نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۷ شماره ۴/ سال ۱۳۹۶/ صفحات ۷۳ تا ۸۶

تشخیص تقلب نوع گوشت مصرفی در فراورده‌های گوشتی

مهسا علی‌کرد[۱]، حسن ممتاز [۲]، قاسم یادگارفر [۳]، جواد کرامت [۴] و عزیز همایونی‌راد*[۵]

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۱۷

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع‌غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی ، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
[۲] دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد شهرکرد
[۳] دانشیار، گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
[۴] دانشیار، گروه مهندسی علوم وصنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
[۵] دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
*مسئول مکاتبه: E mail: homayounia@tbzmed.ac.ir

چکیده

بررسی تطابق نوع گوشت درج شده بر روی برچسب فراورده‌های گوشتی با محتویات آنها روش‌های مختلفی وجود دارد. هدف این تحقیق بررسی اصالت نوع گوشت مصرفی در مقایسه با برچسب درج شده بر روی محصول و بررسی و ارتقاء دقت شناسایی تکنیک به کاربرده شده‌است. در این بررسی نسبت ۳۰، ٤۰ و ۵۰ درصد از گوشت خام هرگونه اسب، خوک والاغ با گوشت گاو/گوسفند به صورت آگاهانه مخلوط گردید و جهت نمونه فرآیند شده محصولات ۳۰ و ٤۰ درصد از نمونه‌های تهیه شده مطابق مراحل تولید سوسیس فرآیند شد. همچنین ۳۵ نمونه از سه برند معتبر در شهرهای اصفهان، تهران و تبریز و در سه محصول خام (گوشت چرخ‌کرده)، نیمه‌فراوری (همبرگر یا کباب لقمه آماده) و فراوری‌شده (سوسیس) تهیه گردید. بررسی‌ها در سه تکرار و در توالی پرایمرهای ۱۵۳، ۱٤۵، ۲۲۷ و ۱۰٤ جفت باز نوکلئوتیدی به ترتیب جهت شناسایی گونه اسب، الاغ ، خوک و گاو/گوسفند انجام پذیرفت. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراجی DNA انجام و سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مرکب با دو برنامه پیشنهادی برای نمونه‌ها انجام شد که نتایج برنامه‌های پیشنهادی مورد بررسی قرار گرفت. سپس میزان اختصاصیت پرایمرها با استفاده از برنامه نهایی بررسی گردید. در نهایت نمونه‌های تجاری معتبر از نظر نوع گوشت گونه‌های مورد مطالعه مورد آزمون قرار داده شد.
قابلیت شناسایی تا ۰/۰۰۱ نانوگرم DNA با استفاده از این تکنیک مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌های نشان داد متاسفانه تقلب در فراورده‌های گوشتی وجود دارد. در مجموع از شش (۱۷٪) تقلب صورت گرفته چهار مورد (۱۱٪) مربوط به گوشت اسب و دو مورد (٦٪) مربوط به گوشت الاغ بوده است. اکثر تقلبات در محصولات گوشتی فراوری شده با برچسب گوشت قرمز در سوسیس ٤۰٪ و یا ۵۰٪ بوده‌است.

واژگان کلیدی: تشخیص، تقلب، گوشت، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مرکب، گونه

مقدمه

گوشت و فراورده‌های گوشتی، تامین‌کننده‌های اصلی پروتئین بدن بوده که بیانگر اهمیت مصرف آن‌ها در تغذیه انسان می‌باشد. سوء استفاده‌ی برخی از تولیدکنندگان مواد غذایی، موجب توجه بیشتر به ترکیبات تشکیل‌دهنده محصولات غذایی گوشتی شده-است. از این رو برچسب‌گذاری صحیح محصولات به خصوص در محصولات فراوری شده که توانایی تشخیص یک جزء از سایر اجزا دشوار است، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارمی‌باشد (ولف و همکاران ۲۰۰٤; مونتوسکو و همکاران، ۲۰۱۳). برای شناسایی اصالت گوشت حلال و تفکیک آن از گوشت حرام از روش‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و سایر روش‌های پروتئینی استفاده شده‌است که در این بین بیشتر مطالعات برپایه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و با بکارگیری تکنیک‌های مختلف آن بوده‌است. بالین و همکاران (۲۰۰۹) و ته و همکاران (۲۰۱٤) و کوما و همکاران (۲۰۱۲) با استفاده از روش Real-Time PCR به شناسایی نوع گوشت به صورت خام و فراوری شده پرداخته‌اند. استمولیس و همکاران (۲۰۱۰) با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction یا PCR) وجود گوشت مرغ را در غذاهای چینی مورد ارزیابی قرار دادند.

