بررسی تطابق مواد اولیه اصلی درج شده در برچسب همبرگرهای ممتاز شهر تهران توسط آنالیز مولکولی

معصومه هاشم زادگان[1]، فرزانه تفویضی[2]*، سید ابراهیم حسینی[3]، منصور بیات[4]

[1] گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[2] استادیار گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[3] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران، ایران
[4] دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه قارچ شناسی، تهران، ایران

تاریخ دریافت:1392/4/23 تاریخ پذیرش: 1392/11/11

چکیده

مصرف فرآورده های گوشتی ازجمله همبرگر در شهرهای بزرگ از جمله تهران رو به افزایش است. از سویی با توجه به قیمت بالای گوشت قرمز به عنوان ماده اولیه اصلی تشکیل دهنده همبرگرهای ممتاز و شناسایی دشوار تقلب در گوشت های چرخ شده به علت تغییر خواص ارگانولپتیک گوشت مانند بافت، رنگ، ظاهر، عطر و طعم در حین فرآوری، امکان جایگزینی این پروتئین حیوانی با پروتئین گیاهی و ارزان قیمت سویا بدون درج نام سویا بر روی برچسب بسته بندی همبرگر و به صورت تقلب وجود دارد لذا هدف از این تحقیق، بررسی تطابق مواد اولیه اصلی درج شده در برچسب و مواد بکار برده شده در تولید همبرگرهای ممتاز شامل گوشت گاو و بکارگیری پروتئین سویا به عنوان تقلب تجاری در همبرگرهای ممتاز عرضه شده در شهر تهران بر اساس روش حساس و سریع واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) می باشد. از 10 نوع همبرگر ممتاز با نام های تجاری معتبر، با ذکر برچسب تولید شده از گوشت گاو در سطح استان تهران نمونه برداری شد و پس از استخراج DNA از گوشت خام گاو و پروتئین گیاهی سویا به عنوان نمونه های شاهد و نمونه های همبرگر ممتاز، PCR اختصاصی با پرایمرهای اختصاصی ژن لکتین سویا و ژن سیتوکروم b میتوکندریایی گاو بر روی DNA های استخراج شده صورت گرفت. قطعات 118bp حاصل تکثیر ژن لکتین سویا و 274 bp حاصل از تکثیر ژن سیتوکروم b میتوکندریایی گاو موید وجود پروتئین سویا بر خلاف برچسب تایید شده به همراه گوشت گاو در تمامی نمونه های همبرگر ممتاز می باشند.

واژه های کلیدی: همبرگر ممتاز، سویا، PCR اختصاصی، ژن لکتین، ژن سیتوکروم b میتوکندریایی

* مسوول مکاتبات: farzanehtafvizi54@gmail.com

1- مقدمه

همبرگر یکی از پرمصرف ترین فرآورده های گوشتی است. همبرگر متشکل از گوشت قرمز چرخ کرده دام های حلال گوشت به ویژه گاو و گوساله که به آن سایر مواد متشکله شامل پروتئین گیاهی (سویا و گلوتن)، روغن، ادویه جات، مواد پرکننده و اتصال دهنده، نمک و سبزیجات معطر اضافه شده است. بر اساس پروانه های ساخت صادره از سوی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی در تولید همبرگرهای صنعتی، فقط استفاده از گوشت گاو مجاز شناخته شده است (2).

بر اساس ویژگی های مندرج در استاندارد ملی ایران به شماره 2304، همبرگرهای صنعتی تولید شده در کشور به سه گروه طبقه بندی می شوند که دسته اول را همبرگر معمولی و دسته دوم و سوم را همبرگرهای ممتاز می نامند. همبرگرهای معمولی دارای حداقل 30٪ گوشت قرمز به همراه مقادیر مشخص پروتئین گیاهی و سایر مواد متشکله مجاز می باشند. یک گروه از همبرگرهای ممتاز دارای 74-60٪ گوشت، فاقد پروتئین سویا و همراه با سایر ترکیبات مجاز می باشند. گروه دیگری از همبرگر ممتاز شامل 95-75٪ گوشت، فاقد پروتئین سویا و دارای سایر ترکیبات مجاز می باشند بنابراین استفاده از سویا در همبرگرهای دسته دوم و سوم غیر مجاز می باشد (3).

