

ślenie dorobku kultury Zachodu w zakresie tolerancji religijnej [10]. Konflikt ten, ze względu na swoje podłoże, staje się szczególnie zaciekle w społeczeństwach wielokulturowych, w których z jednej strony mniejszości domagają się prawa do uszanowania ich zwyczajów, z drugiej natomiast – zwiększa się grupa domagająca się minimum godnego traktowania dla zwierząt przeznaczonych do uboju. Ze względu na nasilające się w Europie Zachodniej zjawisko migracji, należy oczekiwać, że konflikt będzie się nasilał.

Z badań przeprowadzonych przez CBOS [3] wynika, że większość (65%) ankietowanych Polaków jest przeciwna temu, aby prawo w Polsce zezwalało na ubój bez ogłuszania, w tym 41% wyraża swój sprzeciw w sposób zdecydowany. Opinie na temat dopuszczalności uboju bezpośredniego zależały od płci respondentów; mężczyźni zdecydowanie częściej niż kobiety uważali, że prawo powinno zezwalać na taki ubój. Częściej przyzwolenie na taki rodzaj uboju wyrażały osoby starsze. Jako główny argument zwolennicy uboju bez ogłuszania podawali względy finansowe i ekonomiczne oraz religijne. Z kolei przeciwnicy wskazywali, że ubój bezpośrednio wiąże się ze zbyt dużym cierpieniem zwierząt (87%).

Dyskusja nad ubojem rytualnym nie jest tematem nowym. W latach 1995-1996 na łamach „Medycyny Weterynaryjnej” ukazał się cykl artykułów [5, 17, 28], w których swoje racje argumentowali zarówno przeciwnicy, jak i zwolennicy uboju rytualnego. Treść tych artykułów jest jednym z lepszych przykładów, jak powinna być prowadzona publiczna debata dotycząca ważnych kwestii społeczno-kulturowych. Podstawą tej dyskusji powinno być merytoryczne przedstawianie własnych argumentów i uzasadnianie racji. Konstatając debatę profesor Edmund Prost sformułował sentencję: *Najbardziej istotne w akcie ubojowym, jeśli musimy to już czynić, jest zachowanie godności tak zwierzęcia, jak i człowieka* [17], która zawsze powinna przyświecać dyskusjom dotyczącym uboju zwierząt i to niezależnie czy jej tematem jest ubój rytualny, czy z zastosowaniem oszołomienia.

W dyskusji na temat uboju warto jeszcze zwrócić uwagę na problem uboju gospodarczego, będącego ważnym aspektem społeczno-kulturowym tradycyjnego modelu prowadzenia gospodarstwa rolnego. Ubojowi na terenie własnego gospodarstwa, z przeznaczeniem na własny użytek, mogą być poddawane cielęta do szóstego miesiąca życia, świnie, owce, kozy oraz zwierzęta dzikie utrzymywane w warunkach fermowych, które są zdrowe i nie pochodzą z gospodarstwa lub obszaru podlegającego ograniczeniom, nakazom lub zakazom ze względu na określone choroby zakaźne zwierząt [19]. Prawo do przeprowa-

dzania uboju gospodarczego jest dla rolników ważnym wyznacznikiem gwarantowania przez państwo praw obywatelskich. Próby ograniczenia uboju gospodarczego spotkały się z ostrym sprzeciwem branżowych związków hodowców zwierząt, którzy odwoływali się do historii i tradycji. Podkreślano również duże znaczenie i walory jakościowe wyrobów uzyskiwanych z uboju gospodarczego, wskazując na możliwość ich wykorzystania w promocji kultury i zwyczajów polskiej wsi.

Literatura: 1. Brzostek M., Kaleta T., 1997 – Zeszyty Nauk. Przeg. Hod. 33, 169-174. 2. Budzik A., Wypych I., 2013 – Logistyka 6, 537-539. 3. Centrum Badań Opinii Społecznej (CBOS), 2013 – Opinie na temat dopuszczalności tzw. uboju rytualnego, BS/70/2013. 4. Centrum Badań Opinii Społecznej (CBOS), 2013 – Postawy wobec zwierząt, BS/79/2013. 5. Czapik A., 1995 – Med. Weter. 51, 724-725. 6. Domínguez-Rodrigo M., Pickering T. R., Díez-Martín F., Mabulla A., Musiba C., Trancho G., Baquedano E., Bunn H.T., Barboni D., Santonja M., Uribelarrea D., Ashley G.M., del Sol M., Ávila M., 2012 – PLoS ONE 7 (10), 46414. 7. Farouk M.M., Al-Mazeedi H.M., Sabow A.B., Bekhit A.E.D., Adeyemi K.D., Sazili A.Q., Ghani A., 2014 – Meat Sci. 98, 505-519. 8. Grandin T., 2000 – Livestock handling and transport. CAB International. 9. Grandin T., McGee K., Lanier J.L., 1999 – J. Am. Vet. Med. Assoc. 15 (214), 10, 1531-1533. 10. Janion L., 2014 – Kultura Popularna 4 (42), 40-49. 11. Kolanowski W., 2006 – Gosp. Mięsna 7, 16-19. 12. Kwasek M., 2013 – Roczn. Ekon. Kujawsko-Pomorskiej Szkoły Wyższej w Bydgoszczy 6, 265-284. 13. Malak-Rawlikowska A., Gębska M., 2010 – Roczn. Nauk Rol. 4, 136-148. 14. Marlin D.J., Kettlewell P., Parkin T.D.H., Kennedy M., Broom D., Wood J., 2011 – Equine Vet. J. 43, 78-87. 15. Mroczkowski S., Mroczkowska A., 2010 – Przeg. Hod. 4, 29-31. 16. Palka R., 2010 – Gosp. Mięsna 10, 10-11. 17. Prost E.K., 1995 – Med. Weter. 51, 725-727. 18. Prost E.K., 2001 – Polish J. Food Nutr. Sci. 10 (51), 5. 19. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 9 września 2004 r. w sprawie kwalifikacji osób uprawnionych do zawodowego uboju oraz warunków i metod uboju i uśmiercania zwierząt. 20. Rozporządzenie Rady (WE) nr 1/2005 z dnia 22 grudnia 2004 r. w sprawie ochrony zwierząt podczas transportu i związanym z tym działaniami oraz zmieniające dyrektywy 64/432/EWG i 93/119/WE oraz rozporządzenie (WE) nr 1255/97. 21. Runowski H., 2013 – Przeg. Hod. 5, 1-5. 22. Schwartzkopf-Genswein K.S., Faucitano L., Dadgar S., Shand P., González L.A., Crowe T.G., 2012 – Meat Sci. 92, 227-243. 23. Singer P., 2004 – Wyzwolenie zwierząt. PIW. 24. Światowa Deklaracja Praw Zwierząt z 21 września 1977. Przedrukowana w: Encyklopedia ONZ i Stosunków Międzynarodowych (red. E. Osmańczyk), wyd. 2, Warszawa 1986. 25. Tereszkiwicz K., Molenda P., Pokrywka K., 2011 – Logistyka 3, 2787-2798. 26. Tereszkiwicz K., Molenda P., Pokrywka K., Bukala B., 2014 – Logistyka 3, 6315-6325. 27. Willy B., Girma G., Kees de R., 2011 – Study on the impact of Regulation (EC) No 1/2005 on the protection of animals during transport. 28. Żarkower R., 1996 – Med. Weter. 52, 366-369.