در تحقیقات صورت گرفته در شناسایی نوع گوشت با استفاده از واکنش زنجیره‌ی پلیمراز به وسیله آنزیم‌های محدودالاثر (RFLP-PCR) در گونه‌های گاو، گوسفند، مرغ و اسب/ الاغ در نمونه‌های تجاری جمع‌آوری شده از فروشگاه معتبر از طریق DNA میتوکندری (ژن سیتوکروم b) به ۷/۵۸ درصد تقلب در کل نمونه‌ها دست یافتند که برای اسب و الاغ یک توالی پرایمری مشترک درنظر گرفته شده است (دوستی وهمکاران، ۲۰۱٤). همچنین روش Species-specific PCR به منظور شناسایی گونه‌های گاو، گوسفند، مرغ و الاغ در ۹۱ نمونه گوشت گوساله، ۵۳ نمونه مخلوط گوشت گوساله و گوسفند تهیه شده از فروشگاه‌های عرضه محصولات دامی خام (قصابی) به شناسایی ٤۷/۲ درصد نمونه گوشت مرغ و ۰/۷ درصد نمونه گوشت الاغ دست یافته‌اند که نشان‌دهنده کارآمدی روش‌های به کار رفته می‌باشند (موسوی و همکاران، ۲۰۱۵).

از مطالعات صورت گرفته در زمینه شناسایی نوع گوشت در ایران می‌توان به تحقیق‌های پیرانی و همکاران (۱۳۸۸) در خصوص مناسب بودن روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مرکب برای شناسایی گوشت بز، گاو و گاومیش و همچنین هاشم- زادگان وهمکاران (۱۳۹۳) در بررسی همبرگرهای شهر تهران در اثبات وجود پروتئین سویا بر خلاف برچسب تایید شده به همراه گوشت گاو در تمامی نمونه‌های همبرگر ممتاز اشاره کرد. قوتی و همکاران (۲۰۰۹) و صادری و همکاران (۲۰۱۳) نیز با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت شناسایی گوشت گاو، گوسفند، مرغ و سایر پستانداران بهره برده‌اند.

هدف از این تحقیق بهینه‌سازی روش جهت بهبود دقت شناسایی (limit of Determined) با آنچه تا به حال صورت گرفته و بررسی برندهای معتبر از سه کلان شهر تولیدکننده‌ی اصلی محصولات گوشتی با استفاده از توالی پرایمرهای متفاوت با آنچه در مطالعات گذشته به کاربرده شده، صورت گرفته است و بررسی اصالت فراورده‌های گوشتی تجاری و اثبات وجود یا عدم وجود گوشت اسب، الاغ و خوک در محصولات عرضه شده در فروشگاه‌های سه شهر اصفهان، تهران و تبریز می‌باشد.

بدین منظور از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مرکب (Multiplex-PCR) و از برنامه‌ی جدیدی برای تکثیر در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شده است. همچنین میزان حساسیت پرایمرها بررسی و بهبود داده شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌های گوشت خالص خام از گونه‌های اسب، الاغ و گاو/گوسفند به عنوان کنترل مثبت از آزمایشگاه دامپزشکی شهرکرد و خوک از قسمت ارمنی نشین اصفهان و از بخش عضله حیوان انتخاب گردیدند و نسبت ۳۰، ٤۰ و ۵۰ درصد از گوشت خام هرگونه اسب، خوک والاغ با گوشت گاو/گوسفند به صورت آگاهانه مخلوط گردید و جهت نمونه فرآیند شده محصولات ۳۰ و ٤۰ درصد از نمونه‌های تهیه شده مطابق مراحل سوسیس‌زنی محصولات تجاری و تحت فرآیند حرارتی ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ دقیقه حرارت‌دهی قرار داده شد. این مرحله جهت تهیه نمونه‌های لازم برای تعیین اختصاصیت توالی پرایمرهای انتخابی صورت گرفت.

