

# Lajinmäärittämisestä elintarvikkeiden aitoustudkimuksessa

**Annikki Welling**  
**Kemian laboratoriopalvelut**  
**Evira**

# Sisältö

- Elintarvikepetokset
- Menetelmiä elintarvikepetosten tunnistamiseksi
- DNA menetelmät
- DNA viivakoodaus
- Komission koordinoima valvontasuunnitelma kalalajien oikeellisuudesta

# Elintarvikepetokset

- EU:ssa ei ole yleisesti hyväksyttyä elintarvikepetosten määritelmää. Yleinen ohjeistus löytyy elintarvikelainsäädäntöä koskevista yleisistä periaatteista ja vaatimuksista annetusta asetuksesta (EY) N:o 178/2002, jossa säädetään, että merkinnät, mainonta, esillepano ja pakkaukset ”eivät saa johtaa kuluttajaa harhaan”.
- Yleensä petoksilla haetaan rahallista etua, mutta ne voivat johtaa myös elintarviketurvallisuuden vaarantumiseen

# Esimerkkejä elintarvikepetoksista

- Laimentaminen
  - Mehujen laimentaminen toisilla mehuilla tai vedellä
  - Muiden öljyjen lisääminen extra-neitsyt oliiviöljyyn
- Korvaaminen
  - Kalalajin korvaaminen toisella
  - Tavallisen riisin sekoittaminen Basmati-riisin sekaan
- Keinotekoinen ominaisuuksien lisääminen
  - Sudan -värin lisääminen chiliin
  - Melamiinin lisääminen maitoon proteiinipitoisuuden nostamiseksi
- Tuotantotavan väärin merkitseminen
  - Luomutuotanto, vapaan kanan munat, päiväyksien muuttaminen

# Menetelmiä elintarvikepetosten tunnistamiseksi

- Menetelmän valinta riippuu elintarvikepetoksen luonteesta ja siitä mitä etukäteistietoa elintarvikkeesta ja siihen kohdistuvasta petoksesta on
  - Tarvitaanko tietoa onko kyse naudanlihasta vai porsaasta vai siitä, onko naudanliha peräisin Argentiinasta vai Suomesta tai siitä onko kyse fileestä vai paistista
  - Riisi vs. muut viljat vai basmati-riisi vs. muut riisit?
- Menetelmät saattavat olla hyvin spesifisiä, tiedetään etukäteen miten elintarviketta yritetään väärentää
  - Vesipuhvelin maidon erottaminen muista maidoista, joilla sitä voidaan laimentaa
- Koko ajan yritetään kehittää laaja-alaisempia menetelmiä, joissa ei tarvittaisi paljon tietoa elintarvikkeesta etukäteen, eikä petoksesta
  - omiikka-profiilit
- Kvantitointi
  - Lainsäädännön vaatimukset

# Erilaisia ”omiikoita”

- Elintarvikepetokset ovat yhä monimutkaisempia ja kekseliäämpiä. Jotta petokset voitaisiin havaita, elintarvikkeille laaditaan profiileita. Kun profiilissa havaitaan poikkeus, kyse voi olla elintarvikepetoksesta
  - Massa spektrometri-profiilit
  - Metabolomiikka
  - Lihan rasvapitoisuus
  - Sokeriprofiili
  - Rasvahappoprofiili
  - Pysyvien isotooppien analyysi: maantieteellinen alkuperä

# Menetelmiä elintarvikepetosten tunnistamiseksi

Vanhentunut, syömäkelpoista?

rasvahappoprofiili

Lisätty vettä?

Proteiinin ja veden suhde  
näytteessä

Mitä lajia?

GC-MS, lajispesifinen PCR,  
DNA-viivakoodaus

Maantieteellinen alkuperä?

Pysyvien isotooppien analyysi

Luomutuotantoa?

Esim. torjunta-aine analyysi GC-MS:llä

# Menetelmiä elintarvikepetosten tunnistamiseksi

Extra-neitsyt oliiviöljy,  
mehu, maito → laimennettu?

GC-MS profiili, kryoskopia

Buffalo mozzarella, onko siihen  
lisätty muiden eläinten maitoa?

lajispesifinen DNA  
menetelmä

Melamiinia lisätty nostamaan  
proteiinipitoisuutta?

