

# Identyfikacja produktów rybnych z mintaja techniką PCR-RFLP\*)

WOJCIECH SAWICKI, WALDEMAR DĄBROWSKI, ELŻBIETA BOGUSŁAWSKA-WĄS,  
ELŻBIETA DACZKOWSKA-KOZON, BARBARA KWIATKOWSKA, AGNIESZKA SZYNKOWSKA

Katedra Mikrobiologii Żywności Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa, ul. Papieża Pawła VI 3, 71-459 Szczecin

Sawicki W., Dąbrowski W., Bogusławska-Wąs E., Daczkowska-Kozon E., Kwiatkowska B., Szynkowska A.

## Identifying Alaskan pollock fish products by PCR-RFLP technique

### Summary

Due to trade globalization of both fresh and processed sea food the necessity has arisen to determine its affinity to certain species. This is related to legislation (i.e. duty), the necessity to monitor the origin and transportation of food products (traceability), and health aspects (alimentary allergies). Moreover, it is vital to control and prevent food adulteration, i.e. the substitution of more expensive species with cheaper, sometimes less valuable ones. The visual assessment used so far is reliable only in the case of whole, unprocessed fish.

The aim of this study has been to demonstrate the usefulness of polymerase chain reaction linked with restriction analysis (PCR-RFLP) in confirming the presence of Alaskan pollock (*Theragra halcogramma*). Contrary to the declaration given by the producer/manufacturer, among the 68 examined products 8 products were not produced from Alaskan pollock. The technique described in this work is faster and more reliable than the techniques used to date. The method proposed might be very useful for the routine control of fish identification.

**Keywords:** Alaskan pollock, species identifications, PCR-RFLP, seafood

Przetwórstwo ryb należy do jednego z szybciej rozwijających się sektorów przemysłu spożywczego. W latach dziewięćdziesiątych XX w. spożycie przetworów rybnych wzrosło trzykrotnie. Rosnąca świadomość konsumentów dotycząca zdrowego żywienia sprawiła, że ryby jako źródło pełnowartościowego białka, witamin, makro- i mikroelementów, a przede wszystkim wielonienasyconych kwasów tłuszczowych n-3 stały się poszukiwanym towarem (8, 11). Powiązane jest to również z prewencją chorób związanych z żywnością (choroby układu krążenia, nowotwory, alergie i nietolerancje pokarmowe). Ze względu na walory dietetyczne ryby wykorzystywane są także w dietach specjalnego przeznaczenia (9, 15).

Ponad 85% ryb bezpośrednio po złowieniu poddawanych jest wstępnej obróbce technologicznej, tj. odgławianiu, odkórzaniu, filetowaniu oraz szeregu innym procesom technologicznym, co znacznie utrudnia, a nierzadko uniemożliwia, ustalenie przynależności gatunkowej.

Producent/importer ma obowiązek podać, a konsument ma prawo znać faktyczny skład produktu. Dzięki temu może dokonać świadomego wyboru. Przypadki

falszowania żywności pochodzenia wodnego, w tym zwłaszcza substytucja droższych gatunków ryb tańszymi, niejednokrotnie o niższej jakości sprawiły, że w dobrze pojętym interesie klienta, ważne jest, by miał on pewność, że nabywany towar ma deklarowany przez producenta skład. Wymaga to stosowania nowoczesnych technik w potwierdzaniu autentyczności składników żywności, w tym pochodzenia wodnego (3, 15, 16).

Szacunkowe spożycie ryb w Polsce w 2007 r. przekroczyło 13 kg na osobę i było o 8% wyższe niż rok wcześniej (7). Jedną z najpopularniejszych ryb dalekomorskich importowanych do Polski jest mintaj. Ten cenny, wykorzystywany gospodarczo gatunek poławiany jest w północnym Pacyfiku oraz przyległych morzach – Japońskim, Ochockim i Beringa (2, 6). W 2007 r. sprowadzono do Polski ponad 34 tys. ton tej ryby, o 5,3% więcej niż w 2006 r. (7). Oprócz tuszek najczęściej sprowadzanymi produktami z mintaja są: filety, kostka, paluszki oraz dania gotowe.