۳۵ نمونه‌های تجاری با استفاده از روش تصادفی از سه شهر اصفهان، تهران و تبریز و از هر شهر سه برند معتبر مورد ارزیابی قرار گرفت. محصولات انتخابی از هر برند به صورت خام (گوشت چرخ‌کرده بسته‌بندی شده)، نیمه‌فراوری (همبرگر یا کباب لقمه آماده) و فراوری‌شده (سوسیس با چهار تنوع محصول ٤۰، ۵۰ و۸۰ درصد گوشت قرمز و۹۰ درصد گوشت در برخی از برندها) انتخاب گردید. نمونه‌ها جمع‌آوری شده و تا زمان استخراج DNA در دمای ۱۸c°- تا ۲۰c°- جهت جلوگیری از تخریب آنزیمی نگهداری شد.

استخراجDNA

استخراج DNA از تمامی نمونه‌های خام و محصولات گوشتی مورد مطالعه با استفاده از کیت استخراجی DNA سیناژن براساس دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. جهت فرآیند استخراج DNA ۲۵-۵۰ میلی‌گرم از هر نمونه برداشته و ابتدا با ٤۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده و پنج میکرولیتر آنزیم پروتئازK نمونه را متلاشی نموده سپس توسط۳۰۰ میکرولیتر محلول رسوب‌کننده ذرات را رسوب داده، مایع رویی را تخلیه و سپس با یک میلی لیتر محلول شست و شو (کلرید سدیم) شسته تا DNA از نمک، پروتئین و بقایای سلولی عاری شود. در پایان DNA خالص بدست می‌آید که تا زمان آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دمای ۲۰ °c- نگهداری شد (پروتوکل کیت استخراجی شرکت سیناژن ایران). برای تعیین خلوص DNA از روش طیف‌سنجی اسپکتروسکوپی استفاده گردید و نمونه‌ها با خلوص ۲-۱/۸ به عنوان نمونه‌های قابل قبول در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مرکب مورد استفاده قرار گرفتند (آمارال و همکاران، ۲۰۱۵).

پرایمر نوکلئوتیدی

پرایمرهای بکار رفته در این پژوهش در جدول شمار ۱ ارائه گردیده‌است. یک جفت پرایمر از هر گونه اسب (کسمن و همکاران، ۲۰۰۹)، الاغ (کسمن و همکاران، ۲۰۰۹)، خوک (کسمن و همکاران، ۲۰۰۹) و سایر پستانداران (قوتی و همکاران) انتخاب و برای سنتز سفارش داده شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

۲۵ میکرولیتر از هر نمونه را در چهار میکروتیوب با ۵۰ میکرولیتر محلول واکنش و یک میکرولیتر پرایمر Forward و یک میکرولیتر پرایمر Reverse (سیناژن ایران) از هر نوع حیوان و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم تگ پلیمراز ترکیب (Fermentas, Lithuania) به همراه بازهای نوکلئوتیدی (Fermentas, Lithuania) ترکیب و در دستگاه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) قرار داده (فرناندز و همکاران، ۲۰۱٤) و طبق برنامه داده شده به دستگاه (جدول ۲ و ۳) عملیات تکثیر ژن به صورت Multiplex-PCR انجام گرفت.

