molekulák és az álló fázis között. A folyamat elve, hogy a kisebb méretű proteinek bejutnak az oszlopban lévő

porózus gyöngyök belsejébe, így azon keresztül lassabban haladnak át. Ezzel szemben a nagy méretű proteinek nem lépnek be a gyöngyökbe, hanem azok között közlekedve gyorsan haladnak, így hamarabb átjutnak az oszlopon.

- Reverz fázisú kromatográfia

A reverz fázisú kromatográfia (jellemzően HPLC-hez csatolva) az egyik leggyakoribb applikáció a proteomikában. Előnye a nagy felbontás. A folyamat során reverzibilis adszorpció játszódik le, a proteinek és peptidek az álló fázishoz kötődnek és a frakcionálást a grádiens eluálás biztosítja. A fehérjék hidrofób jellege határozza meg az adszorpció fokát.

- Multidimenziós kromatográfia

A proteomikai munka eredményességét jelentősen megnöveli, amikor a gél alapú eljárásokkal együtt kerül beállításra a folyadékkromatográfiás szeparálás. Bizonyos fehérjék, úgy mint membrán proteinek, bázikus fehérjék, vizsgálata nehezen kivitelezhető gél alapú eljárásokkal, ilyen esetekben a kromatográfia indokolt. A multidimenziós kromatográfia több kromatográfiás szeparálási módszert használ, így elérhető az a felbontás, amit a nagyméretű gélen végzett 2D PAGE eredményez. Ilyen alkalmazás például a reverz fázisú HPLC, mely esetben először a hidrofób jellemzők alapján, majd méret szerint történik a frakcionálás.

10.2.3. Fehérjeazonosítási módszerek

A különböző, korábban ismertetett elválasztási metodikák megbontják az élelmiszer minta proteomjának komplexitását és számos frakciót, egyedi fehérjefoltot eredményeznek. Ezekből azonosítani kell a konkrét fehérjéket, peptideket. Az erre alkalmas módszerek közül leggyakrabban az antigén-antitest kölcsönhatáson alapuló módszerekkel, illetve a tömegspektrométerrel történő azonosítással találkozhatunk.

Fehérjeazonosítás antitesttel

Az antitest fehérjék képesek felismerni bizonyos fehérjéket, ezen felismerésben az epitópok játszanak alapvető szerepet. Egyes epitópok annyira egyediek, hogy csak egy adott proteinre jellemzőek, míg mások valamely fehérjecsalád jellemzői (glikoproteinek, foszfoproteinek). Metodikailag léteznek immunoblottoláson (Western blot), immunoprecipitáción, antitest array-en, enzim-kapcsolt immunoassay-en (ELISA) alapuló megoldások az antitesttel történő azonosításokra. Összességében, az antitesttel történő megközelítése a proteom-analízisnek azt

a hátrányt hordozza, hogy amíg egy-egy konkrét protein felismerése technikailag kiválóan megoldott, addig egy teljes proteom analízise csak egy összetett assay alkalmazásával lehet lehetséges. Mindezen túl, ugyanazon fehérjének a posztranszlációs módosulatainak azonosításához is külön antitestekre volna szükség.

Fehérjeazonosítás tömegspektrométerrel

A tömegspektrometriai mérés jelentős beruházásigényű eljárás, mely a mai korszerű analitikában megkerülhetetlen fontosságú. A vizsgálat során – vákuumban – ionos részecskéket mérünk, pontosabban meghatározzuk a fajlagos tömegüket. A fajlagos tömeg a tömeg/töltés arányát jelenti (m/z). Az ionintenzitás folyamatos mérése során meghatározzuk az ionáram intenzitás és fajlagos tömeg kapcsolatát, azaz az úgynevezett tömegspektrumot.

Általában tripszinnel emésztett fehérjék peptidjeinek tömegmérése folyik a proteomikai vizsgálatok során.

Az intakt peptid ionok vizsgálatához olyan ionizációs technikákra van szükség, melyek számottevő fragmentálódás nélkül képesek azokat előállítani. Ilyen eljárások a MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) és az ESI (electrospray ionization). Ezeket csatolják a különböző típusú tömegspektrométer analizátorokhoz: TOF (time of flight), TQ (triple quadrupole), ioncsapda.

10.3. Élelmiszerekből és élelmiszeripari alapanyagokból történő fajazonosítási lehetőségek fehérjealapú vizsgálati módszerek alkalmazásával – módszerek alkalmazhatósága és korlátaik

A fehérje alapú élelmiszervizsgálatoknál olyan protein biomarker választása szükséges, amely megfelelő hőstabilitással rendelkezik, vagyis annak vizsgálata a szokásos hőkezelés (főzés, sütés, egyéb ipari technológiai folyamat) után is lehetséges. Hőkezelés után az SDS poliakrilamid gélelektroforézissel elválasztott fehérjesávokból számos eltűnik, amennyiben ugyanazon húsminta hőkezelés előtti sávmintázatával összehasonlítjuk. Ennek az oka, hogy a legtöbb oldható, így fehérjemódszerekkel vizsgálható, fehérje denaturálódik és oldhatatlan lesz. Ez a jelenség függ az alkalmazott kivonószertől is. Bizonyos esetekben (pl. urea/thiourea extrakció) előfordulhat, hogy a hőkezelés több proteinsávot eredményez. Az ideális biomarker fehérje mind a nyers alapanyagban, mind a technológiailag feldolgozott formában hasonló intenzitással jelen van. Az osteocalcin egy „hőstabil” fehérje, mely bizonyos esetekben magas

hőmérsékleten (100 °C felett) kezelt élelmiszerekből is vizsgálható. Az osteocalcin mellett a troponin is lehet fajspecifikus biomarker hőkezelt hústermékek vizsgálata esetén. A csont eredetű kollagén kiváló „hőstabil” marker, ez esetben szintén limitáló faktor az lehet az a tény, hogy a vizsgálati mintának tartalmaznia kell kollagént.

Minden olyan fehérje alapú fajazonosítási metodika korlátozott mértékben tudja elkülöníteni egymástól a közeli rokonságban lévő állatfajokat, melyek nem az aminosav szekvenciában meglévő különbségek kimutatásán alapulnak. Természetesen ilyen esetekben követelmény, hogy a vizsgált protein, illetve annak a vizsgált fragmentje, fajon belül konzervatív legyen, így különböző fajták, alfajok esetén eltérés ne forduljon elő.

A szekvencia ismerete, pontosabban ismeretének hiánya gyakran kiejt egy potenciális biomarkert a fajazonosítási munkából. Néhány állatfaj esetében ismert a teljes genom, számos, az emberek által fogyasztott állatnál csak a fehérjék töredékéről vannak információk az adatbázisokban. Amint megszűnnek ezek az akadályok és az élelmiszer-előállításban résztvevő fajok minden proteinjéről rendelkezünk a szükséges információkkal, úgy az azonosítható fajok és protein biomarkerek tárháza is bővülni fog.

Az elterjedt és könnyen kivitelezhető PCR alapú DNS módszerekkel szemben, illetve mellette azért is alternatíva lehet a proteomikai megközelítés, mivel bizonyos esetekben a megfelelő minőségű DNS kivonása a mintamátrix típusának függvényében eltérő módszert igényel. Ez a számos, egymástól jelentősen eltérő mintatípus gyakran a mintatisztítás optimalizációját igényli, ami a módszer költséghatékonyágát rontja. E mellett még fontos szempont az a tény, hogy bizonyos esetekben az élelmiszer feldolgozás, gyártás, előállítás során a fehérje aminosav-szekvenciája ellenállóbb, a polipeptidlánc kevésbé degradálódik, összehasonlítva a DNS-el.

10.3.1. Immunoassay-k alkalmazása fajazonosításra

Az antigén-antitest reakción alapuló technikák előnye, hogy megfelelő érzékenységgel bírnak, használatukkal rövid idő alatt nagy mintaszám vizsgálatát lehet elvégezni. A gyakorlati alkalmazhatóságukat két fontos tényező gátolhatja, az egyik probléma a rendszertanilag közeli rokonságban lévő fajok elkülönítését jelenti. A keresztreakció folytán a módszer gyakran nem működik, ez a jelenség baromfi fajoknál kifejezetten jelentkezik. A másik hátránya a

metodikának, hogy szemben az élelmiszeripari alapanyag (pl. hús) vizsgálattal, a feldolgozott termékek esetében a feldolgozás során sérülhet a fehérjék harmadlagos szerkezete, amely meghiúsítja a specifikus protein antitesttel történő felismerését.

ELISA eljárással különböző fajok húskeverékéből az elért legalacsonyabb kimutatási határ 0,05-1% tartományba tartozik, azonban ez nem érhető el minden immunoassay, illetve antitest esetén. A monoklonális antitestek alkalmazása növeli a kimutatás specificitását, azonban a rutinszerű alkalmazását nehezíti a magasabb költségek, és a tény, hogy a keresztreakciók esetleges előfordulása itt sem zárható ki. Alacsony kimutatási határ poliklonális antitestekkel érhető el, mivel ezek a monoklonálishoz képest erősebb komplexet képeznek.