Analiza autentyczności produktów pochodzenia zwierzęcego z wykorzystaniem testów DNA

Daniel Polasik, Arkadiusz Terman

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Coraz częściej ze wszystkich stron świata docierają informacje dotyczące wykrycia zafałszowanej żywności. Produkt spożywczy jest kwalifikowany jako zafałszowany, gdy:

– zawiera dodatek substancji, które zmieniają jego skład lub obniżają wartość odżywczą;

– składniki decydujące o wartości odżywczej lub innej właściwości produktu zostały usunięte lub zmniejszono ich zawartość;

– dokonano zabiegów w celu ukrycia jego rzeczywistego składu lub nadania mu wyglądu produktu spożywczo o należytej jakości;

– podano nieprawdziwą nazwę, skład, datę lub miejsce produkcji, termin przydatności do spożycia lub datę minimalnej trwałości albo w inny sposób nieprawidłowo oznakowano produkt, co może mieć wpływ na bezpieczeństwo produktu [31].

Według bazy incydentów EMA (Economically Motivated Adulteration Incidents Database) [14] najczęściej fałszowanymi produktami są kolejno: ryby i owoce morza, nabiał, oleje/tłuszcze, produkty mięsne, alkohole, miód/słodziki, produkty zbożowe, przyprawy, soki owocowe, jajka, herbata i kawa. W takiej samej kolejności zaprezentowane zostaną przypadki potwierdzania autentyczności produktów pochodzenia zwierzęcego z użyciem analiz DNA; na końcu zostaną opisane przypadki nie uwzględnione w powyższej bazie danych, tj. karma/pasza dla zwierząt, preparaty chińskiej medycyny naturalnej i paszmina.

Do najczęściej stosowanych technik w tej dziedzinie zalicza się:
a) sekwencjonowanie (odczyt sekwencji) wybranych genów mitochondrialnego DNA i porównanie z sekwencjami innych gatunków, tzw. barkoding;

b) amplifikację (namnożenie) metodą PCR (polymerase chain reaction) fragmentu DNA (jądrowego lub mitochondrialnego) charakterystycznego tylko dla danego gatunku i jego detekcję (np. metodą real-time PCR);

c) wyodrębnienie charakterystycznych miejsc restrykcyjnych (rozpoznawanych przez enzymy) we fragmentach DNA, które wcześniej zostały namnożone metodą PCR z badanej próby – PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism).

Pozostałe metody stosowane są rzadziej lub pozostają w fazie testowania.

Pierwszym przykładem, dotyczącym ryb i owoców morza, jest badanie mięsa krabów serwowanych w indyjskich restauracjach pod kątem ich autentyczności. W tym celu Vartak i wsp. [32] pozyskali od rybaków z regionu Konkan w Indiach 11 gatunków krabów, które posłużyły do stworzenia barkodów opartych na mitochondrialnym genie *COI* (cytochrome c oxidase I). Następnie zgromadzono 50 prób gotowanych krabów oferowanych w restauracjach i ustalono ich przynależność gatunkową. Wyniki analiz wykazały, że żadna z pobranych prób nie była zgodna z opisem kraba widniejącym w menu restauracyjnym.

Lowenstein i wsp. [27] podjęli się natomiast próby zbadania sushi, przyrządzanego z tuńczyka. Łącznie pobrano 68 prób z 32 restauracji w Nowym Jorku (Manhattan) i w Denver, które zidentyfikowano następnie poprzez sekwencjonowanie genu *COI*. Autorzy sugerowali, że w sushi mogą znaleźć się gatunki zagrożone, fałszywie zadeklarowane, a nawet szkodliwe dla zdrowia. Wszystkie z wymienionych przypuszczeń zostały potwierdzone przeprowadzonymi badaniami. W 19 restauracjach obsługa nie potrafiła wyjaśnić, jaki gatunek tuńczyka sprzedaje. W przypadku 5 na 9 prób opisywanych jako tuńczyk biały (*Thunnus alalunga*) nie wykryto tego gatunku, lecz eskolara (*Lepidocybium flavorunneum*), zaliczanego do ryb maślanych. Jest to gatunek, którego sprzedaż jest zakazana we Włoszech i Japonii ze względu na zawartość wosków nietrawionych przez człowieka. Spożycie tej ryby może spowodować wysypkę, ból brzucha lub głowy, biegunki, a nawet spuchnięcie języka czy trudności w oddychaniu. Ponadto 19 prób przypisano do gatunku zagrożonego – tuńczyka pospolitego (*T. thynnus*) lub krytycznie zagrożonego – tuńczyka błękitnego (*T. maccoyii*). W żadnej z 9 restauracji sprzedających te ryby w menu nie figurowała nazwa gatunkowa.