یکی از نگرانی های موجود در تولید فرآورده های گوشتی از جمله همبرگر، افزودن پروتئین های غیر حیوانی به طور پنهانی و تقلبی به چنین محصولاتی است که می تواند دلایل مختلفی داشته باشد که از آن جمله می توان به موارد ذیل اشاره نمود: جایگزینی پروتئین ارزان قیمت مثل سویا به جای پروتئین حیوانی گران قیمت، عدم قابلیت شناسی پروتئین گیاهی در فرآورده های گوشتی چرخ شده به علت تغییرات ارگانولپتیک، افزایش میزان پروتئین کلی، تولید محصولات با خواص ارگانولپتیک بهتر، کاهش ترشح آب از محصولات استریلیزه و کمک به امولسیفیکاسیون چربی در گوشت های خرد شده، افزودن پروتئین غیرحیوانی به منظور رفع معایب گوشت حیوانات پیر (سفتی، کاهش آب موجود در بافت، افزایش کلاژن و پیوندهای عرضی) و ایجاد آثار مفید پروتئین های غیر حیوانی چون سویا بر سلامت انسان مثل کاهش بیماری قلبی ـ عروقی بواسطه کاهش کلسترول بد(19، 21).

با توجه به افزایش مصرف پروتئین سویا در فرآورده های گوشتی چرخ شده مانند همبرگرها و از سویی ذکر نام سویا به عنوان یکی از 12 ماده حساسیت زا اعلام شده از جانب قوانین کمیسیون غذایی (Codex Alimentarius Commission) ، سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization) ، سازمان غذا و کشاورزی (Food and Agricultural Organization) و کمیسیون اروپا (European Commission) و نیز ضرورت درج نام سویا بر روی برچسب فرآورده های غذایی حاوی سویا، هم چنین الزام آشکارسازی نام تمام مواد اولیه بر روی برچسب فرآورده های غذایی مطابق قوانین کمیسیون اروپا، شناسایی پروتئین سویا در فرآورده های غذایی به منظور اطمینان از ایمنی غذا، برچسب زنی صحیح و حمایت از مصرف کننده ضروری است (9، 10، 15، 20).

تا کنون تکنیک های مختلفی به منظور شناسایی سویا در فرآورده های گوشتی به کار برده شده است. جاهد خانیکی و همکاران در سال 1383 به بررسی بافت شناسی سویا در همبرگرهای خام منجمد تهران پرداختند که با تفاوت رنگ آمیزی بین بافت سویا و گوشت به وجود سویا در تمام نمونه های مورد بررسی پی بردند (1).

Morrissey و همکاران در سال 1981 به بررسی پروتئین های سویا در فرآورده های گوشتی حاوی سویا به روش آنزیماتیک پرداختند که با اندازه گیری مقدار گالاکتوز و آرابینوز حاصل از هیدرولیز اسیدی مخلوط گوشت و سویا در حضور آنزیم گالاکتوز-دهیدروژناز می توان به وجود سویا و گوشت پی برد (18).

Renčová و Tremlová در سال 2009، از روش Indirect Competitive ELISAبرای شناسایی تقلب سویا در سالامی و سوسیس استفاده کردند که 84٪ از نمونه های ارزیابی شده حاوی سویا بودند ولی بر روی برچسب آن ها درج نشده بود (21).

Zilio Dinon و همکاران در سال 2010، به بازبینی اولین سویای اصلاح ژنتیک شده برزیل در فرآورده های گوشتی و محصولات بر پایه سویا در سال 2007 تا سال 2008 پرداختند که پس از استخراج DNA، آزمون هایی شامل تکثیر ژن لکتین با PCR، بررسی کیفی تکثیر DNA نوترکیب در سویا اصلاح شده با

Nested PCR و اندازه گیری کمّی آن به روش Real-time PCR صورت گرفت (25).

در مجموع روش های مورد استفاده برای شناسایی و تجزیه و تحلیل پروتئین های گیاهی و حیوانی در فرآورده های گوشتی شامل روش های متفرقه (آنالیز حسی، روش های شیمیایی، تفاوت بافت شناختی، ویژگی های بافت چربی، سطح گلیکوژن در بافت ماهیچه)، روش های بر پایه پروتئین (میکروسکوپیک، الکتروفورتیک، کروماتوگرافی، ایمنی شناسی) و روش های بیولوژی مولکولی شامل هیبریداسیون DNA و PCR می باشند. با توجه به معایب و محدودیت های روش های متفرقه و روش های بر پایه پروتئین از جمله عدم عملکرد اختصاصی، پیچیدگی و مقرون به صرفه نبودن از لحاظ هزینه و زمان، کاربرد تکنیک PCR به علت عملکرد ساده، حساس و اختصاصی افزایش یافته است (4، 6، 13، 19، 21).

هدف از این تحقیق، بررسی صحت برچسب مواد اولیه اصلی شامل وجود گوشت قرمز و عدم وجود سویا در تهیه 10 نوع همبرگر ممتاز (همبرگرهای حاوی حداقل 60٪ گوشت) عرضه شده در شهرتهران در سال 1392، بر اساس یک روش حساس و دقیق مولکولی می باشد.