10.3.2. Gélelektroforézis alkalmazása fajazonosításra

Mind az egydimenziós, mind a kétdimenziós gélelektroforézis eredményezhet olyan proteom mintázatot, melyben fajspecifikusság figyelhető meg. Fajazonosításhoz biomarkerként szolgálhatnak azok a fehérjesávok (1D PAGE), illetve fehérjefoltok (2D PAGE), melyek egyik faj gélképén jelen vannak, amíg más fajok esetében nem detektálhatóak.

A halhús fehérjéinek 20-35%-a szarkoplazma protein, ezt a frakciót gyakran használják fajspecifikus fehérjemintázat leírására, fajspecifikus biomarker proteinek keresésére. Az izoelektromos fókuszálással szeparált fehérjék számos halfajnál specifikusabb és fajokat biztosabban azonosító mintázatot adnak, mint a klasszikus elektroforetikus protokollok. Tonhalfajok húsának szarkoplazma fehérjéit egy- illetve kétdimenzióban szeparálva a kékúszójú tonhal esetében egy 70 kDa protein fajspecifikus expressziója detektálható. Ez a potenciális biomarker a triózfoszfát izomeráz.

Az ilyen jellegű vizsgálatok eredményeit némi fenntartással kell fogadni, mivel jellemzően kis létszámú csoportok (fajonként alacsony egyedszám) vizsgálatán alapulnak, mint a legtöbb proteomikai munka és nehéz megkérdőjelezhetetlenül igazolni, hogy rokon fajknál nem azonos méretnél detektálható az adott fehérje, illetve expressziót fajspecifikusan mutatnak.

A vizsgált fehérjék feldúsítása megkönnyíti azok detektálását, illetve lehetővé teszi kevésbé érzékeny módszerek alkalmazását. A gél alapú proteom-analízisnél a minta nagy gyakoriságú fehérjéi jelentik a legnagyobb gondot, mivel több nagyságrend koncentrációkülönbség egy adott gélen már nem vizualizálható megfelelő hatékonysággal. Ilyen 1D PAGE előtti elválasztás/frakcionálás szükséges az alábbi eredetigazolás kivitelezéséhez:

A tőgy eptihél sejtjeiből szekretálódó tejszír a tejben zsírcseppek formájában van jelen. Ezeket a zsírcseppeket a sejtből kiszabadulásuk során membránréteg borítja be. A

membránfehérjék mellett magukban hordoznak kisebb mennyiségben citoplazma proteinek is. A tejszírcsepp membrán olyan proteinek tartalmaz, melyek szerepet játszanak az immunitásban, patogének elleni folyamatokban és különböző jelátviteli útvonalakban. A tehéntej esetében eddig már 120 egyedi proteint azonosítottak. Az egydimenziós gélelektroforézis gélképén a tejszírcsepp membránból származó lactadherin és butyrophilin fehérjék fajok közötti eltérést mutatnak. A kecske és a juh lactadherin proteinje egy sávban jelentkezik, míg a szarvasmarha és a tevé fajoknál két sáv is ugyanennek a polipeptidnek a variánsai. A ló tej vizsgálatánál négy külön sáv is lactadherint takar. A módszerrel a kecske és a juh is elkülöníthető egymástól, mivel más a fehérje mérete, kecskénél 54 kDa, míg juhnál 56 kDa. A butyrophilin polipeptid az SDS PAGE vizsgálatnál egy sávot ad lónál, kecskénél, juhnál, tevénél és tehénnél is, azonban a méretük különbözik, kivéve a juhtejet és a tehéntejet, így ez utóbbiak egymástól nem különíthetők el.

A proteom állandóan változik, egyes fehérjék expresszióját számos tényező befolyásolja. Ezek lehetnek egyedfejlődéssel összefüggő tulajdonságok, embrionális és posztembrionális életkorfüggő expresszió, lehetnek a külső környezet által indukált expressziós változások. Mivel állati eredetű élelmiszerek esetén jellemzően gazdasági állatok termékeit fogyasztjuk, így a környezeti változások tartástechnológiai különbségekben, takarmányozásban és egyéb faktorokban keresendők. A takarmányozás, vagyis bizonyos takarmányok bioaktív anyagainak fehérjékre és azok expressziójára gyakorolt hatását nutriproteomikának nevezzük. Ez egy új és gyorsan fejlődő tudományág, elsősorban a humán kutatások terén alkalmazzák. Az adott egyed adott szövetének fehérje-expressziós profilja determinált és kontrollált az állat genotípusa által. A nemesítés során kialakított fajták hasznosításukban, termelési szintjükben, fenotípusukban, az előállított termék minőségi tulajdonságaiban különböznek egymástól. Összességében egy házasított állatfajon belül az egyedek fehérje-expressziós változatossága várhatóan nagyobb, mint egy mesterségesen nem szelektált, illetve a természet által szelektált állatfajé.

A fehérjék mennyiségi jelenléte eltérő mértékben változhat post mortem is, így az érlelés, különböző élelmiszeripari feldolgozási és technológiai folyamatok eltérő mértékben befolyásolhatják különböző fajok fehérjéinek mennyiségét. Ilyen esetekben szintén követelmény, hogy vizsgálatba, biomarker-jelöltként, csak „hőstabil” és a technológiai folyamatokban kevésbé degradálódó polipeptidet választhatunk. Előforduló jelenség, hogy amennyiben a húsfeldolgozás érlelés nélkül, illetve rövid érlelés után történik, a proteom csak kis mértékben változik (degradálódik), mivel olyan behatások érik a húst, amelyek a

proteázok működését, a proteolízist gátolják. A hőkezelés, só, pH változások mind a proteázok inaktiválódását indukálják. Amennyiben a hús/hústermék belső hőmérséklete eléri a 72 °C-ot, úgy a legtöbb proteáz denaturálódik. Így a hőkezelésnek, a proteom-vizsgálat szempontjából, lehet kedvező és kedvezőtlen (nem „hőstabil” fehérjék) hatása is. Mind a nyers, mind a feldolgozott húskészítményhez hozzáadott só befolyásolja a gélen a sávmintázat intenzitását. A nátrium-klorid és a kálium-nitrát enyhe mértékben gyengíti a sávok intenzitását, ezzel szemben a nátrium-nitrát olyan jelentősen lerontja a detektálást, hogy bizonyos sávok/foltok eltűnhetnek a gélről. Beszámoltak egy-két olyan fehérjéről is, amelyek a sókezelés után magasabb relatív intenzitást mutattak.

Ha a feldolgozás hatását a proteinek mérete szerint értelmezzük, többségében az tapasztalható, hogy a kisebb méretű fehérjék jobban ellenállnak, kevésbé degradálódnak a hőkezelés hatására és az előbb említett kémiai hatásokra.

Több lépéses frakcionálást alkalmazva lehetőség van gélelektroforézis technikával olyan proteineket keresni, melyek elektroforetikus mobilitása eltérést mutat fajok között és mind nyers, mind feldolgozott élelmiszereknél vizsgálhatóak. Az elektroforetikus mobilitás alatt a legtöbb esetben 2D PAGE által értékelt izoelektromos pont és molekulatömeg jellemzőket értjük. Több 2D PAGE tapasztalat is erősíti a hőkezelésnek azt a következményét, hogy a nagy molekulásúlyú régióban elhelyezkedő fehérjéket nagyobb mértékben károsítja, mint a kis molekulásúlyúakat. Mivel a hőkezelés nem változtatja meg ezen proteinek izoelektromos pontját, illetve a molekulásúlyt, így a poliakrilamid gélen egy adott fehérje ugyanott detektálható nyers és feldolgozott élelmiszer esetében is.

Az alábbi lista azokat a fehérjéket tartalmazza, amelyek fajspecifikus elektroforetikus mobilizációt mutatnak és detektálhatóak mind nyers húsban, mind feldolgozott húskészítményben is. A vizsgálat házityúk, sertés és szarvasmarha fajspecifikus proteinjeire terjedt ki.