Celem badań było określenie możliwości zastosowania analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych produktu PCR w identyfikacji przynależności gatunkowej ryb i przetworów rybnych z mintaja.

\*) Badania finansowane w ramach projektu badawczego MNiSzW nr N312 061 31/3515.

## Material i metody

Badania przeprowadzono na wyrobach z mintaja. Mrożone produkty, po zakupie przechowywano do czasu analizy w temp.  $-32^{\circ}\text{C}$ . Izolację DNA przeprowadzono przy użyciu zestawu Genomic Mini AX Food extraction kit (A&A Biotechnology, Polska). Do 0,1-0,2 g tkanki rybiej dodawano 1,5 mL zawiesiny lizującej oraz 20  $\mu\text{L}$  proteazy. Całość mieszano, a następnie inkubowano w  $53^{\circ}\text{C}$  przez 80 min. Po inkubacji próbkę intensywnie wortexowano (BioVortex V 1, Biosan) przez 15 s i wirowano przez 5 min. przy 13 000 obr./min. Supernatant przenoszono na kolumnę ze złożem jonowymiennym. Przy użyciu roztworu elucyjnego wypłukiwano ze złoża DNA do nowej próbki i dodawano 0,8 mL izopropanolu. Całość wirowano przez 10 min. przy 12 000 obr./min. Następnie usuwano izopropanol, a osad zawierający DNA przepłukiwano 70% etanolem. Po wymieszaniu i odwirowaniu (3 min., 12 000 obr./min.) usuwano etanol, suszono osad (1 h w temp. pokojowej). Osad DNA rozpuszczono w buforze TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0).

Wyzolowane DNA przechowywano w temperaturze  $-4^{\circ}\text{C}$  (kilka dni), a następnie w temperaturze  $-32^{\circ}\text{C}$ . W celu identyfikacji gatunkowej użyto starterów podanych w tab. 1. Startery zostały zaprojektowane na podstawie sekwencji w mtDNA (GenBank Accession No. AB094061, AB078152, X99772) i zaproponowane przez Aranishi i wsp. (1).

25  $\mu\text{L}$  mieszanina reakcyjna zawierała: 250 ng DNA, 1,5 U polimerazy Taq (A&A Biotechnology, Polska), 2,5 U buforu polimerazy Taq (100 mM KCl, 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 200 mM TrisHCl pH 8,5, 20 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1% triton X-100), 5 mM  $\text{MgCl}_2$  (Qiagen, Niemcy), 2 mM dNTP (Fermentas, Litwa) i startery TR-14F – 20 pM, TR-571R – 20 pM. Amplifikacje prowadzono w termocyklerze Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Niemcy) w następującym reżimie czasowo-temperaturowym: wstępna denaturacja  $94^{\circ}\text{C}/2$  min., a następnie 30 cykli, na które składały się: denaturacja  $94^{\circ}\text{C}/10$  s, przyłączanie starterów  $58^{\circ}\text{C}/10$  s i powielanie  $72^{\circ}\text{C}/30$  s. Amplifikacja kończyła się wydłużaniem –  $72^{\circ}\text{C}/5$  min.

Kolejnym etapem była restrykcja otrzymanego produktu dwoma enzymami: Eco32I i Eco105I (Fermentas, Litwa). Reakcje prowadzono w objętości 16  $\mu\text{L}$ , zawierającej 10  $\mu\text{L}$  buforu  $\text{G}^+$  (Fermentas, Litwa), 5  $\mu\text{L}$  produktu reakcji PCR i po 5 U każdego z enzymów restrykcyjnych. Czas restrykcji ustalono na 60 min. w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ .

Uzyskane amplikony rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym (Prona Agarose Plus, Belgia), barwionym bromkiem etydyny (Bio-Rad, USA) (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Ostatnim etapem była wizualizacja żelu w świetle UV (Gel-Doc 2000 Bio-Rad, USA) i archiwizacja otrzymanych elektroforogramów.