2- مواد و روش ها

2-1 نمونه برداری

گوشت خام گاو از یکی از قصابی های شهر تهران و سویای خشک بافت دار بسته بندی شده یکی از کارخانجات تولید سویا در ایران، خریداری شدند و به عنوان نمونه های شاهد در نظر گرفته شدند. 10 نوع همبرگر ممتاز با درصدهای گوشتی متفاوت(60، 75، 80، 85، 90 و 95) در فروردین ماه سال 1392 از سطح شهر تهران جمع آوری و بطور تصادفی و بدون لحاظ نمودن اولویتی کدگذاری شدند و برای استخراج DNA در 20°C- نگهداری شدند.

2-2 استخراج DNA

0/06 گرم نمونه گوشت خام گاو، سویا و نمونه های همبرگر وزن شدند و با استفاده از اسکالپل داخل میکروتیوپ 1/5 ml استریل ریخته شد. سپس آزادسازی DNA توسط 600µl از بافر استخراج CTAB (pH:8 0/5 M EDTA 4ml ، 4M ml 35 NaCl، 10ml Tris HCL 1M pH:8 و 2g CTAB) و µl 50 پروتئیناز K، داخل بن ماری 65°C به مدت 3 انجام شد و در نهایت دو فاز شدن نمونه ها در سانتریفوژ 12000دور در دقیقه و دمای°C 4 به مدت 10 دقیقه اجرا شد. حذف مواد آلی طی دو مرحله افزودن کلرفرم سرد هم حجم فاز رویی هر یک از نمونه های داخل میکروتیوپ و ورتکس 16 ثانیه ای و شرایط سانتریفوژ مذکور و یک مرحله افزودن µl 600 ایزوپروپانول سرد، تکان دادن 15 دقیقه ای، سانتریفوژ و تخلیه کامل میکروتیوپ پایان یافت. به منظور حذف املاح و تغلیظ DNA، در هر میکروتیوپ 200µl اتانول 70% سرد اضافه شد که بعد از 10 دقیقه تکان دادن بسیار آرام و سانتریفیوژ، DNA غیر محلول رسوب نمود. سپس کل محتویات، تخلیه و به منظور تبخیر باقی اتانول، میکروتیوپ ها در داخل انکوباتور °C 45 به مدت 20 دقیقه قرار داده شد درنهایت جهت حل نمودن رسوب DNA ، µl 50 آب مقطر تزریقی افزوده شد (22).

2-3 پرایمرهای الیگونوکلئوتید

برای شناسایی اختصاصی گوشت گاو و سویا در نمونه های همبرگر ممتاز با استفاده از توالی های موجود در بانک اطلاعات ژن (GenBank) ، پرایمرهای اختصاصی برای شناسایی ژن سیتوکروم b میتوکندریایی گاو و ژنوم لکتین سویا به ترتیب با توالی های مندرج در جدول 1 از شرکت تکاپو زیست تهیه شدند. نام پرایمرها از مقالات پر ارجاع و استناد Matsunaga و Abd El-Nasser دریافت شد و با نرم افزار Vector NTI مورد بازبینی قرار گرفت و در سایت NCBI هم تطبیق داده شد تا از صحت و سقم آن اطمینان حاصل شود. سپس جهت ساخت پرایمر ها به شرکت تکاپو زیست سفارش داده شد(4، 6).

2-4 PCR اختصاصی ژن لکتین سویا و ژن سیتوکروم b گونه گاو

بهینه سازی واکنش PCR جهت دستیابی به نتایج مطلوب و عدم ایجاد واکنش تداخلی (Cross reaction) بین پرایمرها و DNAهای الگو (DNA سویا و DNA گونه گاو) انجام شد. برای هر واکنش PCR، کنترل مثبت با DNA استخراج شده از نمونه های شاهد و کنترل منفی با بکارگیری آب مقطر در نظر گرفته شد. بهینه سازی دمای اتصال پرایمرها با در نظر گرفتن

جدول 1- توالی پرایمر ها و اندازه قطعات تکثیر یافته با هر پرایمر در هر گونه

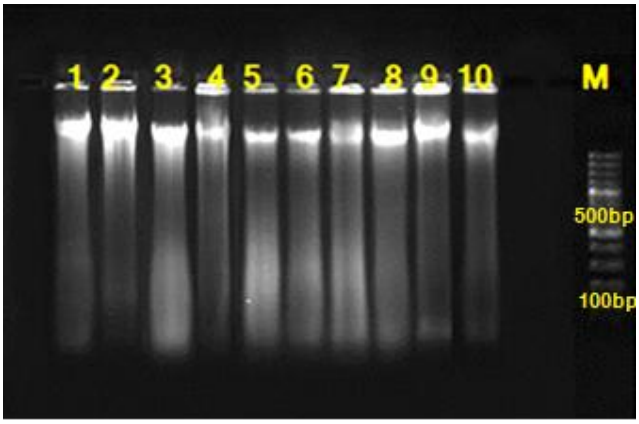
نام پرایمر	ژن ها	توالی	وزن مولکولی(bp)	مرجع
Cattle primer	Cytochrome b	´5´CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG3 5´GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCT TGATGAAA3´	274	Matsunaga et al. (1999)
Soya primer	Lectin	5´GCCCTCTACTCCACCCCCATCC3´ 5´GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG3´	118	Abd El-Nasser et al. (2010)