Heat shock 70.1 kDa protein (Gallus gallus)

Myosin heavy chain, cardiac muscle isoform (Gallus gallus)

Pyruvate kinase muscle isozyme (Gallus gallus)

Beta-enolase (Gallus gallus)

Phosphoglycolate phosphatase (PGPase) (Gallus gallus)

Fatty acid-binding protein, smooth muscle (SM-FABP) (Gallus gallus)

Fatty acid-binding protein, heart-type (H-FABP) (Oncorhynchus mykiss)

Serum albumin precursor (Allergen Gal d 5) (Gallus gallus)

Alpha-enolase (Gallus gallus)
Troponin T, fast skeletal muscle izoform (Gallus gallus)
Apolipoprotein B (Gallus gallus)
Pyruvate kinase muscle isozyme (Gallus gallus)
Fatty acid-binding protein, heart-type (H-FABP) (Oncorhynchus mykiss)
Annexin A6 (Gallus gallus)
Electron transfer flavoprotein subunit alpha (alpha-ETF) (Homo sapiens)
Heat shock 27 kDa protein (Gallus gallus)
Bovine serum albumin (Bos taurus)
Heat shock 70.1 kDa protein (Pongo abelii)
Heat shock 27 kDa protein (Bos taurus)
Heat shock 27 kDa protein (Bos taurus)
Parkinson disease protein 7 (Protein DJ-1) (Bos taurus)
Similar to myosin light chain 1 slow-twitch muscle (MLC1sa) (Bos taurus)
14 kDa phosphohistidine phosphatase (Bos taurus)
Galectin-1 (beta-galactose-binding lectin) (Bos taurus)
ATP synthase subunit d (Bos taurus)
Heat shock 70.9 kDa protein (Pongo abelii)
Tropomodulin 4 skeletal muscle (Bos taurus)
Cytochrome b-c1 subunit 1 (Bos taurus)
Alpha-enolase 1 (Bos taurus)
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic (GPDHC) (Bos taurus)
Heat shock 27 kDa protein (Sus scrofa)
Peroxiredoxin-6 (Sus scrofa)

Montowska – Pospiech (2013) nyomán

Ezidáig olyan fehérjék gél alapú vizsgálatáról volt szó, melyek valamely gazdasági állat termékéből származnak. Vannak olyan tej-, illetve húskészítmények, melyek előállításán mikrobákat, starter kultúrákat használnak. Ezen mikrobák fehérjéi is megjelenhetnek a poliakrilamid gélen, másrészt tevékenységük során degradálják az állati fehérjét kisméretű peptidekké. Ezek fontos szerepet töltenek be a feldolgozott termék ízének, élvezeti értékének kialakulásában. Hústermékeknél, például a szalámi esetében, olyan gélképet eredményez, ahol a kisméretű fehérjék régiójában megnő a fehérjefoltok száma.

10.3.3. Folyadék kromatográfia alkalmazása fajazonosításra

A miozin könnyű lánc 3 fehérje alkalmas folyadék kromatográfia – tömegspektrometria vizsgálat során olyan protein biomarkerként viselkedni, mellyel kimutatható a sertés és a csirkehús. Mind nyers, mind főtt húsok esetében a miozin fajspecifikus biomarkerként használható. A házityúk miozinja a húsminta miofibrilláris frakciójából izoelektromos fókuszálással történő dúsítás után, a triptikus fragmentek (tripszinnel történő emésztés után képződött termékek) folyadék kromatográfia tömegspektrometria/tömegspektrometria (LC MS/MS) vizsgálatával 0,5% csirkehús/99,5% sertéshús keverési arány esetén is kimutatható. A vizsgált 13 aminosavból álló fragmentnél a sertés és a házityúk fragmentje két aminosavban mutat eltérést. Az alacsony kimutatási határ eléréséhez szükséges a vizsgált fehérje feldúsítása az MS mérés előtt.

A miozin mellett más fehérjék is alkalmasak tömegspektrometria alapú eredetigazoláshoz. Eredményesen használható mind nyers, mind hőkezelt húsok esetén a hemoglobin és a mioglobin, melyek tömeg értékeinek eltérése az azonosítás alapja. Ily módon, electrospray ionizáció – tömegspektrometria módszerrel 10% lóhús jelenléte a marhahús készítményben már detektálható.

Folyadék kromatográfia és nanoLC MS módszerekkel a collagen I protein olyan peptideket eredményez a magas hőmérsékleten és nyomás alatt kezelt hús és csont keverék vizsgálata esetén, melyekkel el lehet különíteni egymástól a házityúk, szarvasmarha, juh és sertés fajokat.

11. Felhasznált irodalom

Cebo C., Martin P. (2012): Inter-species comparison of milk fat globule membrane proteins highlights the molecular diversity of lactadherin. *International Dairy Journal*. 24. 70-77.

Hofmann K. (1977): The influence of heat on meat proteins, studied by SDS electrophoresis. In: T. Hryem - O. Kvale (Eds.), *Physical, chemical and biological changes in food caused by thermal processing*. London: Applied Science Publishers Limited. 311-327.

Hubalkova Z., Kralik P., Tremlova B., Rencova E. (2007): Methods of gadoid fish species identification in food and their economic impact in the Czech Republic: a review. *Veterinarni Medicina*. 52. 7. 273–292.

- Hughes M. C., Kerry J. P., Arendt E. K., Kenneally P. M., McSweeney P. L. H., O'Neill E. E. (2002): Characterization of proteolysis during the ripening of semidry fermented sausages. *Meat Science*. 62. 205–216.
- Liu L. H., Chen F. C., Dorsey J. L., Hsieh Y. H. P. (2006): Sensitive monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of porcine skeletal muscle in meat and feed products. *Journal of Food Science*. 71. 1. M1–M6.
- Montowska M., Pospiech E. (2013): Species-specific expression of various proteins in meat tissue: Proteomic analysis of raw and cooked meat and meat products made from beef, pork and selected poultry species. *Food Chemistry* 136 (2013) 1461–1469.
- Patrinos G. P., Ansorge W. J. Eds. (2010): *Molecular diagnostics*. Second Edition. Academic Press, USA. 1-598.
- Pepe T., Ceruso M., Carpentieri A., Ventrone I., Amoresano A., Anastasio A. (2010): Proteomics analysis for the identification of three species of *Thunnus*. *Veterinary Research Communication*. 34. Supplement 1. S153–S155.
- Sentandreu M. A., Fraser P. D., Halket J., Patel R., Bramley P. M. (2010): A Proteomic-Based Approach for Detection of Chicken in Meat Mixes. *Journal of Proteome Research*. 9. 3374-3383.
- Taylor A. J., Linforth R., Weir O., Hutton T., Green B. (1993): Potential of electrospray mass-spectrometry for meat pigment identification. *Meat Science*. 33. 1. 75-83.
- Twyman R. M. (2004): *Principles of Proteomics*. Taylor & Francis Group, New York, USA. 1- 241.
- Zhang J., Wang H., Cai Z. (2007):The application of DGGE and AFLP-derived SCAR for discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Control*. 18. 672–676.

12. Zsírok, zsírsavak és meghatározásuk

12.1. A zsírok, zsírsavak általános jellemzése

A lipidek vízben egyáltalán nem vagy rosszul oldódnak, energiát raktároznak, szállítanak és szolgáltatnak. Fontos alkotórészei a sejtmembránnak, a szteroid hormonoknak és a zsírban oldódó vitaminoknak (A, D, K, E). A zsírsavak szerepet játszanak a legtöbb lipid-természetű anyag felépítésében, oxidációjuk során ATP szintetizálódik. Könnyen felszívódnak. A trigliceridek az energia-raktározásban, míg a foszfolipidek és szfingolipidek a membránfelépítésben játszanak meghatározó szerepet. Általános képletük: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$. Láncái szorosan kapcsolódnak egymáshoz. A rövid (2-5), közepes (6-11) és hosszú (12-26) szénláncú zsírsavak szénatomszámukban különböznek, ahol a karboxilcsoport C atomját tekintjük az első C atomnak. Megkülönböztethetünk még telített, telítetlen (egyszeresen vagy többszörösen) és esszenciális zsírsavakat is. Megtalálhatóak húskokban húskészítményekben, állati eredetű zsírokban, tej és tejtermékekben, baromfi termékekben.

A telített zsírsavakkal ellentétben legalább egy kettős kötést tartalmaznak, az emlős szervezetben cisz-konfigurációban fordulnak elő. Például: Olajsav/Oleát, $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$, Linolsav/Linolát, $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$, Linolénsav/Linolenát, $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$, Arachidonsav/Arachidonát, $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$. Az esszenciális zsírsavak a szervezetben nem szintetizálódnak, táplálékkal szükséges bejuttatni őket az emberi szervezetbe. Többszörösen telítetlenek, fontosak eikozanoidok és a többszörösen telítetlen zsírsavak szintéziséhez. Hiány esetén dermatitis és rossz sebgyógyulás léphet fel.

Az omega-6 zsírsav (linolsav) a legtöbb növényi olajban megtalálható, csökkenti az allergia, ekcéma, ADHD, PMS, osteoporózis tüneteit. Az omega-3 zsírsav (alfa-linolénsav, ALA) pedig fontos szerepet tölt be a magzat megfelelő fejlődésében és a daganatos betegségek megelőzésében. A transz zsírok növényi olajok hidrogénezése során telítetlen zsírsavakból keletkeznek. Mivel eltarthatósági idejük hosszabbodik, így kevésbé hajlamosak az avasodásra, ugyanakkor emelik a szérumban az LDL szintet, csökkentik a HDL szintet, növelik a szív- és érrendszeri megbetegedések kockázatát.

