

THE YIELD OF DNA IN THERMAL TREATED DEER MEAT

Eubomír Belej, Miroslava Barnová, Lenka Maršálková, Jozef Golian

ABSTRACT

Residuals of DNA are one of the most important factors for detection, traceability and reverse authentication of deer meat. In this project we isolated DNA from deer processed meat and analysed by electrophoresis. Goal of the study was compute ratio between raw meat and several heat processed deer meat. Samples were prepared by five heat treatment techniques (pan roasted with temperature 180-240 °C, fried with 156 °C, braised with temperature 100-150 °C, boiled in 100.2 °C water and autoclaved in different time intervals). The highest amount of residual DNA 1927ng was obtained with two hours boiled sample. The lowest value 89.89ng was obtained with one hour braised sample. In technological adjustments highest amount of DNA and 1927ng, so the total yield of 192.7ng.⁻¹ was observed in the sample we cooked for two hours at boiling temperature.

Keywords: DNA, temperature, deer meat

ÚVOD

Pretože mäso je súčasťou ľudskej výživy, má byť nutrične hodnotené zo všetkých aspektov výživy. Mäso má byť posudzované ako potravinu, ktorá človeku poskytuje nielen všetky potrebné výživové zložky, ale často tiež nežiaduce látky (Chudý et al., 2000).

Pojem kvalita mäsa nie je vo svete chápaný jednoznačne, pretože v jednotlivých štátoch sú rôzne kritéria na kvalitu mäsa. Väčšina autorov rozdeľuje pojem kvalita mäsa na časť objektívnu, ktorú možno stanoviť merateľnými chemickými a fyzikálnymi metódami a na subjektívnu časť, hodnotiteľnú zmyslovými orgánmi človeka, pričom konečné zhodnotenie subjektívnej zložky kvality mäsa je ovplyvnené tiež cenou, dostupnosťou mäsa a nutričnou hodnotou (Chudý et al., 2000). Pod kvalitou mäsa rozumieme súhrn všetkých sensorických, spracovateľsko-technických, výživno fyziologických a hygienicko-toxikologických vlastností mäsa (Hofmann, 1994).

Divina sa pokladá za biologicky hodnotnejšiu potravinu ako mäso jatočných zvierat. Vlastnosti a zloženie diviny ovplyvňuje druh, pohlavie, vek, životné prostredie (Stevenson, Seman, Littlejohn, 1992; Volpelli et al., 2002).

Agarózová elektroforéza patrí medzi jednoduché, pomerne rýchle metódy na izoláciu, identifikáciu a prečistenie fragmentov DNA (Holme et al., 1998).

MATERIÁL A METÓDY

Vzorky mäsa sme nakrájali na kocky rovnakej veľkosti 2,5 cm. Vzorky boli skladované v mraziacom boxe pri teplote -18 °C do nasledujúceho dňa, kedy sme vzorky tepelne upravovali rôznymi spôsobmi (Tab. 1).

DNA z tkanív sme izolovali pomocou NucleoSpin® Food Isolation Kit (Macherey-Nagel, Germany).

Kvalitu extrahovanej DNA sme stanovovali elektroforeticky v 1 % agarózovom gély. Gél sme si rozpustili v mikrovlnnej rúre pri teplote 130 °C po dobu 1,5 minúty. Po rozpustení gélu sme do varnej kadičky naliali destilovanú vodu aby sme dosiahli obsah 100ml. Opäť sme takto pripravený gél zohrievali 1,5 minúty pri teplote 130 °C. Celý proces sme opakovali 2x. Takto tepelne upravený gél sme si vychladili pod studenou tečúcou vodou. Po vychladení sme do gélu pridali 10 µl

Produktu reštrikčných alebo amplifikačných reakcií sa delia podľa svojej relatívnej molekulovej hmotnosti a veľkosti náboja agarózovou elektroforézou DNA fragmentov v géle (Sambrook et al. 1989).