Kung i wsp. [24] przeanalizowali skład gatunkowy 25 kielbas z tuńczyka nabytych w sklepach detalicznych na Tajwanie oraz zawartość w nich amin biogennych i bakterii produkujących histaminę. W przypadku badania ewentualnego dodatku mięsa innych zwierząt zastosowano multiplex PCR (mitochondrialne geny: 12S rRNA, tRNA Val, 16S rRNA), natomiast w celu oznaczenia gatunku tuńczyka zastosowano metodę PCR-RFLP (mitochondrialny gen *CYTB* – cytochrome b). Przeprowadzone analizy w 20 przypadkach (80%) potwierdziły obecność wieprzowiny, a w 1 przypadku mięsa drobiowego (4%). Ponadto w kielbasach zidentyfikowano 3 gatunki tuńczyka – żółtopłetwy (*T. albacares*) (88%), biały (4%) i pospolity (4%) oraz 1 gatunek z rodziny żaglicowatych – merlin błękitny (*Makaira nigricans*), który określony został poprzez sekwencjonowanie DNA.

Barkoding DNA wykorzystujący zmienność w obrębie genu *COI* został również wykorzystany do badania autentyczności gatunków sumów z rodzaju *Pseudoplatystoma*, sprzedawanych w Brazylii. W latach 2009-2010, w 9 supermarketach w Belo Horizonte nabyto do badań 30 całych tusz oraz 33 filety. Wyniki ich analiz wykazały wysoki stopień substytucji gatunkami spoza rodzaju *Pseudoplatystoma*, sięgający 80%. Prawdopodobieństwo nabycia źle oznaczonego produktu było większe w przypadku filetów w odniesieniu do tusz [6].

Ostatnim przykładem badań kontrolnych ryb może być analiza przeprowadzona w restauracjach i sklepach detalicznych na

terenie Afryki Południowej. Łącznie pobrano do badań 150 prób, które podzielono na 2 kategorie: A – ryby najczęściej sprzedawane i błędnie oznaczane, tj. morszczuk (n=37), kingklip (*Gemypterus capensis*) (n=31), tuńczyk (n=16) i dorsz (n=6); B – ryby określane jako „ryba dnia” oraz „złapana na wędkę” (n=60). Podobnie jak w poprzednich przykładach do analizy zastosowano barkoding DNA z użyciem genu *COI*, jak również pętli D (D-loop). Błędne oznakowanie stwierdzano najczęściej w odniesieniu do ryb z kategorii B (36%), w postaci wysokiego zróżnicowania gatunkowego. W próbach kategorii A fałszywą deklarację gatunku odnotowano w 6 przypadkach (7%). Prawdopodobieństwo zakupu źle oznakowanej ryby było nieco wyższe w sklepach detalicznych (18,7%) niż w restauracjach (17,6%) [7].

Drugą grupą najczęściej fałszowanych produktów jest nabiał. W tym przypadku oszustwo może polegać na rozcieńczaniu mleka, użyciu mleka innego gatunku lub różnych jego proporcji. Najgłośniejszym skandalem dotyczącym produktów mlecznych był dodatek melaminy do mleka w proszku dla niemowląt oraz sprzedaż „świeżego” mleka wyprodukowanego z przeterminowanego mleka w proszku z melaminą [3].

Przykładem analizy nabiału jest zastosowanie metody kwadrupleks real-time PCR (qPCR) do szybkiej identyfikacji obecności DNA krowy, bawoła, owcy i kozy. Metoda polega na użyciu starterów specyficznych dla każdego z wymienionych gatunków z zastosowaniem odczytnika SYBR®GreenER. Przetestowana została na mieszaninach mleka w różnych proporcjach, serach przygotowanych z tych mieszanin oraz przetworach mlecznych dostępnych w sklepach. Potwierdzono wysoką czułość tej metody (limit detekcji – 0,1%); wyniki są porównywalne z uzyskanymi w oddzielnych reakcjach dla każdego gatunku (simpleks real-time PCR). Stosując technikę qPCR wykazano, że tylko 61% przetworów mlecznych ma skład identyczny ze wskazaniami producenta. Zafałszowania dotyczyły obecności niezadeklarowanego mleka krowiego, obecności tylko jednego rodzaju mleka zamiast mieszaniny lub dodatku mniejszej ilości mleka niż podano w składzie [1]. Inną metodę identyfikacji tych samych gatunków w przetworach mlecznych zaproponowali Gonçaves i wsp. [17]. Polega ona na amplifikacji 9 regionów mtDNA (multiplex PCR) i ich identyfikacji przy pomocy elektroforezy kapilarnej przy poziomie detekcji poniżej 1%. Badanie 96 przetworów mlecznych zakupionych w sklepach wykazało w 12,5% przypadków niezgodność składu z opisem, polegającą na braku zadeklarowanego mleka w produkcie i dodatku mleka krowiego lub koziego bez ich wskazania.

Z kolei Ganopoulos i wsp. [15] wykazali użyteczność metody HRM (high resolution melting), opartej na analizie krzywej topnienia fragmentu mitochondrialnej pętli D oraz genu tRNA Lys, do analizy składu greckiego sera feta. Oznaczony jest on znakiem chronionej nazwy pochodzenia (PDO) i produkowany głównie z mleka owczego, przy czym dopuszczalny udział mleka koziego nie może przekroczyć 30%. Po przeprowadzeniu badań wykazano, że stosując tę metodę tą można wykryć nawet 0,1% dodatku mleka krowiego w serze oraz określić udział mleka owczego i koziego w tym produkcie. Analiza 8 prób zakupionych w sklepach jako ser feta PDO nie wykazała obecności mleka krowiego, natomiast w 1 przypadku zaobserwowano przekroczenie 30% udziału mleka koziego. Innym serem poddanym analizie autentyczności był świeży ser produkowany z mleka koziego (frescal). W badaniu zastosowano 2 pary starterów (dupleks PCR) komplementarnych do sekwencji 12S rRNA kozy i krowy. Dowiedziono, że test ten jest w stanie wykryć dodatek 0,5% mleka krowiego w serze. Analiza 20 prób serów kozich reprezentujących 4 różne marki, nabytych w 3 supermarketach w ciągu 12 miesięcy w Rio de Janeiro, wykazała, że wszystkie zawierały niezadeklarowane mleko krowy [16].