جدول۱- پرایمرهای اختصاصی و مشترک طراحی شده جهت نوع گوشت هر حیوان

تعداد جفت باز تکثیر شده	توالی پرایمر	نوع پرایمر
۱۰٤	5́ GAA AGG ACA AGA GAA ATA AGG 3́ 5́ TAG GCC CTT TTC TAG GGC A 3́	سایر پستانداران(گاو/ گوسفند)
۲۲۷	5´CTA CAT AAG AAT ATC CAC CAC A 3´ 5´ACA TTG TGG GAT CTT CTA GGT 3´	خوک
۱۵۳	5CTATCCGACACACCCAGAAGTAAAG 3´ 5GATGCTGGGAAATATGATGATCAGA 3´	اسب
۱٤٥	5CATCCTACTAACTATAGCCGTGCTA 3´ 5CAGTGTTGGGTTGTACACTAAGATG3´	الاغ

جدول۲- برنامه اول تکثیر ژن به کاربرده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مرکب

پرایمر		مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مرکب
اسب، الاغ، خوک و گاو/گوسفند		
دقیقه ٥ و ۹٥°C		دناتوراسیون اولیه
دقیقه ۱ و ۹٤°C	دناتوراسیون	تکثیر
دقیقه ۱و ٥۸ °C	اتصال	
دقیقه ۲ و ۷۲°C	طویل سازی	
۳٤	تعداد سیکل	
دقیقه ۱۰ و ۷۲°C		طویل‌سازی نهایی

جدول ۳- برنامه دوم تکثیر ژن به کاربرده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مرکب

پرایمر		مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مرکب
اسب، الاغ، خوک و گاو/گوسفند		
دقیقه ۱۰ و ۹٤°C		دناتوراسیون اولیه
دقیقه ۱ و ۹٥°C	دناتوراسیون	تکثیر
دقیقه ۱و ٥۸ °C	اتصال	
دقیقه ۱/٥ و ۷۲°C	طویل سازی	
۳٤	تعداد سیکل	
دقیقه ٥ و ۷۲°C		طویل‌سازی نهایی

الکتروفورز

جهت تشخیص محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از ژل آگار دو درصد با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده گردید. برای تهیه آن شش گرم پودر آگار در ۲۰ میلی لیتر بافر 1X ریخته و با استفاده از ماکروویو به مدت ۳۰ ثانیه قرار داده شد تا کاملاً ذوب شود. محلول آگار در دمای اتاق قرار داده شد تا سرد شود. سپس اتیدیوم بروماید اضافه و در قالب ژل که شانه-های چاهک در آن قرار داده شده ریخته شد. در نهایت بعد از تهیه ژل ۱۵ میکرولیتر نمونه‌ها را با سه میکرولیتر loading dye ترکیب و در چاهک‌ها بارگذاری گردید. در یکی از چاهک‌ها نیز کنترل مثبت و در یکی دیگر از چاهک‌ها ladder (Fermentas, Lithuania) بارگذاری شد. سپس نمونه‌ها به چاهک‌های مربوطه تزریق و با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز (Bio Rad, USA) شدند. در نهایت پس از طی زمان الکتروفورز، ژل از

قالب خارج و بر روی صفحه‌ی GEL document system منتقل شد. سپس باندهای ایجاد شده در ژل‌ها در نور ماوراءبنفش بررسی گردیدند (کیپتیت و همکاران، ۲۰۱٤).

بررسی اختصاصیت آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

به منظور تایید اختصاصی بودن پرایمرهای مورد استفاده با توجه به نزدیک بودن توالی‌ها و بررسی دقت تکنیک و شرایط آزمون، هریک از پرایمرها با DNA سایر گونه‌های مورد آزمون قرار گرفتند تا در صورت اتصال غیراختصاصی و ایجاد باندهای اضافی نامطلوب آن مورد مشخص و از بدست آمدن نتایج مثبت نادرست جلوگیری به عمل آید.

نمایش آماری

بعد از انتخاب برنامه نهایی با توجه به نزدیکی جفت توالی‌های به کار رفته، مجموعا ٤۲۰ آزمون برای ۳۵ نمونه مورد بررسی در چهار پرایمر و در سه تکرار برای نمونه‌ها انجام شد(۳۵ نمونه× ٤ پرایمر× ۳ تکرار= ٤۲۰ آزمون). داده‌ها به صورت توصیفی در برنامه اکسل ثبت و براساس اطلاعات طبقه‌بندی نمودارهای مدنظر تهیه گردید. نتایج آماری به صورت توصیفی ارائه شده است.