گرادیان دمایی 50-60 درجه سانتی گراد و تغییر در تعداد چرخه های دمایی از 30- 35 بار، تغییر در غلظت پرایمرهای مورد استفاده به منظور دستیابی به تکثیر اختصاصی ژن لکتین سویا و سیتوکروم b گاو و حذف باندهای غیر اختصاصی صورت گرفت. بطوریکه بهترین نتایج در دمای اتصال 60 درجه و تعداد 35 چرخه حاصل شد. بعلاوه به منظور جلوگیری از ایجاد واکنش تداخلی دو پرایمر اختصاصی سیتوکروم b گاو و لکتین سویا مورد استفاده در این مطالعه، بهینه سازی واکنش PCR با DNA غیر هدف نیز مورد آزمون قرار گرفت. بدین معنی که در بهینه سازی پرایمر اختصاصی لکتین جهت تشخیص سویا، پرایمر لکتین با DNA غیر هدف که همان DNA گونه گاو می باشد مورد آزمون قرار گرفت. بررسی عدم واکنش تداخلی پرایمر سیتوکروم b گونه گاوی با DNA غیر هدف یعنی سویا نیز تست شد. در نهایت واکنش PCR در حجم نهایی 25 µl شامل 2/5 µl بافر 10x PCR، 1/5 µl $MgCl_2$، 0/5 µl dNTP، 0/5 µl Taq پلیمراز (Fermentase, USA)، 0/5 µl (0/4 میکرومولار) از پرایمر اختصاصی ژن لکتین سویا و سیتوکروم b گاو، 50 ng از DNA نمونه های استخراج شده انجام شد.

در نهایت تکثیر DNA های استخراج شده از نمونه های همبرگر ممتاز، برای هر دو پرایمر مذکور با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad PCR System, USA) مطابق برنامه دمایی مرحله دناتوراسیون ابتدایی در 95°C به مدت 1 دقیقه، 35 چرخه اتصال پرایمر شامل اعمال دمای 94°C به مدت 1 دقیقه، دمای 60°C به مدت 1 دقیقه و دمای 72°C به مدت 1/5 دقیقه صورت گرفت و در پایان مرحله گسترش نهایی پرایمر با اعمال دمای 72 °C به مدت 5 دقیقه انجام گردید. محصولات PCR، پس از رنگ آمیزی با gel red بر روی ژل آگارز 2٪ در تانک الکتروفورز حاوی بافر TBE (Tris Base, Boric acid, Na EDTA, Deionized Water) با ولتاژ 100V به مدت 1 ساعت مورد بررسی کیفی قرار گرفتند که نتایج به وسیله دستگاه ژل داک UV TEC، ساخت کشور انگلستان مشاهده گردید.

3- نتایج و بحث

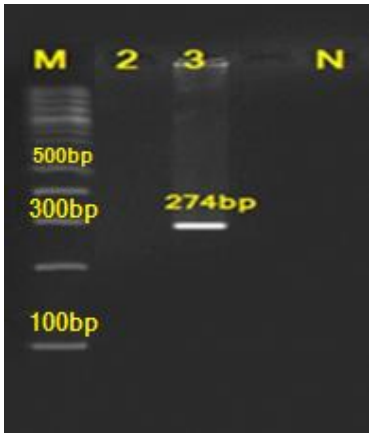
کیفیت و کمّیت DNA استخراج شده از هر نمونه با الکتروفورز ژل آگارز 2٪ و سنجش نانودراپ بررسی شد که ارزیابی شدت باندها و میزان جذب DNA در محدوده (2-1/8) نشان دهنده مطلوب بودن روش استخراج DNA جهت انجام PCR ژن های مورد نظر بود. کیفیت DNA استخراج شده از نمونه های همبرگر ممتاز، در شکل 1 قابل مشاهده است.



شکل1- DNA استخراج شده 10 برند همبرگر ممتاز، چاهک-های 10-1: به ترتیب نمونه‌های 10-1 همبرگرهای ممتاز؛ M: مارکر bp.100

1-3 بررسی عدم واکنش تداخلی پرایمرها (Cross reaction)