Jednym z pomysłów zabezpieczenia mleka przed fałszerstwem jest dodawanie do niego cząstek krzemionki ze związanym DNA (SPED – Silica Particles with Encapsulated DNA) w trakcie przetwarzania. Użyteczność metody została przeanaliz-

zowana przez Bloch i wsp. [4] na mleku z dodatkiem 0,1-100 µg cząsteczek/kg mleka oraz jego przetworach – jogurcie i serze. Z produktów tych z powodzeniem wyizolowano związany DNA, pozwalający na identyfikację i ocenę ilościową oznakowanych produktów, przy limicie detekcji sięgającym poniżej 1 µg cząsteczek/kg mleka. Należy dodać, że metoda ta jest dość tania – oznakowanie tony mleka przy koncentracji 10 µg cząsteczek/kg mleka to koszt poniżej 0,10 USD, a użyta krzemionka (E551) uznawana jest za nieszkodliwą i korzystnie wpływającą na zdrowie.

Ostatni przykład jest nieco kontrowersyjny, a dotyczy on mleka ludzkiego. Amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA) nie zaleca stosowania tego typu mleka do karmienia niemowląt od niemonitorowanych dawców, jednak handel nim przez Internet staje się coraz bardziej popularny. Keim i wsp. [21] anonimowo nabyli 102 próby mleka reklamowane w Internecie jako ludzkie. Wyizolowano z nich DNA, a następnie poddano analizie przy użyciu real-time PCR z wykorzystaniem sekwencji genu mitochondrialnego – *MT-ND5* (mitochondrialnie encoded NADH dehydrogenase 5). Wszystkie próby zawierały ludzki DNA, jednak w przypadku 11 stwierdzono obecność DNA krowy; 10 z nich zawierało co najmniej 10% jego dodatku. Monitorowanie tego proceduru jest niezwykle ważne ze względu na alergie oraz nietolerancje mleka krowiego u dzieci.

Falszowanie produktów mięsnych poprzez użycie tańszego mięsa lub otrzymanego z gatunków niepożądanych jest bardzo częstą praktyką na całym świecie [2]. Wyjątkowo kontrowersyjnym typem fałszerstwa, które stwierdzono w Chinach było zastępowanie baraniny poprzez mięso szczurów i myszy. Doniesiono, że dodawano te rodzaje mięsa do szaszłyków z grilla w przyulicznych jadłodajniach, a ludzie którzy je spożyli cierpieli na nudności, wymioty lub bardziej poważne dolegliwości, spowodowane rodentycydami lub bakteriami. Test pozwalający na wykrycie obecności mięsa myszy i szczurów laboratoryjnych oraz dzikich myszy zaproponowali Fang i Zhang [13]. Wykorzystuje on metodę real-time PCR z użyciem specyficznych starterek, komplementarnych do mitochondrialnego genu *CYTB*. Jako negatywną kontrolę użyto mięsa ze świni, krowy, kozy, kaczki, kurczaka oraz szaszłyków baranich, jako próbę symulacyjną zmieszane mięso myszy i szczura z mięsem innych gatunków w znanych proporcjach, a negatywną – szaszłyki zabezpieczone przez Ministerstwo Bezpieczeństwa Publicznego w Szanghaju. Wykazano, że test jest przydatny do wykrywania dodatku mięsa szczura i myszy przy limicie detekcji poniżej 1 pg DNA/reakcję i kontaminacji w mięsie mieszanym wynoszącej 0,1%. Kolejnym kontrowersyjnym przykładem fałszowania mięsa było doniesienie w telewizji ABC News (USA) o dodatku mięsa małp do sporządzania zupy z pulpetami (bakso) w Indonezji. U zajmującej się tym procederem pary znaleziono ok. 30 kg mięsa uzyskanego z 25-30 osobników należących do chronionego gatunku – lutunga jawańskiego (*Trachypithecus auratus*), broń oraz żywe osobniki [9]. Ponadto gazeta „The Times of India” podała informacje o zabijaniu na potrzeby własne oraz eksporcie przetworzonego mięsa i mózgow małp ze stanu Chhatitgarh w środkowo-wschodnich Indiach do Afryki, Japonii, Korei, Tajwanu, Chin i innych krajów [11]. Makak (*Macaca fascicularis sp.*) jest trzecim co do wielkości populacji przedstawicielem naczelnych i jest wyjątkowo narażony na zagrożenie ze strony ludzi. Rashid i wsp. [29] zaprojektowali test z użyciem metody PCR-RFLP wykorzystujący zmienność mitochondrialnego genu 18S rRNA. Jego specyficzność została potwierdzona u 17 gatunków zwierząt, włączając koty, psy i ryby, przy osiągnięciu limitu detekcji wynoszącym 0,00001 ng DNA lub 0,1% dodatku mięsa. Badanie nabytych w sklepach w Kuala Lumpur (Malezja) pulpetów wołowych (n=4) i drobiowych (n=4) produkowanych przez różnych producentów nie potwierdziło kontaminacji mięsem makaka.