12.2. Kromatográfia

Napjainkban sürgető problémává vált az állati eredetű termékek eredetiségének vizsgálata, a hamisítások kiszűrése, az ételcímkek ellenőrzése, hiszen a fogyasztók félrevezetése akár egészségügyi kockázatot is jelenthet. Ezek következtében erőfeszítések történtek a műszeres analitikai technikák és statisztikai szoftverek fejlesztésére. A kromatográfiai módszerek segíthetnek az egyes állati eredetű termékek zsírsavösszetételének meghatározásában, a pontosabb analízis szempontjából gyakran egyéb technikákkal is kiegészíthetik őket.

A kromatográfia (görögül kroma = szín és grafein = írni) keverékek elválasztására alkalmas laboratóriumi módszerek gyűjtőneve. A kromatográfiai technikák mozgófázis alapján többféleképpen is csoportosíthatók: folyadékkromatográfia (LC), nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC), szuperkritikus oldószeres kromatográfia (SFC), elektrokinetikus kromatográfia (EKC), kapilláris elektrokinetikus kromatográfia (CEC), gázkromatográfia (GC).

A gázkromatográfia (GC) egy olyan elválasztási technika, melynek alapfeltétele, hogy a minta gáz fázisban legyen. A GC tömegspektrometriával kombinálva (GC-MS) alkalmas többkomponensű, összetett minták jellemzésére is. Nem megfelelő jelölésű, akár hamisított termékek kiszűrésére lehetőséget teremt, ezáltal megvalósulhat a fogyasztóvédelmi szempontok figyelembe vétele, kihangsúlyozott szerepet kap a minőségbiztosítás. A gázkromatográfia jellemzője, hogy a gyors anyagátmenetnek köszönhetően az elválasztási idő rövidebb. Más, hasonló hatékonyságú technikához képest (pl.: HPLC) olcsóbb, használata egyszerűbb, viszont ionos molekulák elválasztására nem alkalmas. A módszer alkalmazásának célja, hogy a vizsgálandó komponens a többi anyagtól lehetőleg minél jobb jel-zaj viszony mellett váljon el és rövid idő alatt detektálható legyen.

A mintabeviteli körülmények befolyásolhatják az elválasztást (hőm., a bevitel módja, a minta minősége és mennyisége), a gáz áramlási viszonyai (áramlási sebesség, nyomás, nyomáskülönbség), a kromatográfiai oszlop, a fázisok közötti anyagátmenet, a minta összetevőinek az állófázissal való kölcsönhatásai.

Többféle detektor létezik: tömegspektrométer (MS), hővezetőképességi detektor (TCD). Specifikus detektorokat is alkalmazhatnak: elektronbefogós detektor (ECD), nitrogén-foszfor detektor (NPD), láng-fotometriás detektor (FPD), atom-emissziós detektor (AED), lángionizációs detektor (FID). A lángionizációs detektorral rendelkező gázkromatográfia

felhasználása jó példa a zsírsav metilészterek kromatográfiás analízisére a különböző testrészekből származó húsokban. A kísérlet során öt különböző növekvő zsírtartalmú marha és borjú, illetve három bárányhús szeletet vizsgáltak. A bárányhúsnak volt a legmagasabb telített zsírsavtartalma. A marhahús közel fele annyi transz C18:1/100g zsírsavat tartalmazott, mint a borjú- és bárányhús. A különböző szeletek között a transz és más zsírsavakban csak kis mértékű eltérése mutatkozott. A kapilláris gáz-folyadék kromatográfiával tapasztalt cisz és a transz C18:1 zsírsavak közötti átfedések igazolását GLC-vel követett argentációs-vékonyréteg kromatográfiával végezték el. Egy másik vizsgálat során a zsírsav metilészterek meghatározásának lehetőségeit vizsgálták kereskedelmi forgalomban is megvásárolható halolajokban. Az eredmények alapján a gáz kromatográfiás módszerek és kemometriás felbontási technikák kombinációja egy kiegészítő módszert jelenthetnek az olyan több-összetevőjű rendszerek pontos analízisére, mint amilyen a halolaj is.

13. Állati szövetek, termékek zsírsavösszetétele

Az állati eredetű termékek lipid koncentrációja és zsírsavprofilja fontos részét képezik a humán táplálkozásnak. A zsírsavak bevitel az emberi szervezetbe részben a kérődzők tejéből és húsból, vagy a margarinokban előforduló növényi olajokból és halolajból származik. A tejszír telített zsírsavakban gazdag, viszont konjugált linolsavakat is tartalmaz. A zsírsavösszetétel egészségügyi vonatkozásait figyelembe véve egyes országok (pl.: Dánia) margarinipara csökkentette a transz-zsírsav- és növelte az egyszerűen telítetlen zsírsavmennyiséget a termékeikben. A szív- és érrendszeri betegségek, daganat, gyulladásos és autoimmun betegségek megelőzésében kiemelkedő szerepük van a telítetlen zsírsavaknak. Ezenkívül a tej és tejtermékek fontos szerepet játszanak az ember ásványi anyag-, fehérje-, esszenciális zsírsavszükséglet kielégítésében. Emellett antioxidáns és rákellenes hatású, esszenciális zsírsavakat tartalmaz, erősítheti az immunrendszert, nélkülözhetetlen az egészséges csontfelődéshez. Az egyre szélesebb körben elterjedt halolajak szintén fontos szerepet töltenek be az egészségmegőrzésben, mivel kisebb-nagyobb mértékben tartalmaznak omega-3 zsírsavakat. A többszörösen telítetlen zsírsavak (omega-3 zsírsavak) esszenciálisak az emberi szervezet számára. Az omega-3 zsírsavak fokozott bevitel különösen az egészséges életmód kialakítása miatt ajánlott, mivel több betegség kialakulásának a kockázatát is csökkentheti. Szabályozzák a vérnyomást, csökkentik a koszorúér betegségek veszélyét, gátolják a vérrögképződést, javítják a rheumatoid arthritis tüneteit. Az omega-3

zsírsavak bevitele nehezen megvalósítható, viszont halolaj eredetű táplálék kiegészítők már elérhetővé váltak a fogyasztók számára.

13.1. A zsírsavak előfordulása a különböző állati eredetű termékekben

Baromfi szövetek zsírsav minőségének változása: a mellhús zsírtartalma (a foszfolipid viszont több) < comb < bőr (döntően trigliceridek alkotják). Vízi szárnyasok több n-3-as zsírsavban gazdag táplálékot, zöld növényeket, rovarokat fogyasztanak ezért több zsírt raktároznak el a csirkéhez képest. Lenmagdara, lenmagolaj takarmány esetén növekszik a szövetek linolénsav tartalma.

A kérődzők előgyomorában mikrobiális fermentációs folyamatok játszódnak le, ahol baktériumok telítik és hidrogénezik a zsírsavakat. Eltérő takarmányozási stratégiák befolyásolhatják a zsírsavak arányát és összetételét. A gabonamagvak többszörösen telítetlen zsírsavakat tartalmaznak, így takarmányként csökkentik a telített zsírsavak hányadát. Az olajosmagvak (pl.: fullfat repce) bevitelével csökken a palmitinsav aránya a szöveti lipidekben és nő az olajsav és a linolsav mennyisége az intramuszkuláris lipidekben. Repcemag elősegíti a szöveti zsírok E vitamin koncentrációjának növekedését. A transz-zsírsavak a táplálékkal bevitt telítetlen zsírsavak bio-hidrogenációjából származnak, a kérődzőkben csak kis mennyiségben fordulnak elő és leginkább a zsíros szövetekre jellemzőek. A sertéshúsban a lizin aránya pedig nagyban befolyásolja annak minőségét és zsírtartalmát. Rostdús takarmánykomponensek etetésével csökkenthető a sertések túlzott mértékű elzsírosodása.

A tej zsírsav-összetételét a faj/fajta, genotípus, a tartási környezet/körülmények, az évszak/hónap, az állat kora, a laktáció szakasza/száma, takarmányozás befolyásolja. Az egyes haszonállatok tejzsírsav tartalma is eltérő: juhtej zsírtartalma ~ a bivalytej > kecsketej > tehéntej > szamártej > kancatej. A vaj összetételét tekintve kb. 80% zsír, 19% víz, 1% zsírmentes szárazanyag. Továbbá a tej zsírtartalma változhat, homogénezés során kisebb zsírgolyócskák keletkeznek, melyek a gyomorpanaszokban szenvedőknek könnyebb hasznosíthatóságot biztosítanak. Több zsír a tejben eredményesebb kalciumfelszívódást tesz lehetővé. Az anyatej zsírtartalma: 6,9%, a kecsketej zsírtartalma: 4,1%, kezelés után a tehéntej: 1,5-2,8% -os zsírtartalommal rendelkezik.