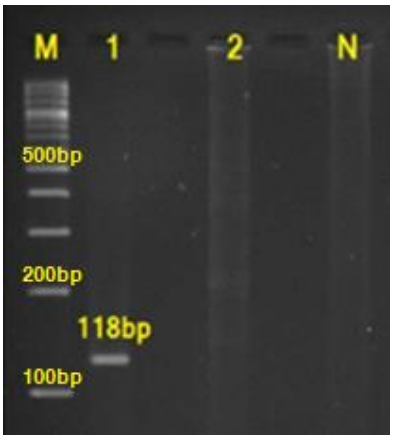
ابتدا PCR اختصاصی بر روی DNA استخراج شده از گوشت گاو و سویا (نمونه های شاهد) با پرایمرهای اختصاصی سیتوکروم b گاو و ژن لکتین سویا انجام شد. پرایمر اختصاصی سیتوکروم b گونه گاو و سویا به ترتیب سبب تکثیر قطعات 274 bp و 118 bp شدند. به منظور اطمینان از عملکرد اختصاصی هر پرایمر و عدم واکنش متقاطع پرایمرها، Simplex-PCR هر پرایمر با DNA غیر هدف با سه بار تکرار این آزمون انجام شد. نتایج Simplex-PCR هر پرایمر با DNA های گونه هدف و غیر هدف، در شکل های 2 و 3 ارائه شده است.



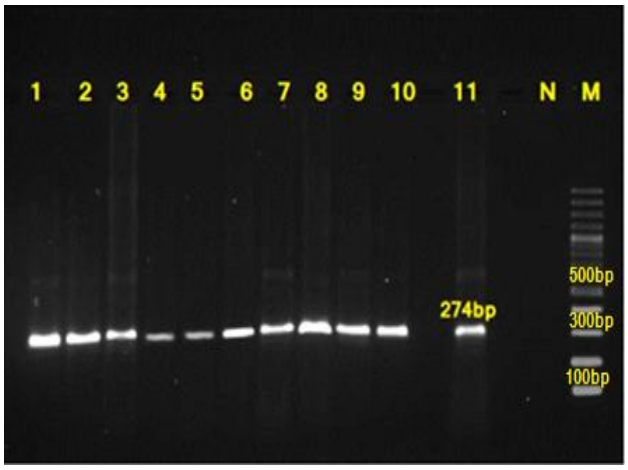
شکل 2- پروفایل محصول PCR جهت تایید عدم وجود واکنش متقاطع پرایمرها و تکثیر قطعه bp 274 اختصاصی ژن سیتوکروم b گونه گاو بر روی ژل آگارز 2%، M : مارکر bp 100، چاهک 2: عدم انجام PCR با DNA غیر هدف (سویا)، چاهک3: تکثیر قطعه bp 274 با DNA هدف گونه گاو، N: کنترل منفی.

2-3 PCR اختصاصی نمونه های همبرگر ممتاز با پرایمر اختصاصی گونه گاو

آزمون PCR به منظور تایید وجود گوشت قرمز گاوی با پرایمر اختصاصی ژن سیتوکروم b گونه گاوی بر روی DNA های استخراج شده از همبرگرهای ممتاز انجام گرفت. تکثیر قطعه bp 274 ژن سیتوکروم b در تمامی نمونه های مورد مطالعه، حاکی از وجود گوشت قرمز گاوی بر طبق برچسب اعلان شده بر روی نمونه ها بود. نتایج حاصل از تکثیر قطعه 274bp ژن سیتوکروم b میتوکندریایی توسط پرایمر اختصاصی گاو با DNA استخراج شده از نمونه های همبرگر ممتاز بر روی ژل آگارز 2٪ در شکل 4 نمایش داده شده است.



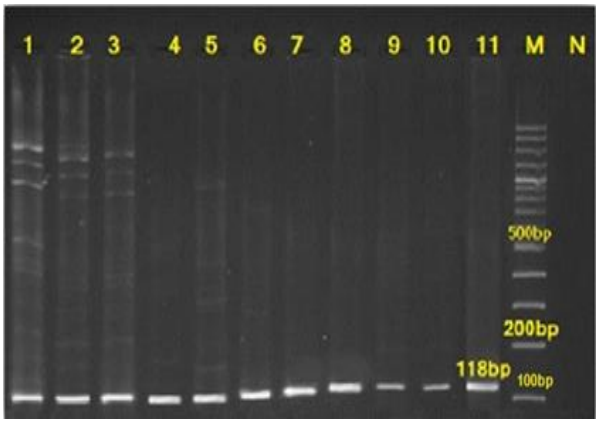
شکل 3- پروفایل محصول PCR جهت تایید عدم وجود واکنش متقاطع پرایمرها و تکثیر قطعه bp 118 اختصاصی ژن لکتین سویا بر روی ژل آگارز 2%، M : مارکر bp 100، چاهک 1: تکثیر قطعه bp 118 با DNA هدف سویا، چاهک 2: عدم انجام PCR با DNA غیر هدف (گونه گاو)، N: کنترل منفی.



شکل 4- نمایش پروفایل Simplex-PCR 10برند همبرگر ممتاز با پرایمر اختصاصی ژن سیتوکروم b میتوکندریایی گونه گاو و تکثیر قطعه bp 274، بر روی ژل آگارز2%، چاهک های 1-10: برندهای 10-1 همبرگرهای ممتاز، چاهک 11: کنترل مثبت با DNA گاو، N: کنترل منفی، M: مارکر bp 100.