Mięso zwierząt dzikich jest powszechnie konsumowane w Afryce Północnej. Uzyskiwane jest ono z chowu w systemie otwartym, jak i zamkniętym oraz z łowiectwa. W celu sprawdzenia

autentyczności produktów mięsnych dostępnych na rynkach lokalnych D'Amato i wsp. [10] zgromadzili 146 prób (14 opisanych jako mięso wołowe i 132 oznaczone jako zwierzęta łowne) i ustalili sekwencje 2 genów mitochondrialnych – *CYTB* i *COI*. Na 146 ocenionych próbach 101 było zafałszowanych (69,18%). Natomiast gdyby wyłączyć z nich próby mięsa wołowego, które były prawidłowo oznaczone, poziom substytucji mięsa zwierząt dzikich byłby jeszcze wyższy (76,5%). Mięso tych zwierząt zastępowane było głównie mięsem różnych gatunków zwierząt domowych (bydło, koń, świnia, owca), powszechnych w sklepach zwierząt dzikich (kudu – *Tragelaphus strepsiceros*, oryks południowy – *Oryx gazella*, struś, impala – *Aepyceros melampus*, springbok – *Antidorcas marsupialis*), niespotykanych w sklepach zwierząt dzikich (żyrafa, kob śniady – *Kobus ellipsiprymnus*, buszok – *Tragelaphus scriptus*, dujker – *Cephalophus dorsalis*, zebra górską – *Equus zebra*), jak również gatunku pochodzącego z innego kontynentu (kangur). Wymieniona zebra górską jest gatunkiem znajdującym się w czerwonej księdze IUCN (International Union for Conservation of Nature).

Hou i wsp. [19] przedstawili sposób jednoczesnej detekcji DNA kaczki, gęsi i kury w produktach mięsnych. Wykorzystuje on multipleks PCR ze staterami zaprojektowanymi dla mitochondrialnego genu *CYTB* kaczki, 12S rRNA kury i pętli D gęsi. Specyficzność testu została sprawdzona na próbach z wyizolowanym DNA krowy, świni i przepiórki. Oceniano zarówno świeże mięso, jak i poddane gotowaniu oraz autoklawowaniu. Wykazano, że metoda jest specyficzna dla 3 ocenianych gatunków drobiu, a poziom detekcji wynosi 0,05 ng DNA lub 1% domieszki mięsa zarówno świeżego, jak i przetworzonego. Autorzy przetestowali także 24 komercyjnie dostępne produkty mięsne nabyte w supermarketach i sklepach detalicznych w Wuhan City (Chiny), tj. świeże mięso, wędliny i przekąski. Wyniki analiz wykazały, że 6 prób zawierało niezadeklarowany dodatek mięsa kur, 2 – dodatek mięsa kaczki, a 1 – dodatek obu gatunków.

Innym przykładem badania autentyczności przetworów mięsnych jest турецka kiełbasa sucuk, wyrabiana przeważnie z wołowiny; dodatek wieprzowiny nie jest dozwolony w krajach muzułmańskich. İlhak i Güran [20] z użyciem metody multipleks PCR przebadali 50 kiełbas sucuk, nabytych w sklepach lokalnych, mięsnych i delikatesach, pod kątem obecności mięsa konia, osła, kurzego, indyka, świni i krowy. Jako 100% wołowe opisano 30 kiełbas, a pozostałe jako wołowe z dodatkiem mięsa z kurcząt i indyków. Wyniki analiz wykazały, że 23,3% kiełbas wołowych zawierało dodatek drobiu, natomiast żadna z 50 ocenianych nie miała w swym składzie wieprzowiny; w 1 przypadku stwierdzono obecność koniny.

Jak już wspomniano, miód także stał się obiektem fałszerstw. Najgłośniejsza afera dotyczyła dodatku tanich słodzików, cukru, wody, syropu kukurydzianego, jak również obecności antybiotyków i pestycydów w miodzie importowanym z Chin [25].

Laube i wsp. [26] zaproponowali test do potwierdzania autentyczności miodu z Korsyki – Miel de Corse, który opatrzony jest znakiem chronionej nazwy geograficznej (PDO). W odróżnieniu od wcześniej wymienionych metod nie wykorzystuje on analizy DNA gatunku produkującego miód – pszczoły, lecz badanie DNA znoszonego do ula nektaru kwiatowego, z którego wytwarzany jest miód. Autorzy zgromadzili od 12 do 15 prób miodów z każdego z 4 regionów – Korsyki, Galicji, Niemiec i Wielkiej Brytanii, a następnie zastosowali real-time PCR z sondami TaqMan™ do określenia ich składu botanicznego. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że: 1) DNA rzepaku był nieobecny w miodach z Korsyki i Galicji, występował natomiast w miodach niemieckich i angielskich; 2) DNA słodkich kasztanów wykryto w prawie wszystkich miodach z Korsyki i Galicji, a tylko kilku z Niemiec i Wielkiej Brytanii; 3) DNA czystka i oliwki występował tylko w miodzie z Korsyki. Autorzy podsumowali, że zaproponowana metoda z powodzeniem może określić pochodzenie geograficzne miodu z analizowanych regionów, przy limicie detekcji 25 pg DNA.

Liczne doniesienia o złych praktykach stosowanych przez producentów powodują wzrost świadomości społeczeństwa w odniesieniu do składu pasz dla zwierząt gospodarskich i karmy dla zwierząt domowych. Przykładem może być wykrycie w 2013 roku w Hiszpanii śladów tkanki psa w paszy dla zwierząt domowych. Proceder ten zainspirował Espiñeira i Vieitesa [12] do stworzenia testu pozwalającego na wykrycie obecności tkanek kota i psa w paszy i karmie dla zwierząt. Bazuje on na zmienności sekwencji genu *COI* z wykorzystaniem metody real-time PCR (sondy TaqMan™). Wykazano, że test jest gatunkowo specyficzny, odpowiedni do badania produktów przetworzonych, np. puszkowanych, a limit detekcji wynosi 2 i 0,2 pg DNA, odpowiednio psa i kota. Metoda posłużyła do przebadania prób dostępnych komercyjnie: przetworzonego białka zwierzęcego (n=32), mokrej karmy dla psów i kotów (n=37), dań mięsnych (n=10) oraz pasz (n=21). W żadnej z analizowanych prób nie stwierdzono obecności DNA psa ani kota. Tę samą technikę, lecz badającą zmienność sekwencji 3'-UTR genu *MyHC2*, zastosowali Maine i wsp. [28] do analizy składu 17 karm dla psów i kotów renomowanych producentów. W większości z nich stwierdzono znaczny udział niezadeklarowanych gatunków zwierząt. Na 17 prób w 14 wykryto DNA krowy, świni i kury w różnych proporcjach i kombinacjach, podczas gdy na opakowaniu nie podano informacji o ich dodatku w karmie. Natomiast na 7 produktów opisywanych jako wołowe, tylko w 2 stwierdzono obecność tego mięsa przekraczającą 50%, resztę stanowiło mięso drobiowo-wieprzowe. Rojas i wsp. [30] przedstawili test oparty na gatunkowo specyficznym PCR, służący do potwierdzania obecności 3 gatunków ptaków w karmach dla zwierząt. Wykorzystuje on zmienność mitochondrialnego genu 12S rRNA. Za pomocą testu przebadano 100 prób karmy, nabytych w różnych sklepach detalicznych w Hiszpanii, obejmujących 32 karmy puszkowane i suche dla kotów z dodatkiem przepiórki, 17 i 12 puszkowanych karm odpowiednio dla kotów i psów z dodatkiem bażanta oraz 15 karm suchych i 14 półwilgotnych dla psów z dodatkiem strusia. Zastosowana metoda wykryła zadeklarowane gatunki w 88 próbach, co wskazuje, że pozostałe 12 produktów opisano niewłaściwie.