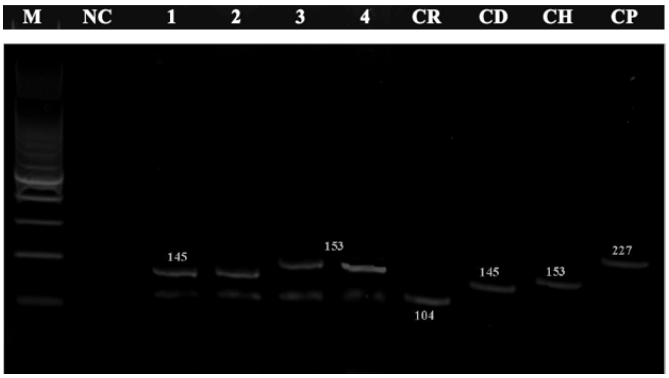
نتایج و بحث

در این مطالعه از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مرکب جهت شناسایی نوع گوشت مصرفی در فراورده‌های گوشتی خام و پخته استفاده گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مرکب امکان شناسایی همزمان چندین گونه را با استفاده از پرایمرهای اختصاصی امکان‌پذیر می‌سازد. تشخیص هر گونه با هیبرید شدن جفت توالی هدف با پرایمرهای۱۵۳، ۱٤۵ و ۲۲۷ جفت باز نوکلئوتیدی به ترتیب جهت شناسایی گونه اسب، الاغ و خوک استفاده و توالی ۱۰٤ جفت بازی برای شناسایی گونه گاو/گوسفند استفاده شده است. به وسیله برنامه‌ی معرفی شده در این مطالعه با دناتوراسیون اولیه ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت۱۰ دقیقه و ۹۵ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه، ۵۸ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد ۱/۵ دقیقه و در نهایت تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتگراد به مدت۵ دقیقه در ۳٤ سیکل، اصالت محصولات گوشتی تجاری در سه شهر اصفهان، تهران و تبریز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).

در نمونه حاصل از برنامه اول دایمر (یک محصول است که به صورت بالقوه در PCR تولید می‌شود و به صورت مخفف PD (primer dimer) که حاوی پرایمرها هیبرید شده با هم است به جای هیبرید شدن هر پرایمر با یک رشته از DNA الگو) (Viljoen et al, 2005) مشاهده می‌شود. معمولا دایمر قبل از اولین مارکر (٤۰ bp) مشاهده می‌شوند. اگر قرار باشد بارها و بارها یک نوع واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شود لازم است تا مقدار پرایمرهای مورد استفاده ست گردد. افزایش تعداد سیکل‌ها و کاهش غلظت پرایمرها که با کاهش حجم برداشتی از آن‌ها جهت رفع مشکل دایمرها قابل استفاده است که در این مطالعه تعداد سیکل‌ها افزایش داده شد. همچنین در تکرار نمونه‌های دیگر در ژل اسمیر (اسمیر ایجاد حالت سایه‌ای در پس زمینه شکل وجود دارد) ایجاد شده و همچنین باند ایجاد شده وضوح کافی را نداشتند. به همین خاطر برنامه دوم جهت بررسی نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. شکل ۱ نشان می‌دهد که تشخیص اصالت گونه‌ها براساس یک روش کارا انجام شده است. برنامه‌ی دوم تکثیر ژن به کاربرده شده در دستگاه PCR تصاویری واضح‌تر نسبت به برنامه اول نشان می‌دهد. بنابراین این برنامه به همراه مارکرهای کاربردی روشی مناسب و اثبات شده جهت تشخیص این سه نوع گوشت در فراورده‌های گوشتی تجاری خام و نیمه‌آماده و فرآیند شده می‌باشد که در حقیقت هیچ‌گونه همپوشانی در توالی پرایمرهای اسب، الاغ و خوک با گوشت پایه گاو و گوسفند مشاهده نشد