Fontos megemlíteni a tejtermékekben nagy mennyiségben előforduló konjugált linolsavat, mely a linolsav izomerek gyűjtőneve. Az emberi szervezetben megtalálható az epében, a vérérszékben, az anyatejben és a béltartalomban. A kérődzők bendőjében *Butyrivibrio*

fibrosolvans baktériumok hatására képződik linolsav bio-hidrogénezése által. A tejtermékek mellett, sokkal kisebb mennyiségben az állatok húsában, a tojásban, és a növényi olajokban is megtalálhatók. A tejszír konjugált linolsav tartalmának növekedésének hatására nő a transzzsírsavak mennyisége is. A tejszír összetételének módosítása lehetséges a konjugált linolsav-tartalom változtatása által. Ezt befolyásolhatja a tartásmód, az évszakok (nyáron magasabb a konjugált linolsav-tartalom, ellentétben a telített zsírsavakkal, melyek nyáron alacsonyabb értéket mutatnak, tehát a nyáron fejt tej kedvezőbb élettani hatásokkal rendelkezik), továbbá a takarmányozás rendszerességétől és gyakoriságától is függhet a konjugált linolsav-tartalom. A szója, gyapotmag és napraforgóolajat tartalmazó takarmány kedvezően befolyásolja a tej konjugált linolsav-tartalmának változását.

A különböző állati eredetű termékek zsírsavösszetételét számos tényező befolyásolhatja. Ezenkívül a zsírsavprofil megállapítása kiemelkedően fontos egészséges táplálkozására gyakorolt hatással bír. Ezáltal növelheti az egyes termékek értékét, így a tenyésztő és takarmányozó körülmények megállapítása is egyre nagyobb hangsúlyt kap. Fontosabbá válik a fogyasztók részéről az élelmiszerek előállítás körülményeinek ismerete. Pontos információkat igényelnek a faj, az előállítási mód és a földrajzi eredet felől.

14. Eredetigazolási lehetőségek zsírsavvizsgálatok alapján

A táplálékok hitelesítése, eredetigazolása folyamatosan fejlődik napjainkban a globális piaci trendeknek megfelelően. A találékony csalóknak köszönhetően szükségessé válik az analitikai technikák fejlesztése, mivel a hamisítványok kedvezőtlen versenyhelyzetet teremtenek az eredeti termékek számára. A klasszikus tesztek nagyrészt az újabb laboratóriumi eljárások váltották fel, a kimutatások idő és költséghatékony jellemzőit szem előtt tartva. Segítségükkel megvalósítható a vadon élő állatok elkülönítése a tenyésztettől vagy például bio termékek azonosítása hagyományos termékekkel szemben. Az egyre elterjedtebb hamisítások az olajtermékek esetében általában az olaj hígítását vagy cseréjét (olcsóbb, kevésbé előnyös minőségi tulajdonságokkal rendelkező olaj termékekre) foglalja magában. Napjainkban fokozott érdeklődés figyelhető meg a tej és különböző állati eredetű szövetek zsírsav profilja iránt, mivel növekszik az igény a termékek iránt, amelyek pozitív hatással vannak az ember egészségére.

14.1. A hamisítások kiszűrése gázkromatográfias eljárásokkal

Az illegális kaviár-kereskedelem komoly gondokat okoz (Európában is) és közvetlen veszélyt jelent a tokhalak számára is. A tokhal kaviárja (mindig fekete) nagyon drága termék, ennek köszönhetően az illegális kereskedelme is virágzik. Manapság szintén fontos jelentőséggel bír a vad és tenyésztett tokhalak ikráinak elkülönítése zsírsav és ásványianyag összetétel alapján. A Természetvédelmi Világszövetség szerint a tokhalfélék 85 százaléka veszélyeztetett. Kaliforniában eddig még nem találtak megoldást az illegális tokhal-kereskedelem megfékezésére. Még nincs törvényszéki módszer, amivel biztosan el lehetne különíteni a vad és a tenyésztett tokhalak ikráit. A STR DNS (Short Tandem Repeats DNS) profilok vizsgálata nem mutatott értelmezhető különbséget a fogságban és a vadon élő populációk között, a DNS-technikák nem alkalmasak a vadon élő és az akvakultúras tokhalak ikráinak megbízható azonosítására. Felvetődik a kérdés: a zsírsav-és ásványianyag-kompozíciók különböznek-e a vadon élő ill. a tenyésztett tokhalak ikráiban? Alkalmas-e zsírsav és ásványi anyag tartalom alapján történő akvakultúras, ill. vadon élő tokhalak által termelt kaviár megkülönböztetésére? Az analízis során megállapították, hogy az eikozapentaénsav (EPA, C20:5, n-3) és dokozahexaénsav (C22:6 n-3; DHS) tartalma magasabb volt a gazdaságban tenyésztett tokhalak ikráinak, mint a vadon élőknek. A szelén koncentráció lényegesen magasabb volt a vadon élő tokhal ikráiban, mint az akvakultúras halak esetében. A vas, cink, réz, foszfor, kén, kalcium, kálium koncentráció tekintetében nem sikerült szignifikáns különbséget kimutatniuk az ikrák között. További következtetések levonásához szélesebb körű elemzés szükséges több gazdaság bevonásával, több nyomelem vizsgálatával.

A csukamájolaj a tőkehal, illetve egyes cápafajok májából nyert olaj, vitaminokban (A- és D-vitamin) és omega-3 zsírsavakban gazdag (különösen EPA és DHA). Kutatások bizonyítják jótékony hatásait az emberi szervezetre, fontos szerepet töltenek be az összetevői a betegségek megelőzésében. A csukamájolaj viszonylag drága terméknek minősül, kedvelt célpontja a hamisításoknak. Általában disznó- vagy marhazsírral keverik. Rohman és munkatársai a csendes-óceáni tőkehalakból (*Gadus macrocephalus Tilesius*) és az atlanti tőkehalakból (*Gadus morhua L.*) nyert olajat vizsgálták Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR-spektroszkópia) alkalmazásával GC-vel kiegészítve. Ebben a kombinációban a GC-FID és IR spektroszkópiát már korábban alkalmazta Gurdeniz et al. (2008) török olívaolajok osztályozására termőhely, a betakarítás éve és fajta szerint. Sikerült a marhafaggyú jelenlétét kimutatni a zsírsavprofil felállítását követően. Különösen az

eikozapenténsav és a dokozahexénsav savak tekintetében mutatkoztak nagy eltérések. Célszerű FTIR spektroszkópiával kombinálva használni a gázkromatográfiát.

A mexikói jogszabályok szerint az emberi fogyasztásra szánt tej csakis a saját tejszírt tartalmazhatja, az egyéb, nem tej és származékaiból származó zsírokat fel kell tüntetni a címkén, mely az összetevőket tartalmazza. Ha ez elmarad, jogsértés és hamisítás ténye áll fenn. Az elmúlt 30 év során számos kutatási központ jött létre, az ilyen és ehhez hasonló csalások kiszűrése miatt. Nagy gazdasági jelentősége lehet a csalások felderítésének a nemzeti és a nemzetközi kereskedelemben egyaránt. Gázkromatográfiás vizsgálaton alapulva, a triglicerid profilok figyelembe vételével a nem tejsír eredetű zsírokat azonosították nyers, illetve ultraszűrt tejmintákban. A kísérlet során a tejsírok két csoportját elemezték. Az első csoportba a nyerstej minták tartoztak, melyek Mexikó központi régiójából származtak (n = 216). A másik csoportba ultraszűrt tejminták kerültek, melyek 3 telepről származtak és a termékeiket Mexikó város különböző szupermarketjeiben próbálták értékesíteni. A kísérlet folytatásában piacokról különböző zsírokat tartalmazó termékek (hal, földimogyoró, kukorica, olíva, és szója) beszerzése a zsírsavprofilok elkészítése és összehasonlítása a tejben található zsírokkal. Az osztályozás megbízhatósága 94,4% volt, következésképpen a módszer alkalmas volt az esetek többségében a csalások felderítésére. Az eredmények tekintetében ezzel a módszerrel kialakítható egy nemzeti adatbázis, megvalósulhat a tejtermékek hiteles ellenőrzése és a csalások kiszűrése.

A gázkromatográfia kemometriával kiegészítve alkalmas lehet a hamisított Telemea sajtok kiszűrésére is. A Romániában kedvelt a hagyományos fehér színű, sós lében érlelt Telemea sajt. Készülhet kecske, juh vagy szarvasmarha pasztörözetlen tejéből, illetve keverhetik is az állatok tejeit. Összesen 25 különböző gyártótól és helyi sajt készítőktől származó mintát vizsgáltak Bratu és munkatársai. Húsz komponens vizsgáltak, a különböző típusú sajtok között átfedéseket is találtak. A kapott eredmények nem egyértelműek, a pontosabb elkülönítés érdekében a kis relevanciájú összetevőket kiszűrték a további vizsgálatokból. Az eljárás 12 releváns zsírsav használatával optimális elkülönítést biztosít, tehát megbízhatóan alkalmazható a Telemea sajtok hitelesítési eljárásai során.