Meyer et al., (1994); Hird et al., (2006) zistili že DNA je značne degradovaná pri vyšších teplotách varenia, v tomto prípade nám výsledky umožnili zistiť teplotu, pri ktorej dochádza k rozkladu DNA na menšie fragmenty. Jadrová DNA je veľmi premenlivá, ale poskytuje základ pre individuálny systém vysledovateľnosti zvierat (Loftus, 2005).

Zhang et al. (2007) tiež zistil, znížené pomery u vareného / spracovaného mäsa v porovnaní s čerstvým mäsom. Degradácie DNA, vzhľadom na varenie a iné spracovanie mäsa, môžu mať vplyv na výsledky získané počas následnej analýzy, čo môže viesť ku kvantitatívnej a kvalitatívnej chybe (Teletchea et al., 2005).

Židek, Pokorádi, Bándry (2008) zistili že ďalšou vhodnou metódou vysledovateľnosti jeleňovitých zvierat je použitie mikrosatelitov.

Vybrané mikrosatelitné markery sú polymorfne a sú vhodné pre vysledovateľnosť jeleňovitých. (Židek et al., 2009).

etídium bromidu, jedná sa o interkalačnú látku, ktorá sa používa pri vizualizácii fragmentov DNA. Dokáže sa včleniť medzi nukleotidy DNA a pri použití UV transiluminátora dochádza k vizualizácii DNA a jej špecifických fragmentov. Na mastný papierik sme si po kvapkách veľkosti 3 µl naniesli nanášaciu farbu (Loading Dye Solution, 6X Mass Ruler) a dve kvapky veľkosti 3 µl Fast ruler DNA. Jedna sa o farbu, ktorá nám v končenom dôsledku zobrazí 5 fragmentov básových párov, na základe ktorých sme určovali intenzitu poškodenia DNA. Jednu kvapku nanášacej farby sme premiešali s kvapkou Fast ruler DNA a naniesli do gélu do prvej kolónky a rovnako druhu kvapku farby sme naniesli do poslednej kolónky. Rovnako sme postupovali pri nanášaní vzorky. Na gél sme naniesli 10 µl DNA vzorky s pridaním 3 µl nanášacej farby. Keďže obsah bol väčší jednu vzorku sme nanášali 2x. Elektroforézu v horizontálnom usporiadaní

potravinárstvo

sme uskutočnili pri potenciálovom spáde 125 V/cm počas 45 minút. DNA sme vizualizovali UV žiarením o vlnovej dĺžke 312 nm. Elektroforetické gély sme zdokumentovali pomocou digitálneho fotografického prístroja.

Tepelným opracovaním a následnou PCR reakciou sme získali podklad na gélovú elektroforézu ktorej vyjadrením

je histogram intenzity farby, ktorý sme analyzovali programom Gel-Pro Analyzer 3.1 (Media Cybernetics, USA). Na základe histogramu intenzity sme vyjadrili celkovú výťažnosť analýz v $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (Tab. 2-3).

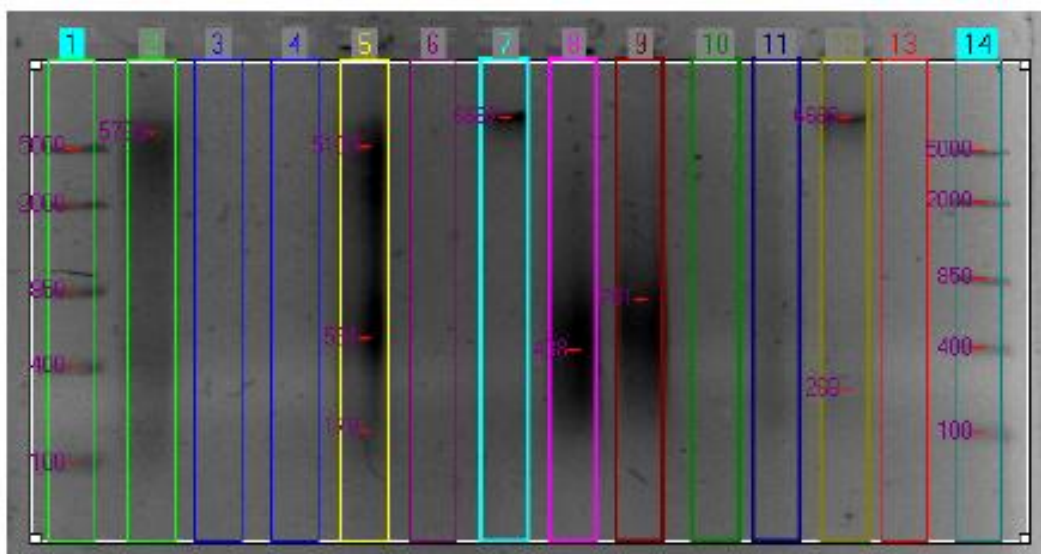
Tabuľka 1 Spôsob tepelnej úpravy vzoriek