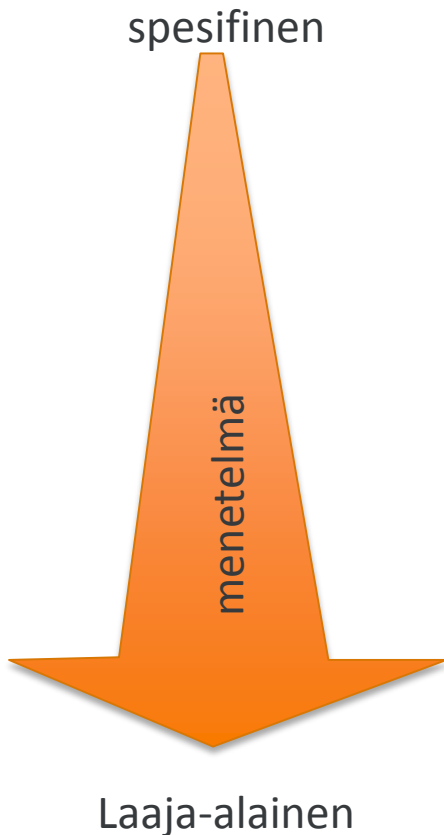
GC-MS menetelmä  
melamiinin tunnistamiseksi



# Miksi DNA menetelmiä käytetään aitoustutkimuksissa?

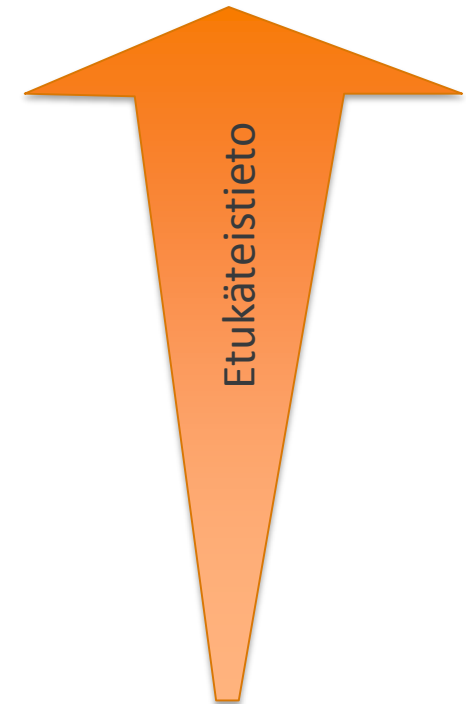
- DNA molekyylit ovat melko kestäviä → voidaan tutkia raakaa, keitettyä tai prosessoitua elintarviketta
- Kohde -DNA:ta on paljon: kaikissa soluissa → kaikissa kudoksissa/solukoissa
- Genomitieto eri eliöistä lisääntyy koko ajan ja useimmiten se on vapaasti saatavilla → helpottaa uusien menetelmien kehittämistä
- Menetelmät ovat tulleet edullisemmaksi, ihmisen koko genomin sekvensointi maksoi v. 2000 100 miljoonaa dollaria, nyt saman kokoisen genomin saa sekvensoitua ~5000 dollarilla.

# DNA –menetelmien spesifisyys



- Proteiinin epitoopin tunnistaminen (allergeenitutkimukset)
- Lajispesifinen tunnistaminen
- Tietyn eläinryhmän tunnistaminen (märehäjä-DNA)
- DNA viivakoodaus (mikä tahansa yksittäinen laji)
- DNA metaviivakoodaus (kaikki monimutkaisessa näytteessä olevat lajit)
- WGS sekvensointi

Paljon tietoa etukäteen



Ei tietoa etukäteen

# Menetelmän valinta riippuu vaatimuksista

- Jos on tarve tietää sisältääkö elintarvike tiettyä eläin- tai kasvilajia
  - Menetelmä on suunniteltu tiettyä tarkoitusta varten
  - Lajispesifinen menetelmä
- Jos tietoa elintarvikkeen sisältämistä aineista ei ole etukäteen
  - Yleinen menetelmä, DNA-viivakoodaus
- Jos kaikki elintarvikkeen sisältämät lajit täytyy tietää
  - DNA metaviivakoodaus, WGS sekvensointi
- Kuinka paljon kutakin lajia näytteessä on
  - Reaaliaikainen PCR (suhteellinen määrittäminen)
  - Digitaalinen PCR (absoluuttinen määrittäminen)