Tab. 1. Użyte startery, specyficzne dla ryb dorszowatych

Starter	Sekwencja nukleotydów 5' - 3'	Rozmiar produktu	Amplifikowany region
TR-14F	GGAAAACCCATCCAATCCTA	558 b.p.	cytb <i>mtDNA</i>
TR-571R	CAGCAACAACAAGGGGAAT		

## Wyniki i omówienie

Przedmiotem analizy było 8 asortymentów produktów rybnych, z czego 7 pochodziło z mintaja. Przebadane próbki były w różnym stadium przetworzenia technologicznego (tab. 2). Łącznie analizie poddano 68 produktów, dostępnych w sprzedaży detalicznej sklepów na terenie woj. zachodniopomorskiego, w których składzie, zgodnie z deklaracją producenta/importera, podany był jako surowiec mintaj. Nie we wszystkich analizowanych przypadkach obserwowano produkty amplifikacji o wielkości 558 p.z. dla specyficznej sekwencji (ryc. 1). W 60 przypadkach uzyskany wynik potwierdził deklarację producenta/importera. Po trawieniu enzymami Eco32I i Eco105I produktu PCR specyficznego dla ryb dorszowatych, we wszystkich przypadkach profile restrykcyjne wskazywały na mintaja (ryc. 2). Profil restrykcyjny składał się z czterech produktów o wielkości 106 p.z., 161 p.z., 292 p.z., 452 p.z.

Natomiast w 8 przypadkach nie uzyskano produktu PCR wskazującego na pochodzenie (wbrew deklaracji) z ryb dorszowatych, w tym z mintaja.

Wszystkie przebadane próbki tuszek rybnych pochodziły z mintaja. Na 32 przebadane próby filetów oznakowanych jako filety z mintaja w 6 przypadkach nie potwierdzono tego faktu w reakcji PCR. Na 11 przebadanych próbek oznaczonych jako kostka z mintaja w dwóch przypadkach nie udało się uzyskać potwierdzenia. Wszystkie przebadane próbki produktów panierowanych (hamburgery i paluszki rybne) oraz dań gotowych wskazywały na poprawną deklarację producenta na opakowaniu.

Do identyfikacji gatunkowej jako źródło informacji wykorzystano mitochondrialne DNA. Skorzystano ze starterów amplifikujących charakterystyczny dla rodziny dorszowatych fragment mtDNA, którego sekwencje podali Aranishi i wsp. (1). Fragmenty genów mitochondrialnych ze względu na swoją konserwatywność są często stosowane w identyfikacji surowców żywnościowych tego typu (10, 12-16). Tak opracowaną proce-

Tab. 2. Badane produkty rybne

Nr próbki	Nazwa produktu	Sposób obróbki	Deklarowany skład
Kontrola dodatnia	tusza z mintaja	mrożona	mintaj
1-6	tusze z mintaja	odgłowione, mrożone	mintaj
7-29	filety z mintaja	mrożone, odskórzzone	mintaj
30-38	filety z ryb morskich	mrożone, odskórzzone	mintaj
39-50	kostka z mintaja	mrożone, odskórzzone, pozbawione ości, cięte w kostkę filety	mintaj
51-57	paluszki rybne	panierowane, mrożone	mintaj
58-63	hamburgery rybne	panierowane, mrożone	mintaj
64-68	dania gotowe	gotowe do spożycia po obróbce termicznej	mintaj
Kontrola ujemna	tusza z morszczuka	mrożona	morszczuk

durę identyfikacji mintaja przetestowano na 68 próbach w różnym stopniu przetworzenia. Uzyskane produkty amplifikacji wskazują na wysoką przydatność tej metodyki do rutynowej kontroli importowanego mintaja i produktów z niego.

Według Comi i wsp. (5), pomimo znacznego zróżnicowania i bliskiego pokrewieństwa wielu gatunków ryb analiza restrykcyjna produktów PCR (PCR-RFLP) jest bardzo dobrą metodą identyfikacji gatunkowej ryb. Wyniki ich badań potwierdzają możliwość rozróżnienia 8 komercyjnie wykorzystywanych gatunków ryb dorszowatych techniką PCR-RFLP. Badania nad