3-3 PCR اختصاصی نمونه های همبرگر با پرایمر اختصاصی سویا

نتایج حاصل از انجام PCR با پرایمر اختصاصی ژن لکتین سویا، حاکی از تکثیر قطعه 118 bp در تمامی نمونه های مورد مطالعه بود. این یافته، نشان دهنده استفاده از پروتئین سویا در تمامی نمونه های همبرگر ممتاز مورد مطالعه، به عنوان بخشی از گوشت قرمز مصرفی در محصول و آشکارسازی تقلب در محصولات عرضه شده به بازار بر خلاف برچسپ حک شده بر روی آن ها و عدم رعایت حقوق مصرف کننده می باشد. نتایج حاصل از تکثیر قطعه 118 bp ژن لکتین سویا با DNA استخراج شده از نمونه های همبرگر بر روی ژل آگارز 2٪ در شکل 5 ارائه شده است.



شکل 5- نمایش پروفایل Simplex-PCR 10برند همبرگر ممتاز با پرایمر اختصاصی لکتین سویا و تکثیر قطعه bp 118، بر روی ژل آگارز2%، چاهک های 10-1: برندهای 10-1 همبرگرهای ممتاز، چاهک 11: کنترل مثبت با DNA سویا، M: مارکر bp 100، N : کنترل منفی.

افزایش آگاهی مصرف کنندگان در مورد ترکیب فرآورده های گوشتی، نظارت بیشتر بر روی نوع گوشت های مصرفی در این محصولات را می طلبد. برچسب زنی نادرست فرآورده های گوشتی نشانگر یک تقلب تجاری است و تأیید اظهارات بر چسب ذکر شده بر روی فرآورده های تجاری به عنوان یک جنبه بسیار مهم برای مصرف کنندگان، صنایع غذایی و مسئولان بررسی مواد غذایی ضروری است (15). امروزه شناسایی انواع پروتئین با روش های مبتنی بر پروتئین و DNA متداول است. پروتئین ها، به علت وابستگی به بافت استخراج شده از آن، در همه بافت ها ساختار یکسان ندارند (11). به طور کلی روش های شناسایی بر پایه پروتئین، برای محصولات فرآوری شده (به علت دناتوراسیون پروتئین در حین فرآیند حرارتی و فشار بالا و ...) و غذاهای پیچیده (عدم قابلیت تمایز بین گونه های نزدیک) مناسب نیستند و نیز روش هایی زمان بر و گران قیمت هستند (23، 24). روش بافت شناسی مورد استفاده توسط جاهد خانیکی در سال 83، روشی زمانبر است و قادر به شناسایی کنسانتره و ایزوله سویا نیست. روش کیفی آنزیماتیک به کار برده شده توسط Morrissey در سال 1981، به علت افت آزادشدن گالاکتوز و آرابینوز در فرآورده های حرارت دهی شده، قابلیت کاربرد در این فرآورده ها را ندارد. روش Indirect Competitive ELISA به کاربرده شده توسط Recnova و Tremlova، نیازمند میزان زیاد نمونه، هزینه و زمان بالا است و آنتی بادی های مورد نیاز این آزمون همواره در دسترس نیستند (10، 17). در صورتی که DNA یک مولکول نسبتاً پایدار با ساختار یکسان در همه سلول ها و بافت ها است و دارای قدرت تحمل حرارتی بالاتر نسبت به پروتئین است که در صورت دناتوراسیون بخشی از مولکول DNA، با تکثیر قطعه کوچکی از آن می توان ترکیب مورد نظر را شناسایی کرد (4، 5، 7، 12، 24). به همین دلیل روش های تکثیر DNA به عنوان تکنیک های بررسی موادغذایی برای شناسایی تقلبات غذایی مورد توجه هستند. زیرا دارای قابلیت هایی چون عملکرد حساس و اختصاصی، شناسایی مقادیر اندک DNA در مواد خام و فرآوری شده، تکثیر یک میلیون نسخه از هر قطعه DNA، در دسترس بودن و قابلیت نگهداری همیشگی الیگونوکلئوتید های مورد نیاز برای PCR، تأیید و تکمیل سایر روش ها در صورت عدم کفایت سایر روش های شناسایی، است (14، 15، 17، 25).