č. vzorky	vzorka	dĺžka úpravy	spôsob úpravy
1	výpek	15 min	Pečenie na panvici s trochou tuku pri teplote 240°C
2	vnútro svaloviny		
3	okraj svaloviny		
4	výpek	15 min	Vyprážanie v hlbokom tuku(fritovanie) pri teplote 156°C
5	vnútro svaloviny		
6	okraj svaloviny		
7	vnútro svaloviny	60 min	Varenie vo vriacej vode pri teplote varu
8	šťava		
9	vnútro svaloviny		
10	okraj svaloviny	120 min	Varenie vo vriacej vode pri teplote varu
11	šťava		
12	vnútro svaloviny		
13	šťava	180 min	Dusenie vo vlastnej šťave s trochou oleja pri teplote 150 °C
14	vnútro svaloviny		
15	okraj svaloviny		
16	šťava	60 min	Dusenie vo vlastnej šťave s trochou oleja pri teplote 150 °C
17	vnútro svaloviny		
18	šťava		
19	vnútro svaloviny	120 min	autoklávovanie pri teplote 120°C
20	šťava		
21	vnútro svaloviny		
22	šťava	180 min	autoklávovanie pri teplote 120°C
23	vnútro svaloviny		
24	okraj svaloviny		
		Vzorka mäsa bez tepelnej úpravy	

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na obrázku 1 sú znázornené dráhy prvých dvanástich vzoriek v ktorých sú jednotlivé fragmenty DNA určitých dĺžok viditeľné ako pružky. V prvej a poslednej dráhe sú

spravidla štandardy molekulových hmotností, v ktorých sa separujú presne veľkostne definované DNA fragmenty umožňujúce odhadnúť neznáme veľkosti DNA fragmentov vo zvyšných dráhach.



Obrázok 1 Umiestnenie jednotlivých fragmentov DNA

potravinárstvo

Vysvetlivky k obrázku 1:

dráha č. 1, 14 - štandard molekulovej hmotnosti,

dráha č. 2 - (vnútro svaloviny - 3hod - 100 °C) - vzorka č. 12

dráha č. 3 - (šľava - 2hod - 100 °C) - vzorka č. 11

dráha č. 4 - (okraj svaloviny - 2hod - 100 °C) - vzorka č. 10

dráha č. 5 - (vnútro svaloviny - 2hod - 100 °C) - vzorka č. 9

dráha č. 6 - (šľava- 1hod - 100 °C) - vzorka č. 8

dráha č. 7 - (vnútro svaloviny - 1hod - 100 °C) - vzorka č. 7

dráha č. 8 - (okraj svaloviny - 15min.- 156°C) - vzorka č. 6

dráha č. 9 - (vnútro svaloviny - 15min - 156°C) - vzorka č. 5

dráha č. 10 - (výpek- 15min - 156°C) - vzorka č. 4

dráha č. 11 - (okraj svaloviny - 15min - 240°C) - vzorka č. 3

dráha č. 12 - (vnútro svaloviny - 15min - 240°C) - vzorka č. 2

dráha č. 13 - (výpek - 15min - 240°C) - vzorka č. 1

Tabuľka 2 Celková výťažnosť analýz v $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$