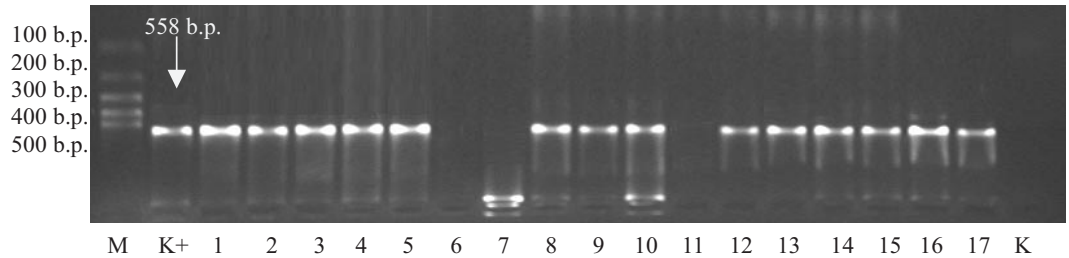
możliwością zastosowania techniki PCR w identyfikacji ryb i produktów rybnych prowadzone przez Calo-Mata i wsp. (4) z użyciem techniki PCR-RFLP pozwoliły również na identyfikację 15 gatunków ryb dorszowatych. Korzystając z pary starterów autorzy ci zamplikowali charakterystyczny dla tej rodziny fragment DNA (gen kodujący cyt b w mtDNA) o wielkości 464 p.z. Następnie przy użyciu trzech enzymów restrykcyjnych (NdeI, HincII i NlaIII) zidentyfikowali wszystkie badane gatunki ryb z rodziny *Gadidae*. Ci sami autorzy opracowaną przez siebie metodę z powodzeniem zastosowali w identyfikacji dostępnych na rynku produktów z dorsza (dorsz solony).

### Podsumowanie

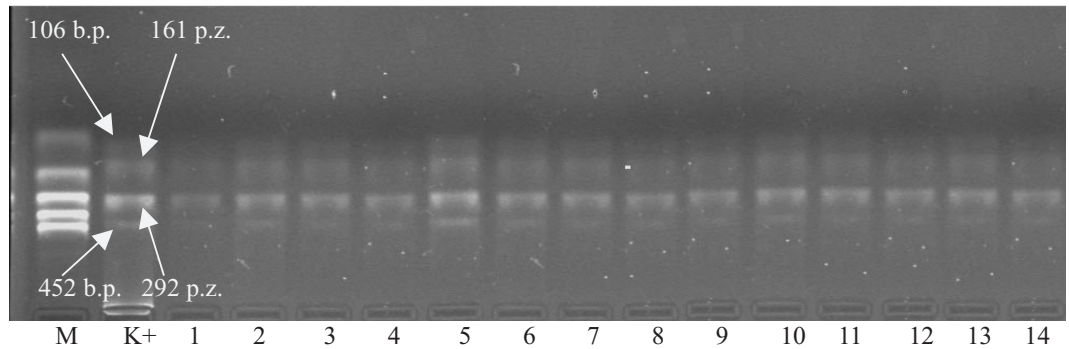
Techniki biologii molekularnej odgrywają coraz większą rolę w identyfikacji ryb i przetworzonych produktów rybnych, stanowiąc doskonałą alternatywę dla metod tradycyjnych. Technika PCR-RFLP pozwala na identyfikację zarówno ryb, jak i produktów rybnych z gatunków blisko ze sobą spokrewnionych. Ponadto nie zaobserwowano wpływu obróbki technologicznej na proces identyfikacji.

### Piśmiennictwo

1. *Aranishi F., Okimoto T., Izumi S.*: Identification of gadoid species (Pisces, Gadidae) by PCR-RFLP analysis. *J. Appl. Genet.* 2005, 46, 69-73.
2. *Bailey K. M., Quinn T. J., Bentzen P., Grant W. S.*: Population structure and dynamics of walleye pollock, *Theragra chalcogramma*. *Adv. Mar. Biol.* 1999, 37, 179-255.
3. *Bossier P.*: Authentication of seafood products by DNA patterns. *J. Food Sci.* 1999, 64, 189-193.
4. *Calo-Mata P., Sotelo C. G., Pérez-Martin R. I., Rehbein H., Hold G. L., Russell V. J., Pryde S., Quinteiro J., Rey-Méndez M., Rosa C., Santos A. T.*:



**Ryc. 1.** 2% żel agarozowy barwiony bromkiem etydyny przedstawiający wynik identyfikacji w reakcji PCR badanych produktów z mintaja: M – marker wielkości masowej, K+ – kontrola dodatnia (mintaj), K– – kontrola ujemna (morszczuk). 1-17 produkty z mintaja: 1 – M2, 2 – M5, 3 – M7, 4 – M8, 5 – M9, 6 – M15, 7 – M18, 8 – M20, 9 – M31, 10 – M34, 11 – M35, 12 – M39, 13 – M41, 14 – M48, 15 – M50, 16 – M58, 17 – M61



**Ryc. 2.** 2% żel agarozowy barwiony bromkiem etydyny przedstawiający wynik restrykcji produktów PCR: M – marker wielkości masowej, K+ – kontrola dodatnia (mintaj), 1-14 produkty z mintaja: 1 – M2, 2 – M5, 3 – M7, 4 – M8, 5 – M9, 6 – M20, 7 – M31, 8 – M34, 9 – M39, 10 – M41, 11 – M48, 12 – M50, 13 – M58, 14 – M61

Identification of gadoid fish species using DNA-based techniques. *Eur. Food Res. Technol.* 2003, 217, 259-264.

5. *Comi G., Iacumin L., Rantsiou K., Cantoni C., Coccolin L.*: Molecular methods for the differentiation of species used in production of cod-fish can detect commercial frauds *Food Control* 2005, 16, 37-42.
6. *Grant W. S., Spies I. B., Canino M. F.*: Biogeographic evidence for selection on mitochondrial DNA in North Pacific Walleye Pollock *Theragra chalcogramma*. *J. Heredity* 2006, 97, 571-580.
7. *Hryszko K.*: Najważniejsze tendencje w imporcie ryb i owoców morza. *Mag. Przem. Ryb.* 2008, 64, 13-16.
8. *Kolakowska A., Kolakowski E.*: Wartość żywieniowa ryb. XXXI Sesja Nauk. Komitetu Technol. Chemii Żywności PAN: Żywność w dobie ekspansji naukowej: potencjał, oczekiwania, perspektywy. Poznań 14-15.09.2000, s. 57-65.
9. *Lapińska K., Kwiatkowska B., Dąbrowski W.*: Influence of various ways of heating on the thermostability of oxytetracycline in muscles of rainbow trout. *Medycyna Wet.* 2008, 64, 249-376.
10. *Mackie I. M., Pryde S. E., Gonzales-Sotelo C., Medina I., Perin R., Quinteiro J., Rey-Mendez M., Rehbein H.*: Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends Food Sci. Techn.* 1999, 10, 9-14.
11. *Meyer R., Candrian U.*: PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. *Lebens. Wissen. Tech.* 1996, 9, 1-9.
12. *Pancorbo M. M. de, Castro A., Fernández-Fernández I., Cuevas N.*: Cytochrome b for identification of animal species in processed food. 19<sup>th</sup> Internat. Congress on Forensic Genetics in Münster, Germany 2001, s. 137.
13. *Quinteiro J., Vidal R., Izquierdo M., Sotelo C. G., Chapela J. M., Pérez-Martin R., Rehbein H., Hold L. G., Russell V. J., Pryde S. E., Rosa C., Santos A. T., Rey-Méndez M.*: Identification of hake species (*Merluccius* genus) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 5108-5114.
14. *Quinteiro J., Vidal R., Rey-Méndez M.*: Phylogeny and biogeographic history of hake (genus *Merluccius*) inferred from mitochondrial DNA control-region sequences. *Mar. Biol.* 2000, 136, 163-174.
15. *Sawicki W.*: Wykrywanie niewłaściwych surowców w produktach spożywczych przy zastosowaniu techniki łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Praca dokt., Wyd. Nauk o Żywności i Rybactwa AR, Szczecin 2006.
16. *Sawicki W., Bednarczyk A., Bogusławska-Wąs E., Daczowska-Kozon E., Dąbrowski W.*: Detection of food adulteration in meat products using PCR techniques. *Anim. Sci.* 2006, 1 (suppl.), 26-27.

**Adres autora: dr inż. Wojciech Sawicki, ul. Papieża Pawła VI 3, 71-459 Szczecin; e-mail: wojciech.sawicki@tz.ar.szczecin.pl**