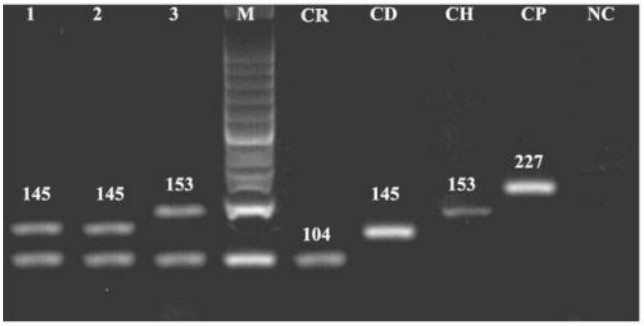
که نشان‌دهنده انتخاب صحیح توالی‌های پرایمرها می‌باشد (شکل ۱، ۲).

همانطور که در شکل ۲ مشخص است مشکلات برنامه اول در برنامه دوم رفع گردید. همچنین با توجه به نزدیکی توالی اسب و الاغ آزمونی جداگانه جهت بررسی قابلیت شناسایی و تمایز دو توالی اسب و الاغ از هم با استفاده از برنامه دوم انجام گرفت و نتایج آن در شکل ۳ مشخص شده است که آزمون امکان همپوشانی باندها و ایجاد باند اشتباه برای هریک از این دو توالی رد می‌کند.



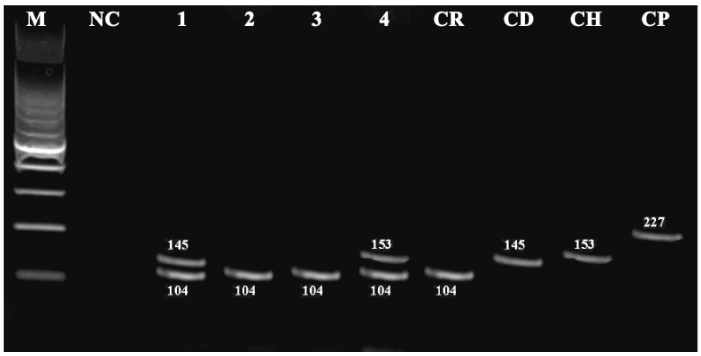
شکل ۱- تصویر نهایی از ژل الکتروفورز حاصله از برنامه اول چهار نمونه آزمایشی

M نشانگر استاندارد ۱۰۰ جفت بازی، ۱: گوشت الاغ ۵۰٪، ۲: گوشت الاغ ۲۵٪، ۳: گوشت اسب ۳۰٪، ٤: گوشت اسب ٤۰٪، CR گوشت گوسفند، CD: گوشت الاغ، CH: گوشت اسب، CP: گوشت خوک وNC کنترل منفی



شکل ۲- نتایج ژل اکتروفورز حاصل از برنامه دوم. ۱، ۲و ۳ نمونه مورد ارزیابی M

نشانگر استاندارد ۱۰۰جفت بازی. CH کنترل مثبت اسب، CR گوشت گوسفند، CD: گوشت الاغ، CH: گوشت اسب، CP: گوشت خوک وNC کنترل منفی. نمونه۱و۲و۳ دارای گوشت گاو /گوسفند، نمونه ۱و۲ دارای گوشت الاغ و نمونه ۳ دارای گوشت اسب بوده است.



شکل ۳- تاییدیه قابلیت تشخیص توالی پرایمر اسب و الاغ از هم. M نشانگر استاندارد ۱۰۰جفت بازی
CR گوشت گوسفند، CD: گوشت الاغ، CH: گوشت اسب، CP: گوشت خوک وNC کنترل منفی. نمونه۱، ۲، ۳ و ٤ دارای گوشت گاو /گوسفند، نمونه ۱ دارای گوشت الاغ و نمونه ٤ دارای گوشت اسب بوده است.