Tradycyjna medycyna chińska opiera się na wykorzystaniu preparatów uzyskanych z rozmaitych roślin, a także zwierząt. Jak się okazuje, również w przypadku tych produktów często zdarzają się fałszerstwa.

Preparat *Oviductus Ranae* otrzymywany jest z suszonych jajowodów żaby *Rana chensinensis*. Stosowany jest w celu poprawy wyglądu skóry, a także uzupełniania „esencji vitalnej” nerek i płuc. Zastosowanie specyficznych starterów, komplementarnych do genu *CYTB* wykazało, że tylko 20% sprzedawanych w sklepach preparatów jest autentyczna; pozostałe zawierały tkanki uzyskane od innych gatunków żab [33]. Niemrawce prążkowane (*Bungarus multicinctus*) są jadowitymi węzami, z których ciał wytwarza się tradycyjny chiński preparat – JBS (Jinqian Baihua She). Jest on używany w leczeniu lub zapobieganiu bólowi kości, stawów, reumatyzmowi, a nawet paraliżowi. Preparat produkuje się z młodych, zwiniętych osobników o wielkości monety. Próby ich chowu nie przyniosły sukcesu, dlatego cena preparatu jest wysoka, co jest przyczyną licznych fałszerstw – jak do tej pory wykryto 9 gatunków węży sprzedawanych jako JBS. Wszystkie z nich zostały zgromadzone przez Chao i wsp. [8], w celu określenia sekwencji genu *COI*, a następnie stworzenia barkodingu do określania przynależności gatunkowej. Fragment tego genu o długości 658 pz pozwolił na rozróżnienie każdego z analizowanych gatunków. Na 10 prób preparatu JBS nabytych w aptekach i sklepach z lekami naturalnymi 5 było zafałszowanych poprzez użycie innego gatunku – *Dinodon rufozonatum*, który jest z powodzeniem utrzymywany w niewoli.

Klej z osła – ACC (Asini Corii Colla) jest tradycyjnym preparatem stymulującym hematopoezę i hamującym krwawienie. Produkowany jest głównie w Shangton (Chiny), a otrzymuje się go z suchej skóry, kości, ścięgien i więzadeł. Ze względu na wysoką cenę preparatu zdarzało się, że dodawano do niego skóry i kości

innych zwierząt gospodarskich. Kumeta i wsp. [23] zaproponowali test do potwierdzania autentyczności ACC, oparty na zastosowaniu starterów gatunkowo specyficznych dla osła, krowy, świni i konia. Do analizy wykorzystano sekwencje genu mitochondrialnego – *CYTB*. Autorzy potwierdzili, że test jest w stanie wykryć dodatek 0,1% kleju z krowy, jednak nie przetestowali prób komercyjnie dostępnego preparatu. Z kolei do rozróżniania suhaka stepowego (*Saiga tatarica*) od kozy z powodzeniem zastosowano PCR allelospecyficzny, wykorzystujący zmienność genów mitochondrialnych 12SrRNA, 16SrRNA, *CYTB* i *COI*. Ze sproszkowanych rogów tego gatunku oraz 23 roślin produkuje się preparat o nazwie Lingyang Qingfei Wan, który używany jest przy obniżaniu gorączki, usuwaniu toksyn, odkrztuszaniu flegmy i atakach kaszlu. Suhak stepowy jest gatunkiem zagrożonym, więc dostęp do jego rogów jest ograniczony, co wiąże się z wysokimi cenami preparatu i jego fałszowaniem z użyciem rogów kozy [5]. Inna metoda – barkodowanie DNA, została z powodzeniem wykorzystana do analizy autentyczności preparatów uzyskanych z gekona toke (*Gekko gecko*), a także jako narzędzie kryminalistyczne do identyfikacji rogów gatunków zagrożonych z rodziny wołowatych i jeleniowatych oraz ich nielegalnych substytutów [18, 34].

Ostatnim przykładem chętnie podrabianego produktu, na który możemy natrafić na wielu rynkach jest paszmina – najlepsza odmiana wełny kaszmirowej. Uzyskuje się ją od 3 ras kóz: changthangi, chegu i chyangara. Ze względu na ograniczoną dostępność oraz wysokie ceny, związane z pracochłonnym pozyskiwaniem tego surowca, jego fałszowanie przez producentów tekstyliów stało się zjawiskiem bardzo powszechnym. Kumar i wsp. [22] stworzyli test oparty na analizie mitochondrialnego genu 12S rRNA, który pozwala odróżnić paszminę od wełny owczej, która stanowi jej najczęstszy substytut. Zastosowanie starterów gatunkowo specyficznych pozwala na wykrycie 5% dodatku wełny owczej w świeżym materiale oraz 10% dodatku w materiale przetworzonym – tkaninie. Ponadto potwierdzono, że jest to test specyficzny dla tych 2 gatunków, gdyż w przypadku DNA wyizolowanego z włosów angory, wielbłąda, jawa oraz z bawełny nie uzyskano amplikonów.