# Milloin DNA ei sovellu aitoustutkimuksiin?

- Kun DNA:ta ei ole tai se on hajonnut
  - Elintarvike voi olla niin pitkälle prosessoitua, että DNA on hajonnut – purkkitonnikala, Corn Flakes
  - Elintarvikkeeksi käytetään sellaista osaa kasvista, joissa ei ole DNA:ta: puhtaat öljyt, tärkkelys (kyse on solun osasta)
- Kyse on kasvatustavasta, esim. luomu, vapaan kanan munat
  - Poikkeus kassilohet, koska kasvatuksessa käytetään sellaista lohilajia, joka ei kasva villinä
- Jos lajia ei ole kuvattu tieteellisesti, siitä ei ole olemassa minkäänlaista DNA sekvenssitietoa, sitä ei voida tunnistaa

# DNA viivakoodaus

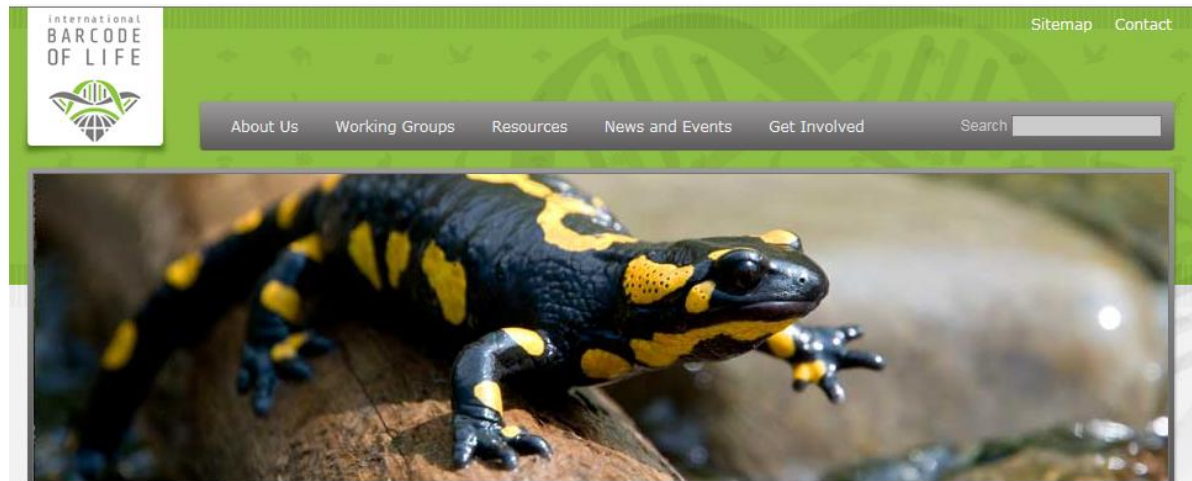
- 2003 Paul Herbert Guelphin yliopistosta, Kanadasta ehdotti uutta tapaa lajien tunnistamiseksi ja löytämiseksi
- Jokaisesta maapallon eliölajin genomista sekvensoitaisiin sama tietty alue, sekvenssit koottaisiin geenidatapankkiin ja voitaisiin käyttää lajintunnistukseen.
- Genomialueen tulisi olla sellainen, että lajin *sisällä* siinä olisi mahdollisimman vähän vaihtelua, mutta lajien *välillä* vaihtelu olisi suurta.

# DNA viivakoodaus

- Suurin osa eläinlajeista voidaan erottaa toisistaan sekvensoimalla 648 emäsparin pituinen alue mitokondriossa sijaitsevasta *sytokromi-c-oksidaasi-1 -geenistä (COI1)*.
- Kasveilla käytetään kahden viherhiukkasessa sijaitsevan geenin kombinaatiota, *matK* ja *rbcl*
- Sienillä viivakoodausalueena käytetään genomissa sijaitsevaa geenien välistä aluetta *ITS*

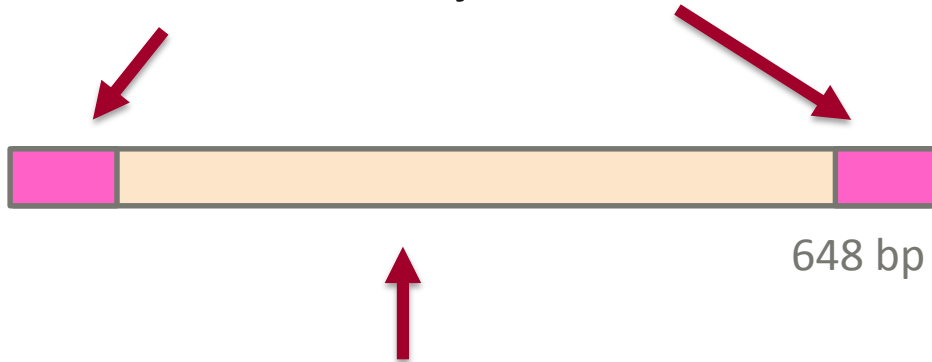
# Geenidatapankkeja

- International barcode for life
  - Tarkoituksena kerätä referenssikirjasto kaikista eliöistä
  - <http://ibol.org/>
- National Center for Biotechnology Information NCBI
  - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>