Az élelmiszeripar melléktermékei növelhetik a tápértéket, így az állattakarmányozásban jól hasznosíthatók. Az emberi táplálék és az állati eledel egybemosódása miatt a zsírok megfelelő csoportosítása és elkülönítése egyre sürgetőbb feladattá válik. A magas tápértékkel rendelkező zsírok a takarmányozásban biztonságosan alkalmazhatóak. A megfelelő klasszifikáció a megbízható szabályozáshoz és a fogyasztók védelméhez járulhat hozzá. A 'Feeding Fats Safety; FFS – Etenessük a zsírokat biztonságosan' EU projekt az állati takarmányozásra

használt zsírokat tíz osztályba próbálja sorolni. Kémiai vagy fizikai úton finomított savas olajok, lecitinek, újrahasznosított sütőolajok, állati eredetű zsírok, halolajok stb. A zsírok és olajok csoportosítására és azonosítására termék specifikus markerre van szükség (erre csak kevés kémiai marker alkalmas). A triacilglicerol és zsírsav ujjlenyomat és illékony anyag profil alapján lehetséges a húsfeldolgozás során keletkező, állati takarmányozásra használt melléktermék (állati eredetű zsírok, halolaj és újrahasznosított olajok) eredetének igazolása. A triacilglicerol és a zsírsav metilészter (FAME) analízis gázkromatográfiával, míg az illóanyag vizsgálat PTR-MS használatával valósítható meg. A triacilglicerol és zsírsav ujjlenyomat meghatározása 96%, míg az illékony anyag detektálás 92% pontossággal valósítható meg.

14.2. Tenyésztést, hizlalást befolyásoló tényezők hatása a zsírsavtartalomra

Gázkromatográfiás eljárások lehetővé tették az elegytej eredetének zsírsavösszetétel szerinti történő meghatározása is. Zsírsavprofil alapján elkülönítették a tejet a lehetséges származási terület és eredet alapján. Figyelembe vették a takarmányozást, tenyésztést és az adott farm takarmányozási stratégiáját is. Egyes országokban (Szlovénia) például a fűsilót és a szénát, míg máshol (Olaszország) a szénát és a koncentrált takarmányt részesítik előnyben az állatok etetése során. A kutatás során kimutatták, hogy a telített zsírsavak képviselik magukat legnagyobb mennyiségben, melyeket a telítetlen zsírsavak követnek. Továbbá az adott ország és a tejtermelés éve alapján sikerült a tej klasszifikációs kritériumait meghatározni.

A gázkromatográfiás módszerek jól használhatóak a különböző húsok minőségének meghatározására is, illetve segítségével a megfelelő tenyésztési stratégia is kiválasztható. A sertés zsír elkülönítése zsírsav-metilészter (FAME, fatty acid methyl esters) alapján lehetséges. Ha az elágazó zsírsavak több, mint 18 szénatomot tartalmaznak, akkor az sertészsír jelenlétére utal. A FAME profilok alkalmasak lehetnek a sertészsír más állati eredetű zsírtól való elkülönítésre az élelmiszerek hitelesítése során. A sertés mellett a szarvasmarha, csirke és a kecske szövetek zsírsav analízise is megvalósítható gázkromatográfia használatával.

Az eltérő módon hizlalt sertések különböző triacilglicerol tartalommal rendelkeznek, ennek megfelelően eltérő a termékek ára is, így szem előtt kell tartani a minőségbiztosítást is. Az extenzív módon történő takarmányozás nagyobb telítetlen zsírsav tartalmat tesz lehetővé. Narváez-Rivas és munkatársai a Pireneusi-félszigeten őshonos sertések (2783 sertés minta) bőr alatti zsírrétegének triacilglicerol (17 féle) tartalmát határozták meg GC lángionizációs detektor segítségével. Az eddig használt technika hitelesítésre igen, de a minták összetevőinek

a meghatározására nem volt alkalmas, ezáltal nem lehetett információt nyerni a sertések hízlalási módjáról sem. Az újonnan kifejlesztett módszer a Montanera, extenzív Cebo és intenzív Cebo hízlalási formákat 97%-os, míg a Recebo-t átlagban 82%-os pontossággal különítette el.

Egy másik tanulmány a kecskegidák eltérő hízlalása alapján végzett eredet meghatározást zsírsavprofil alkalmazásával. Eredményeik alapján összefüggés lehet a gida húsának minőségi jellemzői (illat és íz) és az etetés fajtája (kecsketej és tejpótló) között. A vizsgált húsok szopós kecske gidákból származtak, melyek egy hónapos koruk körül kerültek levágásra. A kérődzők elő gyomrában (beleértve a kecskéket is) mikrobiális fermentáció zajlik, a baktériumok telítik, hidrogénezik a zsírsavakat. A kérődzők étrendje fontos szerepet játszik a zsírsav-profil kialakításában, mert ha a takarmányozási körülményeket módosítják, a tej tápértéke javítható. A legtöbb zsír a gidák bőralatti perirenális rétegeiben található, csak körülbelül 1%-a intramuszkuláris zsír. A gidák kevesebb telített zsírsavval rendelkeznek, mint például a csirke, marha, sertés vagy bárány húsok, ezért meghatározó termék lehet a gidák húsa egyéb háziállatok húsának alternatívjaként. Lehet-e összefüggést kimutatni a kecskegidák húsának zsírsavprofiljai és az előzetes táplálás között? A kísérlet során 42 (eltérő módon táplált) gidától perirenális zsír mintavételezése történt, mely alapján 3 hízlalási rendszerbe tartoztak (kecsketejjel, tejhelyettesítő tápszerrel és a tejalapú tápszerrel tápláltak). Az analízist GC-vel végezték, lángionizációs detektort (FID) alkalmazva, mely hasznosnak bizonyult a zsírsavprofilok kialakításában. PCA és klaszter analízis segítségével a zsírsavprofilok alapján sikerült a három táplálási rendszert elkülöníteni, legnagyobb különbségek a C18:2 és C18:3 zsírsavaknál mutatkoztak.

A halak és a tengeri emlősök a természetben a leggazdagabb forrásai a hosszú szénláncú, többszörösen telítetlen zsírsavaknak (PUFA). Napjainkban a haltermékek nagyon fontos részét képezik az emberi táplálkozásnak és ez a tendencia várhatóan csak növekedni fog. A tengeri halak zsírsavösszetételükben is különböznek az édesvízi halaktól. A nyugati étrendben az n-3 zsírsavbevitel viszonylag alacsony, a kevés tengeri halfogyasztás miatt, ezzel szemben a növényi olajokból származó n-6 zsírsavbevitel mennyisége növekvő tendenciát mutat. Számos tengeri zsíros halfajról ismert, hogy kitűnő forrásai a telítetlen zsírsavaknak és különösen gazdagok omega-3 zsírsavakban. A halolajak árai közötti különbségek megköveteli a minőségük ellenőrzését, mivel a halolajok alig vagy egyáltalán nem tartalmaznak DNS-t és fehérjét, így a hagyományos hitelesítési eljárások nem alkalmazhatóak. A legtöbb halterméket DNS vizsgálattal azonosítani lehet, a tengeri olajok eredetének igazolása azonban

bonyolultabb feladat. Az olajok főként lipidekből állnak és nem tartalmazzak amplifikálható DNS-t.

A mediterrán halfajok zsírsavösszetétele két különböző detektáló technikát alkalmazva (GC-FID /láng ionizációs detektor/ és GC-MS /tömeg spektrométer/) két különböző hosszúságú és töltésű kapilláris oszlop segítségével meghatározható. A kialakított protokoll alapján a vizsgált fajok a teljes zsírsavprofil meghatározása könnyen megvalósítható. A kutatás során a Csendes-óceán északnyugati partjainál nagy számban előforduló nyolc halat csoportosítottak a teljes lipid tartalmuk szerint. A kutatás során összehasonlították a halak zsírsavmintázatait az össz-zsírsavak relatív arányával és a test összlipid tartalmának arányával. A csendes-óceán partjáról származó halfajok alapvetően magas n-3 telítetlen zsírsavat tartalmazznak, ezek 80%-a C20:5n-3 (EPA) és C22:6n-3 (DHA). Az adott fajra jellemzően alacsonyabb mennyiségben olajsav és palmitinsav szintén előfordult. A zsírszegény halak egyszeresen telítetlen zsírsavtartalma alacsonyabb volt a zsírosabb halakhoz képest. A zsírszegény halakat magasabb többszörösen telítetlen zsírsavtartalom jellemezte (DHA tartalom: 18-29%), szemben a zsíros halakkal (DHA: 8-10%). A zsírsav tartalmat kifejező adatok tulajdonképpen a zsírsavak abszolút mennyiségét mutatják. Mind az EPA, mind a DHA mennyiség sokkal kevesebb a sárga és a szürke tőkehalak húzában, mint a zsíros halakban (pl.: hering). A csendes-óceáni halaknak az összlipid tartalmukat és a zsírsavösszetevőiket is fontos figyelembe venni a táplálkozási minőség meghatározásakor.