línia	línia 1		línia 2		línia 3		línia 4	
Riadok	molová hmotnosť	množstvo	molová hmotnosť	množstvo	molová hmotnosť	množstvo	molová hmotnosť	množstvo
r1								
r2			5769	897.36				
r3	5000	20						
r4	2000	23.473						
r5	850	25.287						
r6								
r7								
r8	400	19.193						
r9								
r10								
r11	100	20.238						
výsledok		108.19		897.36		neurčená		
línia	línia 5		línia 6		línia 7		línia 4	
Riadok	množstvo	molová hmotnosť	množstvo	molová hmotnosť	množstvo	molová hmotnosť	množstvo	molová hmotnosť
r1						6667	171.52	
r2								
r3		5103	981.17					
r4								
r5								
r6								
r7								
r8								
r9		531	773.90					
r10		178	171.94					
r11								
výsledok	neurčená		1972		neurčená			171.52

Tabuľka 3 Celková výťažnosť analýz v $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$

línia	línia 8		línia 9		línia 10		línia 11	
Riadok	molová hmotnosť	množstvo	molová hmotnosť	množstvo	molová hmotnosť	množstvo	molová hmotnosť	množstvo
r1								
r2								
r3								
r4								
r5								
r6			751	1309.3				
r7								
r8	438	15334.2						
r9								
r10								
r11								
výsledok		1534.2		1309.3		neurčená		

Tabuľka 3 - pokračovanie Celková výťažnosť analýz v $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$

lína	lína 12		lína 13		lína 14	
	množstvo	molová hmotnosť	množstvo	molová hmotnosť	množstvo	molová hmotnosť
r1			6692			
r2						
r3					5000	14.350
r4					2000	16.626
r5					850	13.552
r6						
r7						
r8					400	9.82
r9		268	155.45			
r10						
r11					100	7.50
výsledok	neurčená		280.06		neurčená	58.961

Zverina je príkladom cieleného podvodného značenia v dôsledku hospodárskeho zisku, ktoré vedie k predaju lacnejšieho mäsa ako mäso drahších a kvalitnejších druhov (Brodmann et al., 2001).

Bolo prijatých mnoho analytických metód pre druhovú identifikáciu mäsa ktoré sú do veľkej miery založené na detekcii buď bielkovín alebo DNA. Avšak, bielkoviny sú denaturované tlakom a tepelným spracovaním, čo sťažuje identifikáciu druhov. DNA má výhodu v tom, že má relatívne stabilné molekuly, a je schopný odolávať tepelnému spracovaniu (Chikuni et al., 1990).

Klein et al., 1998, zistile že počas spracovania dochádza k fragmentácii DNA, pričom obsah DNA (vrátane

nukleotidov) nie je zväčša ovplyvnený. Vznikajú rôzne veľké fragmenty, pričom ich veľkosť je nepriamo úmerná času opracovania potravinovej matrice. Bauer et al., (2004) tvrdia že degradácia DNA je závislá od podmienok, ktoré vznikajú počas výrobného procesu a od potravinovej matrice, ktorej je súčasťou. Degradáciu DNA ovplyvňujú vnútorné faktory ako sú zložky potravín, pH, nukleázy a exogénne faktory napr. spracovanie, uskladnenie potravín. Vzhľadom na veľkú variabilitu týchto faktorov je zrejme, že rozsah degradácie pre konkrétny potravinový produkt nedá predpovedať.

ZÁVER

Z uvedených technologických úprav najvyššie množstvo DNA 1927 ng a teda celková výťažnosť analýzy $192,7 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ bola zaznamenaná u vzorky, ktorú sme upravovali varením po dobu dvoch hodín pri teplote varu, Najnižšie zistené množstvo DNA 89,82 ng a teda celková

výťažnosť analýzy $8,98 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ bola zaznamenaná u vzorky, ktorú sme upravovali dusením po dobu jednej hodiny pri teplote 100–150 °C. V niektorých tepelné upravených vzorkách nebolo možné zistiť množstvo DNA z dôvodu jej rozsiahlej degradácie.

LITERATÚRA

BAUER, T., WELLER, P., HAMMES, W. P., HERTEL, C. 2003. The effect of processing on the DNA degradation in Food. In *European Food Research and Technology*, vol. 217. p. 338-343.