نتایج حاصل از این تحقیق که بر پایه شناسایی DNA استوار است نشان می دهد، در آنالیز PCR ، شناسایی قطعه تکثیر شده به منظور اطمینان از تطابق DNA تکثیر شده با توالی هدف انتخابی، مرحله ای ضروری به شمار می رود (25). در این آزمون، تمام نمونه های آنالیز شده دارای DNA با کیفیت بالا برای تکثیر PCR بودند. خلوص DNA استخراجی در تمام موارد کافی و مناسب بود (A_{260}/A_{280} باید بین 1/8 تا 2 باشد) که این پارامتر نشانگر مناسب بودن DNA استخراج شده از نمونه های گوشت گاو، سویا و همبرگرهای ممتاز برای تکثیر به روش PCR می باشد. تکثیر قطعات bp 274 ژن سیتوکروم b گاو و bp 118

ژن لکتین سویا با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی هر کدام بدون ایجاد واکنش تداخلی با DNA غیر هدف بهینه سازی شد و در تمام نمونه های همبرگرهای ممتاز به طور موفقیت آمیزی حاصل شد (8، 10). نکته قابل توجه در انتخاب پرایمرها، طول امپلیکون های حاصل شده می باشد. به طوریکه، طول امپلیکون های تکثیر شده توسط پرایمرها، کمتر از 300 bp درنظر گرفته شدند، زیرا احتمال تخریب و شکست DNA نمونه‌ها تحت فرایندهای حرارتی و به طبع آن بروز برخی مشکلات در تکثیر توسط PCR وجود دارد. مشاهده گردید که در نمونه های همبرگر ممتاز مورد بررسی، علاوه بر گوشت قرمز گاوی از سویا نیز استفاده شده است، که این یافته بر خلاف برچسپ حک شده بر روی محصولات بوده و جایگزینی پروتئین سویا را با بخشی از گوشت قرمز گاوی مصرفی در محصولات مورد نظر به اثبات می رساند. این امر، وقوع یک تقلب تجاری را به دلیل ارزانتر بودن سویا نسبت به گوشت گاو و نادیده گرفتن حقوق مصرف کنندگان و تخطی از مقررات برچسب زنی را به اثبات می رساند. از سوی دیگر نیاز مبرم به ارائه یک روش کارآمد، آسان، حساس، مقرون به صرفه و قابل اجرا در تمامی آزمایشگاه های کنترل کیفیت، همچون آزمون مورد استفاده در این تحقیق احساس می شود. امید است بتوان با ارائه چنین آزمون هایی و فراگیر نمودن آن ها بتوان از بروز تخلفات و تقلبات تجاری در عرصه صنایع غذایی و تضییع حقوق مصرف کننده جلوگیری نمود.

4- نتیجه گیری

هدف از این تحقیق توسعه یک روش آسان، سریع و کم هزینه جهت شناسایی پروتئین سویا افزوده شده به فرآورده های گوشتی است. در مرحلهٔ ابتدایی این تحقیق، Simplex-PCR بر روی DNA گوشت گاو و سویا (نمونه های شاهد) استخراج شده به ترتیب با پرایمر اختصاصی گوشت گاو و سویا انجام گردید. پرایمرهای اختصاصی ژن سیتوکروم b گاو و ژن لکتین پروتئین گیاهی سویا، قطعات 274bp و 118 bp را تکثیر نمودند. هم چنین Simplex-PCR با پرایمرهای گاو و سویا بر روی DNA استخراجی 10 برند همبرگر ممتاز نیز انجام شد. نتایج حاصل از Simplex-PCR با پرایمرهای گاو و سویا بیانگر این بود که در تمام نمونه های همبرگر، قطعه 274bp حاصل تکثیر ژن سیتوکروم b گاو و قطعه 118bp حاصل تکثیر ژن لکتین سویا مشاهده شد. نتایج حاصل از آزمون PCR، حاکی از تایید وجود گوشت قرمز گاوی مطابق با برچسب حک شده در نمونه ها و نیز وجود پروتئین سویا برخلاف برچسب ذکر شده در مواد اولیه می باشد. به عبارتی در تمام نمونه های همبرگر، علاوه بر گوشت گاو، سویا نیز مشاهده شده که نشانه تقلب تجاری است زیرا مطابق استاندارد ملی ایران، افزودن سویا به همبرگرهای ممتاز (حاوی بالای 60٪ گوشت قرمز) غیر مجاز است. با توجه به نتایج حاصل شده می توان گفت که این روش حساس، سریع، اختصاصی، تکرارپذیر و بدون واکنش متقاطع قادر به شناسایی تقلب در همبرگر می باشد. نتایج این تحقیق نشان می دهد که روش PCR می تواند جهت شناسایی منشاء پروتئین های حیوانی و گیاهی در سایر فرآورده های گوشتی نظیر کباب لقمه، سوسیس، کالباس، ناگت و ... به کار رود.