Przedstawione przykłady wyraźnie pokazują, jak wielki potencjał tkwi w technikach analizy DNA jako narzędziu do potwierdzania autentyczności żywności. Dzięki takim właściwościom DNA jak termostabilność oraz jego obecności we wszystkich tkankach, możliwe jest badanie szerokiej gamy wysoko przetworzonych produktów przy limicie detekcji sięgającym poniżej 0,1% dodatku gatunku obcego. Ciągły rozwój tych technik, coraz większa dostępność i redukcja kosztów ich zastosowania może się przyczynić do dokładniejszej kontroli żywności, co nam, jako konsumentom, na pewno wyjdzie „na zdrowie”.

Literatura: 1. Agrimonti C., Pirondini A., Marmiroli M., Marmiroli N., 2015 – Food Chem. 187, 58-64. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.04.017. 2. Ballin N.Z., 2010 – Meat Sci. 86, 577-587. doi: 10.1016/j.meatsci.2010.06.001. 3. BBC, 2010 – Arrests in China over milk tainted with melamine. <http://www.bbc.com/news/world-asia-pacific-11372917> (dostęp 25.09.2015). 4. Bloch M.S., Paunescu D., Stoessel P.R., Mora C.A., Stark W.J., Grass R.N., 2014 – J. Agric. Food Chem. 62, 10615-10620. doi: 10.1021/jf503413f. 5. Cao M., Wang J., Yao L., Xie S., Du J., Zhao X., 2014 – Mol. Biol. Rep. 41 (4), 2485-2491. doi: 10.1007/s11033-014-3105-x. 6. Carvalho D.C., Neto D.A., Brasil B.S., Oliveira D.A., 2011 – Mitochondrial DNA 22, Suppl. 1, 97-105. doi: 10.3109/19401736.2011.588219. 7. Cawthorn D.M., Duncan J., Kastern C., Francis J., Hoffman L.C., 2015 – Food Chem. 185, 165-181. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.03.113. 8. Chao Z., Liao J., Liang Z., Huang S., Zhang L., Li J., 2014 – Pharmacogn Mag. 10, 449-457. doi: 10.4103/0973-1296.141816. 9. Creagh S., 2010 – Two arrested two over monkey meatballs. Reuters, <http://www.reuters.com/article/2010/04/28/us-monkey-meatballs-idUSTRE63R35M20100428> (dostęp 10.09.2015). 10. D'Amato M.E., Alechine E., Cloete K.W., Davison S., Corach D., 2013 – Investig Genet. 41, 6. doi: 10.1186/2041-2223-4-6. 11. Drolia R., 2014 – Illegal monkey meat trade rampant in Chhattisgarh. The Times of India, <http://timesofindia.indiatimes.com/city/raipur/Illegal-monkey-meat-trade-rampant-in-Chhattisgarh/articleshow/33642249.cms> (dostęp 10.09.2015). 12. Espiñeira M., Vieites J.M., 2015 – Eur.

Food Res. Technol. 241, 233-238. doi: 10.1007/s00217-015-2448-4. **13. Fang X., Zhang C.**, 2016 – Food Chem. 192, 485-490. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.07.020. **14. Food Fraud Resources**, <http://www.food-fraudresources.com> (dostęp 25.09.2015). **15. Ganopoulos I., Sakaridis I., Argiriou A., Madesis P., Tsaftaris A.**, 2013 – Food Chem. 141, 835-840. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.02.130. **16. Golinelli L.P., Carvalho A.C., Casaes R.S., Lopes C.S., Deliza R., Paschoalin V.M., Silva J.T.**, 2014 – J. Dairy Sci. 97, 6693-6699. doi: 10.3168/jds.2014-7990. **17. Gonçalves J., Pereira F., Amorim A., van Asch B.**, 2012 – J. Agric. Food Chem. 60, 10480-10485. doi: 10.1021/jf3029896. **18. Gu H.F., Xia Y., Peng R., Mo B.H., Li L., Zenga X.M.**, 2011 – Nat. Prod. Commun. 6, 67-71. **19. Hou B., Meng X., Zhang L., Guo J., Li S., Jin H.**, 2015 – Meat Sci. 101, 90-94. doi: 10.1016/j.meatsci.2014.11.007. **20. İlhak O. İ., Güran H. Ş.**, 2015 – J. Fac. Vet. Med. Istanbul Univ. 41, 6-11. doi: 10.16988/iuvfd.2015.81917. **21. Keim S.A., Kulkarni M.M., McNamara K., Geraghty S.R., Billockd R.M., Ronau R., Hogan J.S., Kwiek J.J.**, 2015 – Pediatrics 135 (5): e1160. doi: 10.1542/peds.2014-3554. **22. Kumar R., Shakyawar D.B., Pareek P.K., Raja A.S., Prince L.L., Kumar S., Naqvi S.M.**, 2015 – Appl. Biochem. Biotechnol. 175 (8), 3856-3862. doi: 10.1007/s12010-015-1552-z. **23. Kumeta Y., Maruyama T., Asama H., Yamamoto Y., Hakamatsuka T., Goda Y.**, 2014 – J. Nat. Med. 68, 181-185. doi: 10.1007/s11418-013-0790-z. **24. Kung H.F.,**