BRODMANN, P. D., NICHOLAS, G., SCHALTENBRAND, P., & ILG, E. C. 2001. Identifying unknown game species: experience with nucleotide sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene and a subsequent basic local alignment search tool search. In *European Food Research and Technology*, vol. 212, 2001, p. 491–496.

HIRD, H., J. CHISHOLM, A. SANCHEZ, M. HERNANDEZ, R. GOODIER, K. SCHNEEDE, C. BOLT, and B. POPPING. 2006. Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation an implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. In *Food Addit Contam.*, vol. 23, 2006, no.7, p. 645- 650.

HOFMANN, K. 1994. What is quality? In *Meat Focus International*, vol. 3, 1994, no. 2, p. 73-82.

HOLME, D., PECK, H. 1998. Analytical biochemistry. 3. vyd. London: Longman., 481p. ISBN 0-582-29438-X.

CHIKUNI, K., OZUTSUMI, K., KOISHIKAWA, T., AND KATO, S. 1990. Species identification of cooked meat by DNA hybridization assay. In *Meat Science*, vol. 27, 1994 p. 119-128.

CHUDÝ, J. et al. 2000. Hodnotenie surovín a potravín živočíšneho pôvodu. Nitra: Vydavateľské a edičné stredisko SPU, 2000. p. 204. ISBN 80-7137-692-2.

KLEIN, J., ALTENBUCHNER, J., MATTES, R. 1998. Nucleic acid and protein elimination during the sugar manufacturing process of conventional and transgenic sugar beets. In *Journal of Biotechnology*, vol. 60, 1998, p. 145- 153.

LOFUS, R. 2005. Traceability of biotech-derived animals: application of DNA technology. In *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, vol. 24, 2005, no.1, p. 231-242.

MEYER, R., U. Candrian, and J. Luthy. 1994. Detection of pork in heated meat products by polymerase chain reaction. *J. AOAC Int.* vol. 77, 1994, no.3, p. 617-622.

SAMBROOK, J., FRITZ, E. F., MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harb. Lab. Press, USA. Vol. 1-3, 1989.

STEVENSON, J. M., SEMAN, D. L., & LITTLEJOHN, R.P. 1992. Seasonal variation in venison quality of mature, farmed red deer stags in New Zealand. In *Journal of Animal Science*, vol. 70, 1992, p. 1389-1396.

TELETSCHEA, F., C. MAUDET, C. HANNI. 2005. Food and forensic molecular identification: update and challenges. In *Trends Biotechnol.* vol. 23, 2005, no. 7, p. 359- 366.

VOLPELLI, L. A., VALUSSO, R., PIASENTIER, E. 2002. Carcass quality in Male fallow deer (*Dama dama*): effects of age and supplementary feeding. In *Meat Science*, vol. 60, 2002, p. 423-427.

ZHANG, C. L., FOWLER, M. R., SCOTT, N. W., LAWSON, G., SLATER, A. 2007. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. In *Food Control*, vol. 18, 2007, p. 1149-1158.

Contact address:

Lubomír Belej, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: lubomirbelej@azet.sk

Miroslava Barnová, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: mbarnova@gmail.com

ŽIDEK, R. , POKORÁDI, J., BANDRY L. 2008. Biodiversity in deer population observed by microsatellite markers. In *Journal of Agrobiolology*, vol. 25, 2008, p. 113-115.

ŽIDEK, R., MARŠÁLKOVÁ, L. GOLIAN, J., POKORÁDI, J., 2009. Potencial of microsatellite markers in traceability of red deer product. In *Hygiena alimentorum XXX* : production of poultry, eggs, fish and game in conditions of common market., 13.-15. May 2009, Štrbské Pleso - Vysoké Tatry. - Košice : Univerzity of veterinary medicine, 2009. - ISBN 978-80-7148-060-0. p. 341-343.

Acknowledgments:

This article was part of the project VEGA 1/0619/10 VEGA 1/1074/11 and KEGA 3/7255/09.

Lenka Maršáľková, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: marsalkova@gamil.com

Jozef Golian, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: jozef.golian.af@uniag.sk