5- منابع

1. جاهد خانیکی، غ. و نوری، ن. 1383. تشخیص هیستولوژیکی سویا درهمبرگرهای خام منجمد ایران. *فصلنامه پژوهش و سازندگی*، شماره 62، 75-71.
2. حسینی، م.، برازندگان، خ.، آخوندزاده، آ.، شمشادی، ب.، توکلی، ح. و خاکسار، ر. 1388. شناسایی انواع گوشت مورد استفاده در تولید همبرگرهای عرضه شده درشهر تهران در سال1386. *فصلنامه علوم و صنایع غذایی*، دوره 6، شماره 3، 100-95.
3. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران،1370. ویژگی های همبرگر خام منجمد. استاندارد ملی ایران، شماره 2304، چاپ سوم.
4. Abd El-Nasser, M., Labieb, H. Y. and Abd El-Aziz, D. M. 2010. Detection of native and modified soybean in some meat products in Assiut city, *Egypt. Assiut University Bull Environ Research*, 13(1): 27-35.
5. Abdullah, T., Radu, S., Hassan, Z. and Kair Hashim, J. 2006. Detection of genetically modified soy in processed foods sold commercially in Malaysia by PCR-based method. *Food Chemistry*, 98: 575–579.
6. Castro, F., Garcı´a, M. C., Rodrı´guez, R., Rodrı´guez, J. and Marina, M. L. 2007. Determination of soybean proteins in

commercial heat-processed meat products prepared with chicken, beef or complex mixtures of meats from different species. *Food Chemistry*, 100: 468–476.

7. Dalmassoa, A., Fontanellab, E., Piattib, P., Civeraa, T., Rosatic, S. and Bottero, M. T. 2004. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Molecular and Cellular Probes*, 18: 81–87.
8. Dennis, M. J. 1998. Recent developments in food authentication. *Analyst*, 123: 151-156.
9. Eaqub Ali, M., Hashim, U., Mustafa, S. and Man, Y. 2012. Swine-specific PCR-RFLP assay targeting mitochondrial cytochrome b gene for semi quantitative detection of pork in commercial meat products . *Food Analysis Methods*, 5: 613–623.
10. Espiñeira, M., Herrero, B., Vieites, J. & Santaclara, F. 2010. Validation of end-point and Real-time PCR methods for the rapid detection of soy allergen in processed products. *Food Additives and Contaminants*, 27(4): 426-432.
11. Ghovvati, S., Nassiri, M. R., Mirhoseini, S. Z., Heravi Moussavi, A. and Javadmanesh, A. 2009. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. Food Control, 20: 696–699.
12. Hird, H., Goodier, R., and Hill, M. 2003. Rapid detection of chicken and turkey in heated meat products using the polymerase chain reaction followed by amplicon visualisation with vistra green. *Meat Science*, 65: 1117–1123.
13. Ilhak, O. I. and Arslan, A. 2007. Identification of meat species by polymerase chain reaction (PCR) Technique. *Veterinary and Animal Science*, 31: 159-163.
14. Mafra, I., A. Silva, S., J. M. O. Moreira, E., S. Ferreira da Silva,C., Beatriz, M., and Oliveira, P. 2008. Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. *Food Control*, 19: 1183–1190.
15. Mafra, I., M. P. L. V. O. Ferreira, I. and M. P. P. Oliveira, B. 2008. Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227: 649–665.
16. Matsunagaa, T., Chikuni, K., Tanabeb, R., Muroyab, S., Shibata, K., Yamadaa, J. et al. 1999. A quick and simple method for the identication of meat species and meat products by PCR assay. *Meat science*, 51: 143-148.
17. Meyer, R., Chardonnens, F., Hiibner, Ph. & Liithy, J. 1996. Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Zeitschrift fur Lebensmittle-Untersuchung und- Forschung* A, 203: 339-344.
18. Morrissey, P. A., Olbrantz, K. & Greaser, M. L. 1982. A simple, sensitive enzymatic method for quantitation of soya proteins in soya-meat blends. *Meat science*, 7: 109-116 .
19. Nollet, L. 2011. Detection of adulterations, in the safety analysis of foods of animal origin in: Detection of adulteration, (Editors: L. Nollet and F. Toldra). *Belgium*, pp. 155-158.
20. Pospiech, M., Tremlová, B., Renčová, E. and Randulová, Z. 2009. Immunohistochemical Detection of Soya Protein Optimization and Verification of the Method . *Food Science*, 27(1): 11–19.
21. Renčová. E. and Tremlová, B. 2009. ELISA for detection of soya proteins in meat products. *Acta Veterinaria Brno*, 78: 667-671.
22. Sambrook, J. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. (Editors: J. Sambrook, E. F. Fritch, T. Maniatis). Cold spring Habor Laboratory, New York, pp. 3-15.
23. Soares, S., Amaral, J. S., Beatriz P. P. Oliveira, M., and Mafra, I. 2013. A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. *Meat Science*, 13: 2-8.
24. Stamoulis, P., Stamatis, C., Sarafidou, T. and Mamuris, Z. 2010. Development and application of molecular markers for poultry meat identification in food chain. *Food Control*, 21: 1061-1065.
25. Zilio Dinon, A., Treml, D., Souza de Mello. D. and Carolina Maisonnave Arisi, A. 2010. Monitoring of GMO in Brazilian processed meat and soy-based products from 2007 to 2008. *Food Composition and Analysis*, 23: 226 -229.