14.3. A halolajok eredetigazolása

Egy 2007-ben végzett felmérés alapján a halolaj tartalmú táplálék-kiegészítők voltak a legnépszerűbb egészséges életmóddal összefüggő készítmények. Kanadában zsírsavforrásként főkaolaj alapú kiegészítőket is forgalmaznak, de az az Egyesült Államokban tiltott a kereskedelme. 2009 májusában az Európai Unió szintén betiltotta az ilyen termékeket. Szükségessé vált olyan megbízható módszer kifejlesztése, mely segítségével elkülöníthető a főkaolaj a halolajoktól. Meghatározásra kerültek a kereskedelmi forgalomban elérhető tengeri olajok és táplálék kiegészítők halolajok (tőkehal máj, hering, lazac, 'hal' és fóka) zsírsav összetételei. A kísérlet során a különböző eredetű minták elkülönítése két módszer segítségével történt. A zsírsav analízis során gázkromatográfiát, míg a triacilglicerol vizsgálat meghatározására folyadék kromatográfiát és tömeg spektrometriát alkalmaztak. Szignifikáns különbségeket figyeltek meg a zsírsavprofilok között, továbbá a fókaminták különböztek mindegyik halolajtól. Statisztikai analízis segítségével a zsírsav és triacilglicerol profilok

alapján mintacsoportokat (fóka vs. hal) lehetett elkülöníteni. A zsírsavprofil analízisen és a triacilglicerol profilokon alapuló kétlépcsős módszer a jövőben alkalmas lehet a fókaolajak pontos azonosítására.

Peru az egyik legnagyobb a halolaj forgalmazó, majd Chile, Dánia, Izland, USA, Japán, Norvégia és végül Kína követi. Dél-Amerikában, nagyrészt Peruban és Chilében, hatalmas mértékű a halászati iparág (Peru a legnagyobb exportőre a halolajnak), a halakból omega-3 olajokat nyernek ki. A halászat szezonális, csak egy 2-3 hónapos időszakban érhető el friss hal. A halak nagy részét nem emberi fogyasztásra, hanem kis értékű takarmány előállítására használják. Jelenleg nem állnak rendelkezésre hivatalos, megbízható módszerek, melyek segítségével egyértelműen meghatározható a halolajak faji és földrajzi eredete. 2007-ben a Norvég Élelmiszerbiztonsági Hatóság és a Norvég Kutatási Tanács kezdeményezte egy olyan adatbázis kidolgozását, mely elősegíti a tengeri olajok eredetének nyomon követését. Az adatbázis eredetileg a takarmányként hasznosított tengeri olajok vizsgálatára lett kifejlesztve, de felmerült az igény az emberi fogyasztásra szánt olajok, piaci termékek hitelesítése, eredetigazolása iránt is. Található-e különbség a különböző helyekről származó perui szardellák zsírsavösszetételét illetően? A földrajzi eredetre lehet-e következtetni a zsírsavprofil alapján? A perzisztens szerves vegyületek (POP) vizsgálata is megtörtént. A POP vegyületek toxikus hatásúak lehetnek, erősen zsírolékonyak nagyfokú biológiai felhalmozódásuk miatt potenciális kockázatot jelenthetnek az emberi egészségre és a környezet számára már alacsony koncentrációban is. Zsírsav összetétel és a POP analízise alapján történt a szardella-olajok eredetének meghatározása a perui partok különböző helyeiről. Az eredmények alapján egyértelmű különbségeket találtak az északi, a középső és a déli partvidék területeiről származó halak olajának zsírsav összetevőit illetően. A különbségekért a különböző takarmányok, az ívási állapot, valamint a víz hőmérséklete lehet a felelős. A zsírsav profilok vizsgálata ígéretes módszernek bizonyult a szardella olaj földrajzi eredet alapján történő csoportosítására. A szennyező anyagok analízise alapján elmondható, hogy a perui szardella olajok általában alacsony POP tartalommal rendelkeznek. Több, bővített körű mintavételezés ajánlott a következtetések megerősítése érdekében. A halolajak hitelesítése, eredetvizsgálata és a lipidprofilok kialakítása során figyelembe kell venni: a földrajzi és a szezonális jellemzőket. Adatbázisok kialakítása javasolt, melyek tartalmazzák a fajtákra jellemző lipidprofilokat, a vad és a tenyésztett fajták közötti különbségeket.

14.4. Tenyésztett és vadon élő halak elkülönítése

Az akvakultúrák jelentős szerepet játszanak annak biztosításában, hogy megfelelő mennyiségű hal álljon a fogyasztók rendelkezésére. A triglicerid zsírsavösszetevőinek vizsgálatával lehetővé válhat a tenyésztett és vadon élő lazacok elkülönítése és a lipid frakciók alapján következtetni lehet a tenyésztés módjára is. Az akvakultúra-termékek esetében fontos olyan markerek azonosítása, melyek segítségével detektálni lehet a gazdaságokból származó, illetve a kiszökött halakat. Norvégiában 2007-ben 600000 tenyésztett lazac szökött el a gazdaságokból (www.statistics.no). A kereskedelmi célú tenyésztés nagy mennyiségű növényi olajat alkalmaz, ami normál körülmények között nem fordul elő a vadon élő lazacok tápláléka között. A lipidanalízist GC-vel és nagy felbontású (HR) ¹³C-NMR-rel kombinált kemometriával végezték. Referenciamintaként 59 példányt használtak, négy, a norvégiai Hardangerfjord területén található farmokról. Teszthalként 17, a halászok által 2005-2006 októbere között kifogott, szabadon élő halakat használtak, melyeket egyedileg sorszámoztak (501-517). A mérlegelés és mikroszkópos vizsgálat eredménye szerint csak pár hal (5 db) mutatta a jellegzetes vadon élő lazac bélyegeket, minden más szabadon élő halnál feltételezhető, hogy tenyészetben tartották. A tenyésztő kilétének megállapítására használt statisztikai eljárások során 59 referencia mintából 58 (gázkromatográfia) és 56 (kemometria) egyedet csoportosítottak helyesen. A 12 termesztett halként azonosított vadon élő lazac feltételezhetően a vizsgált négy különböző farmról származott. A kutatók egy csoportja többszörösen telítetlen zsírsav tartalmat vizsgálta vadon élő és tenyésztett tilapiáknál. A nílusi tilápia (*Oreochromis niloticus*) a kilencedik legfontosabb faj, amit tenyésztenek a világon. A piros tilápia (*Oreochromis sp.*) is egyre kedveltebb, főleg Thaiföldön, mert vonzó a színe és egyre növekszik a piacképessége. Az említett két tilápia faj izomszövetének a teljes lipid tartalmát és zsírsav-összetételét vizsgálták. A különböző táplálási rendszereket, akvakultúrákat hasonlították össze a természetes környezetben nevelkedett halakkal. Vadon élő és tenyésztett halak egyaránt kedvező zsírsav profillal rendelkeznek az emberi fogyasztás szempontjából. Magasabb α -linolénsav, ikozapentaénsav (C20:5, EPA), dokozahexaénsav (C22:6, DHA) tartalom és a n-3/n-6 PUFA arány is magasabb. Az intenzíven tenyésztett halak izomszövetét fokozott zsírlerakódás jellemezte (főként telített és egyszeresen telítetlen zsírsavak). Nem kívánatos a fogyasztók számára, hogy csökkenjen az eikozapentaénsav (C20:5, EPA) és dokozahexaénsav (C22:6, DHA) tartalom tenyésztett tilapiák esetében.

14.5. Bio és hagyományos termékek elkülönítése

A bio tejtermékek több omega-3 zsírsavat tartalmazhatnak a hagyományos tejtermékekhez képest, valamint kevésbé szennyezettek a különböző növényvédő szerektől. A biotermékek előállításának költségei magasabbak, mint a hagyományos termékeknek, ezáltal az árak is magasabbak, tehát fontos a fogyasztóvédelem szempontjából garantálni a biotermékek eredetét. Nehéz feladat különbséget tenni a bio és a hagyományos tejtermékek között. Fitán és prisztán savak markerként szolgálhatnak a bio és a hagyományos tejtermékek elkülönítése során. Ezek a savak nem *de novo* szintetizálódnak az emlősökben, a klorofill metabolizálásából származnak és a kérődzők szövetében, ezáltal a tejtermékekben is előfordulnak. Legnagyobb koncentrációban a kérődzők bendőjében találhatóak. A biogazdálkodások egyedül fű alapú takarmányozási rendszerének köszönhetően lehetőség nyílt a fitán és prisztán savak koncentrációja alapján történő elkülönítésre. A bio termékek (sajtok és egyéb tejtermékek) magasabb koncentrációval kell rendelkezniük ezekből a savakból, mint a hagyományos termékek. Egy érzékeny gázkromatográfiás-tömegspektrometriás módszer került kifejlesztésre. A minták begyűjtése helyi piacokról történt a németországi Stuttgartban. A bio sajtok átlagosan 50%-kal több fitán sav és 30%-kal több prisztán sav tartalommal rendelkeztek, mint a hagyományos termékek. Meghatározásra került az az érték is (200 mg/100 g fitán sav), ami alatt szükséges lehet a bio termék ellenőrzése. Egyes hagyományos termékek is elérték ezt az értéket, mivel a nem bio gazdálkodások tehenei is fogyasztanak fű alapú takarmányokat. Csak egy bio sajt volt, ami nem érte el ezt az értéket.