Tsai Y.H., Chang S.C., Hong T.Y., 2012 – J. Food Prot. 75, 1814-1822. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-061. **25. Laasby**, 2013 – 'Honey laundering' means fake honey coming in from China, experts warn. Journal Sentinel, <http://www.jsonline.com/blogs/news/206463151.html> (dostęp 25.09.2015). **26. Laube I., Hird H., Brodmann P., Ullmann S., Schöne-Michling M., Chisholm J., Broll H.**, 2010 – Food Chem. 118, 979-986. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.063. **27. Lowenstein J.H., Amato G., Kolokotronis S.O.**, 2009 – PLoS One 4, e7866. doi: 10.1371/journal.pone.0007866. **28. Maine I.R., Atterbury R., Chang K.-Ch.**, 2015 – Acta Vet Scand. 57, 7. doi: 10.1186/s13028-015-0097-z. **29. Rashid N.R., Ali M.E., Hamid S.B., Rahman M.M., Razzak M.A., Asing, Amin M.A.**, 2015 – Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo Risk Assess. 32, 1013-1022. doi: 10.1080/19440049.2015.1039073. **30. Rojas M., I. González I., S. De la Cruz S., Hernández P.E., García T., Martín R.**, 2011 – Anim. Feed. Sci. Tech. 169, 128-133. doi:10.1016/j.anifeeds.2011.05.006. **31. Śmiechowska M.**, 2013 – Annales Academiae Medicae Gedanensis 43, 175-181. **32. Vartak V.R., Narasimalu R., Annam P.K., Singh D.P., Lakra W.S.**, 2015 – J. Sci. Food Agric. 95, 359-366. doi: 10.1002/jsfa.6728. **33. Xuegan Y., Yiquan W., Kaiya Z., Zhongquan L.**, 2002 – Biol. Pharm. Bull. 25, 1035-1039. **34. Yan D., Luo J.Y., Han Y.M., Peng C., Dong X.P., Chen S.L., Sun L.G., Xiao X.H.**, 2013 – PLoS One 8, e55854. doi: 10.1371/journal.pone.0055854.

Spożycie wybranych produktów pochodzenia zwierzęcego a zachorowalność na choroby cywilizacyjne

Elżbieta Krzęcio-Nieczyporuk, Katarzyna Antosik

Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach

Odnotowywany w wielu wysokorozwiniętych krajach spadek lub wyraźne obniżenie tendencji wzrostu spożycia produktów pochodzenia zwierzęcego związane jest ze zmianą zwyczajów żywieniowych konsumentów oraz promocją tzw. zdrowej żywności. Panuje bowiem przekonanie o niekorzystnym wpływie nie tylko mięsa, ale również mleka i produktów mlecznych, jaj oraz miodu na zdrowie człowieka, przejawiającym się wzrostem zachorowań na choroby nowotworowe, układu krążenia czy wzrostem poziomu tzw. złego cholesterolu, tj. frakcji LDL [13, 14, 66]. Opinia ta nie do końca jest prawdziwa i często prowadzi do wyeliminowania produktów pochodzenia zwierzęcego z diety, co wpływa znacząco na zdrowie człowieka. Należy bowiem pamiętać, że mięso, jak i ryby, mleko, masło, jaja czy miód dostarczają wielu składników niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu, między innymi wysokiej jakości białka o korzystnych proporcjach aminokwasów, niezbędnych mikroelementów czy witamin [10, 18, 50, 52, 58, 59, 60, 74]. Brak właściwej informacji dotyczącej wartości odżywczej tych produktów może prowadzić do braku spójności pomiędzy postawami i zachowaniem konsumentów.

Wśród produktów pochodzenia zwierzęcego najwięcej kontrowersji co do roli i znaczenia w diecie człowieka budzi spożywanie mięsa. Mięso stanowi w diecie człowieka cenne i trudne do zastąpienia źródło wielu składników pokarmowych. Zapewnia ono dostarczenie wysokowartościowego białka, zawierającego komplet aminokwasów egzogennych, dobrze przyswajal-

nego żelaza, cynku, selenu, szeregu witamin – głównie z grupy B, niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka, szczególnie w okresach wzmożonego zapotrzebowania [11]. Składniki pokarmowe zawarte w mięsie mogą być dostarczane do organizmu człowieka także z innych produktów, ale pozostaje wówczas problem zachowania ich właściwego bilansu oraz stopnia przyswajalności [41, 50, 78]. Typowym przykładem takiego składnika jest żelazo. Wchodzi ono w skład hemoglobiny i bierze udział w transporcie tlenu do mięśni i tkanek, a przewlekły niedobór żelaza w organizmie może prowadzić do anemii. Przyswajalność żelaza hemowego, pochodzącego z mięsa wynosi ok. 20-30%, podczas gdy żelazo niehemowe, pochodzące z produktów roślinnych jest przyswajalne przez organizm człowieka zaledwie w ok. 5% (1-8%). Mięso czerwone (wołowe, baranie, wieprzowe) jest wartościowym źródłem żelaza w diecie człowieka [2, 50].

Mathijs [51] podkreśla, że spożywanie mięsa i jego wpływ na zdrowie człowieka jest odmiennie postrzegane w różnych rejonach świata. O ile w krajach rozwijających się wzrost spożycia mięsa jest jednoznacznie kojarzony z jego dobroczynnym wpływem na organizm człowieka, o tyle w krajach wysokorozwiniętych – w których średnie spożycie mięsa jest zazwyczaj wielokrotnie wyższe – spożywanie mięsa jest kojarzone ze zwiększonym ryzykiem zachorowań na choroby układu krążenia czy niektóre nowotwory (szczególnie okrężnicy i odbytnicy). W środowach masowego przekazu, a także w fachowej literaturze medycznej spożywanie mięsa (a szczególnie mięsa czerwonego) łączone jest ze zwiększonym ryzykiem zachorowań na tzw. choroby cywilizacyjne [15, 45, 65]. Ferguson [26] zdecydowanie przeciwstawia się tak jednoznaczному formułowaniu tego typu wniosków, powstawanie nowotworów warunkowane jest bowiem wieloma czynnikami zarówno środowiskowymi, jak i genetycznymi, wśród których są czynniki do dziś nierozpoznane. Ponadto, ogromne zróżnicowanie metodyczne prowadzonych w tym zakresie badań praktycznie uniemożliwia porównywanie ich wyników [47, 77].

Należy wyraźnie zaznaczyć, że zagrożenia bezpieczeństwa zdrowotnego mięsa nie wynikają bezpośrednio z jego inherentnych właściwości, lecz głównie ze sposobu przygotowania do spożycia i zastosowanych procesów technologicznych (a właściwie poziomu ich parametrów) i pojawiają się przy nadmiernym spożyciu produktów przetworzonych [26, 30, 56]. Nieprawidłowo przeprowadzone procesy technologiczne przy przetwarzaniu mięsa (szczególnie obróbka cieplna) mogą przyczynić się do