# Viivakoodialue

Degeneratiiviset alukkeet, sitoutuvat viivakoodialueen alku- ja loppupäähän. Mahdollisimman vähän vaihtelua lajien välillä



Genomialueen tulla olla sellainen että siinä on lajin sisällä mahdollisimman vähän vaihtelua, lajien välillä vaihtelu suurta.

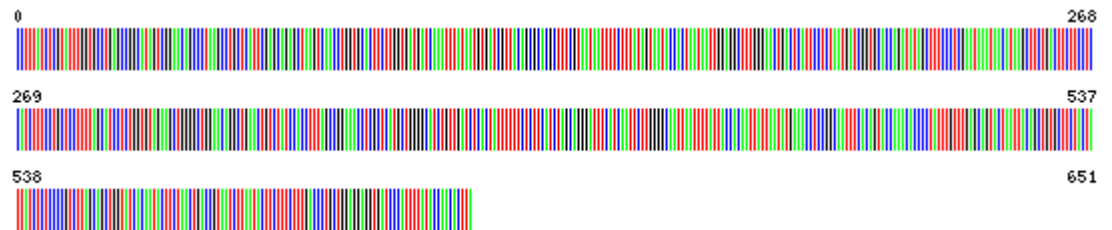


# DNA viivakoodi paljastaa lajin

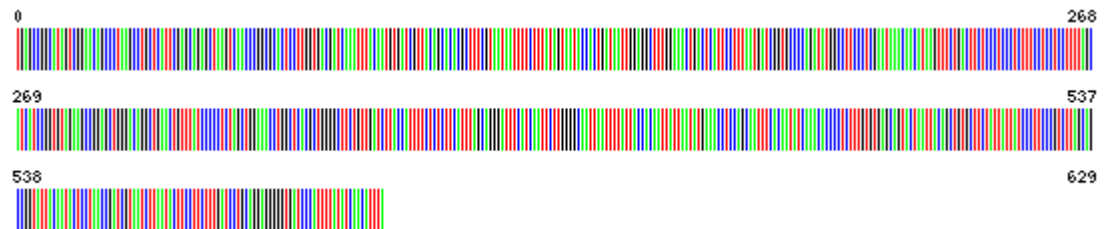


Turskaa vai seitiä?

*Gadus morhua*, turska



*Pollachius virens*, seiti



C, T, A, G

# Matriiseista



Laji voidaan määrittää mädistä, tai suomusta tai muusta eläimen osasta.



DNA viivakoodaus onnistuu myös prosessoiduista elintarvikkeista, mutta vain yksittäisestä lajista kerrallaan.



# Komission koordinoimat valvontasuunnitelmat

- Merkitsemätön hevosenliha 2013-2014
  - Hevosenlihan tunnistaminen DNA menetelmällä lihasta
  - Fenyylibutatsonin jäämät (lääkityt hevoset, jotka teurastettu ennen varoajan umpeutumista)
- Hunajan oikeellisuus 2015-2016
  - Sokerin lisääminen hunajaan
  - Lajihunajan merkitseminen väärin (kasvilaji)
  - Maantieteellinen alkuperä
- Markkinoilla olevien kalalajien oikeellisuus 2015
  - Valkolihaiset kalalajit
  - DNA viinakoodaus

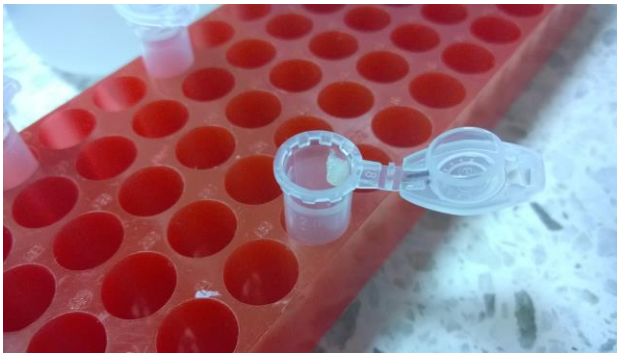
# Näytteen esikäsittely



Näyte täytyy käsitellä niin, että se sisältää vain yhtä tutkittavaa lajia.