A bio és a hagyományos bányahús ár, minőség és zsírsav-összetételével kapcsolata vizsgálatának céljából három brit áruházból történt címkével ellátott húsvásárlás. A bio és hagyományos bányahúsok árai között nem mutatkozott nagy különbség. Átlagosan a bio karaj 20 g-mal nehezebb volt, mint a hagyományos szelet. A bio bányahúsa jobb volt a zamatosság, pikánság és az ízletesség tekintetében, mint a hagyományos bányahús. Ezek az eredmények alátámaszthatják a fogyasztók elgondolását, miszerint a bio termékek "jobb ízűek". Az adatok alapján nem volt lényeges különbség a zsírsav összetétel és az étkezési minőség között a hagyományos ökológiai termeléssel előállított bányahúsok és a bio húsvásárlások között. A szupermarketek között nem volt jelentős különbség, egyedül az „A” szupermarketben volt olcsóbb és ezzel együtt egy kicsit gyengébb minőségű a bányahús.

A kereskedelmi forgalomban kapható brojlercsirkék húsát összehasonlították annak függvényében, hogy a csirke bio, szabad tartású legelőkarámos vagy hagyományos farmról származik-e. A vizsgálatok célja a fogyasztók rendelkezésére álló húsvásárlások minőségi és

mennyiségi tulajdonságait vizsgálják. Az analízis során tizenöt brojlercsirke húsát vizsgálták, melyek négy szállítótól származtak. Mindegyik mintának értékelték a nyers és külön a főtt hús minőségét, pH-ját, színét, a zsírsavösszetételét. A bio-brojlercsirkék húsának a fehérjetartalma nagyobb volt, mint a szabad tartású legelőkarámos vagy hagyományos farmról származó csirkék húsa. A bio-brojlercsirkék mellhúsának pH-ja magasabb volt, mint a másik két tartási típusba tartozó csirkéknek, a bio csirkék mell és comb húsa kevésbé volt sárga. A zsírsav analízis eredményei alapján látható, hogy a bio tenyésztésű csirkék comb és mell húsa kisebb mértékben tartalmazott telített és egyszeresen telítetlen zsírsavakat és magasabb mennyiségben többszörösen telítetlen zsírsavakat, mint a szabad tartású legelőkarámos vagy hagyományos farmról származó brojlercsirkék. Az érzékszervi vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a hagyományos brojlercsirke combok kevésbé rágósak, mint a legelőkarámos és a bio-brojlercsirkék. Az egyéb érzékszervi tulajdonságokban nem különböztek szignifikánsan. A piaci árak vizsgálata alapján az árak nem teljesen tükrözik a mennyiségi és minőségi jellemzők alakulását.

14.6. Növényi olajok meghatározása

A pisztácia olaj pisztácia magból származik. Egészséges, az oliva olajhoz hasonló, vitaminokban gazdag olaj, magas olajsavtartalommal rendelkezik, B-szitoszterolt tartalmaz (nagyon hatásos a magas koleszterin-szint csökkentésében). Az analizált olajok Olaszországból, Törökországból, Iránból és Görögországból származtak. Bizonyos élelmiszerek esetében - mint amilyen a narancslé, articsóka, szentjánoskenyérfa magja - már végeztek lipid frakción alapuló vizsgálatokat. Zsírsavak és fitoszterolok vizsgálatával próbálták meghatározni a földrajzi besorolhatóságát a pisztácia olajnak. Az olasz pisztácia lipid profilját a különböző országok pisztácia olajának lipid frakcióival hasonlították össze. A szterinfrakció megoszlásának vizsgálatára először nyílt lehetőség, a minták geográfiai azonosítása zsírsavak analízisével és többváltozós elemzéssel fontos szerepet tölthetnek be a pisztáciaolajok hitelesítésében.

15. Felhasznált irodalom

Angood K. M., Wood J. D., Nute G. R., Whittington F. M., Hughes S. I., Sheard P. R. (2008): A comparison of organic and conventionally-produced lamb purchased from three major UK supermarkets: Price, eating quality and fatty acid composition. *Meat Science*. 78. 3. 176-84.

Arena E., Campisi S., Fallico B., Maccarone E. (2006): Distribution of fatty acids and phytosterols as a criterion to discriminate geographic origin of pistachio seeds. *Food Chemistry* 104. 1. 403-408.

Ballin N. Z. (2010): Authentication of meat and meat products. *Meat Sci*. 86. 3. 577-87.

Bratu A., Mihalache M., Hangan A., Chira N., Todasca M., Rosca S. (2012): Gas chromatography coupled with chemometric method for authentication of romanian cheese. *Chemistry Magazine*.

Broadwater M. H., Seaborn G. T., Schwacke J. H. (2012): Forensic identification of seal oils using lipid profiles and statistical models. *Forensic Science* 10.1111/1556-4029.12018.

Depeters E. J., Puschner B., Taylor S. J., Rodzen J. A. (2013): Can fatty acid and mineral compositions of sturgeon eggs distinguish between farm-raised versus wild white (*Acipenser transmontanus*) sturgeon origins in California? Preliminary report. *Forensic Science* 10. 229. 1-3:128-32.

Fritsche J., Steinhart H. (1998): Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und –Forschung* 206. 2. 77-82.

Gaspardo B., Lavrencic A., Levart A., Del Zotto S., Stefanon B. (2010): Use of milk fatty acids composition to discriminate area of origin of bulk milk. *Dairy Science* 93. 3417-26.

Gutiérrez R., Vega S., Díaz G., Sánchez J., Coronado M., Ramírez A., Pérez J., González M., Schettino B. (2009): Detection of non-milk fat in milk fat by gas chromatography and linear discriminant analysis. *Dairy Science* 92. 5. 1846-55.

Husak R. L., Sebranek J. G., Bregendahl K. (2008): A survey of commercially available broilers marketed as organic, free-Range, and conventional broilers for cooked meat yields, meat composition, and relative value. *Poultry Science* 87. 11. 2367-76.

Indrasti D., Man Y. B. C., Mustafa S., Hashim D. M. (2010): Lard detection based on fatty acids profile using comprehensive gas chromatography hyphenated with time-of-flight mass spectrometry. *Food Chemistry*, 122. 4. 1273-1277.

Karapanagiotidis I. T., Bell M. V., Little D. C., Yakupitiyage A., Rakshit S. K. (2006): Polyunsaturated Fatty Acid Content of Wild and Farmed Tilapias in Thailand: Effect of Aquaculture Practices and Implications for Human Nutrition. *Agric Food Chemistry* 54. 12. 4304-10.

Leth T., Ovesen L., Hansen K. (1998): Fatty Acid Composition of Meat from Ruminants, with Special Emphasis on trans Fatty Acids. *Journal of the American Oil Chemists* 75. 8. 1001-1005.

Mellado-González T., Narváez-Rivas M., Alcalde M. J., Cano T., León-Camacho M. (2009): Authentication of fattening diet of goat kid according to their fatty acid profile from perirenal fat. *Talanta* 77. 5. 1603-8.

Resconi V.C., del Mar Campo M., Montossi F., Ferreira V., Sañudo C., Escudero A. (2012): Gas chromatographic-olfactometric aroma profile and quantitative analysis of volatile. *Food Science* 77. 240-6.

Rivas M. N., Gallardo E., Jurado J.M., Viera-Alcaide I., Camacho M. L. (2013): Application of artificial neural networks to determine the authentication of fattening diets of Iberian pigs according to their triacylglycerol profiles. *Grasas y aceites* 0017-3495. 127-137.

Rohman A., Man Y. B. (2011): Authentication analysis of cod liver oil from beef fat using fatty acid composition and FTIR spectra. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo.* 28. 11. 1469-74.

Ruiz-Rodriguez A., Reglero G., Ibañez E. (2010): Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 51. 305-26.

Standal I. B., Rainuzzo J., Axelson D., E., Valdersnes S., Julshamn K., Marit A. (2012): Classification of geographical origin by PNN analysis of fatty acid data and level of contaminants in oils from peruvian anchovy. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 87. 7. 1173-1182.