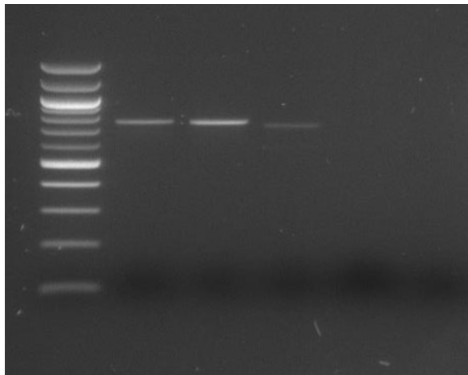


# DNA:n eristäminen, monistaminen ja tarkistaminen



DNA eristetään näytteestä kitin avulla, 25 mg näytettä riittää

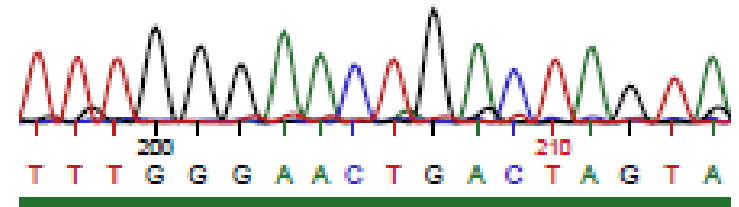
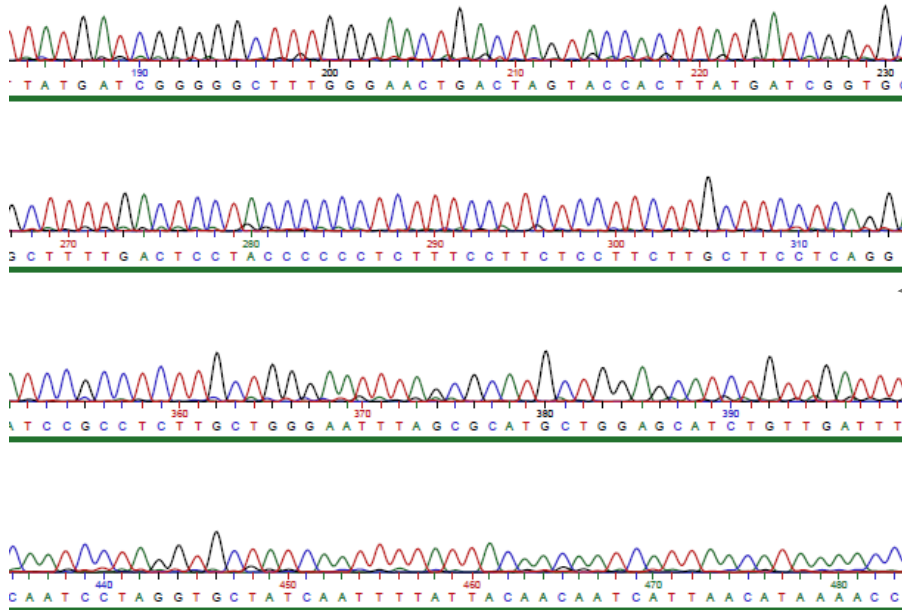
std n1 n2 k1 - -



DNA monistetaan PCR:n avulla ja tarkistetaan agarosigeelielektroforeesilla: tuotetta on ja se on oikean kokoinen

# Sekvensointi

- Tuotteen sekvensointi Sanger sekvensoinnin avulla (pystytään sekvensoimaan n. 1000 bp pituinen DNA jakso). Sekvensoidaan yleensä ainakin kahteen kertaan, molemmista suunnista



...TTTGGGAAGTGAAGTAGTA...





# Tuloksia

- 83 kalanäytettä
- Yhtä näytettä lukuun ottamatta (purkkiahven) kaikista saatiin eristettyä DNA:ta
- Suurin osa näytteistä pystyttiin tunnistamaan lajitasolle, muutama vain sukutasolle (viivakoodialue ei tarpeeksi spesifinen)
- 1 näytteen kalalaji ei vastannut pakkauksessa ilmoitettua



# DNA viivakoodaus

- Milloin se on vaikeaa tai ei onnistu:
    - DNA:ta ei ole saatavilla tai se on hajonnut
    - Eliölajista ei ole olemassa sekvenssitietoa
    - Kun useaa eri lajia on sekoittunut toisiinsa, esim. makaronilaatikko: nauta-sika jauhelihaa, kananmunaa, maitoa, sipulia, mausteita...
- DNA -metaviivakoodaus