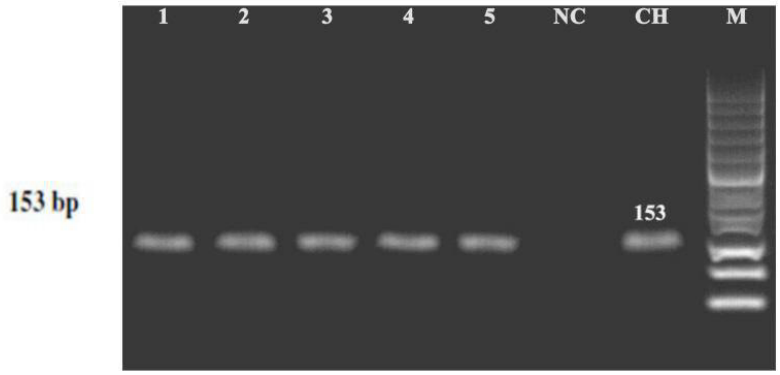
جدول ۴- نمونه بررسی شده به صورت اختلاط اگاهانه و نتایج حاصل از آنها

شماره نمونه	نوع نمونه	درصد اختلاط اگاهانه انواع گوشت	توالی پرایمرها		
			۱٤٥ bp	۱۵۳bp	۲۲۷ bp
۱	خام	۵۰ C+ ۵۰ p	-	-	+
		۵۰ C+ ۵۰H	-	+	-
		۵۰ C+ ۵۰D	+	-	-
۲	خام	٦۰ C+ ٤۰ P	-	-	+
		٦۰C + ٤۰ H	-	+	-
		٦۰ C + ٤۰D	+	-	-
۳	خام	۷۰ C+ ۳۰ P	-	-	+
		۷۰ C+ ۳۰ H	-	+	-
		۷۰ C+ ۳۰ D	+	-	-
٤	فرآیند شده	٦۰ C+ ٤۰ P	-	-	+
		٦۰ C + ٤۰ H	-	+	-
		٦۰ C + ٤۰ D	+	-	-
۵	فرآیند شده	۷۰ C+ ۳۰ P	-	-	+
		۷۰ C+ ۳۰ H	-	+	-
		۷۰ C+ ۳۰ D	+	-	-

D: الاغ، H: اسب، C: گاو/گوسفند و P: خوک

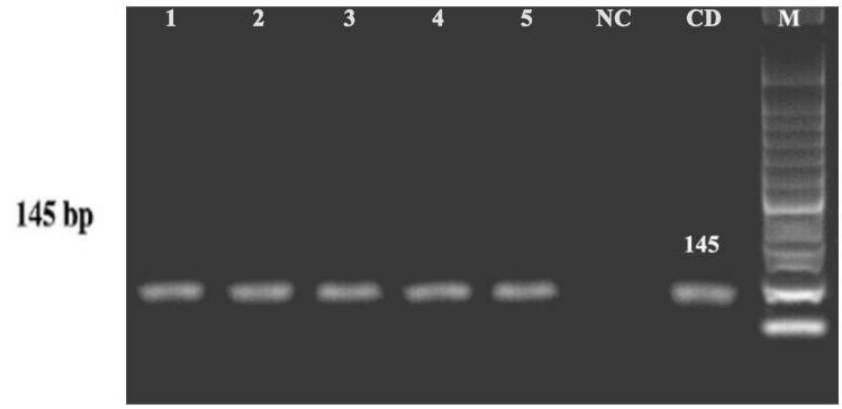
در ادامه نسبت مشخصی از نمونه‌ها مطابق جدول ٤ از طریق اختلاط انواع مختلف گونه‌ها تهیه شد و با استفاده از برنامه دوم میزان اختصاصیت پرایمرها مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج حاصله در جدول ٤ ارائه شده است که نشان‌دهنده انتخاب صحیح توالی پرایمرها برای محصولات۴۰،۳۰ و ۵۰ درصد گوشت قرمز بوده است که انتخاب این درصدهای اختلاط آگاهانه با توجه به حداقل درصد گوشت در محصولات گوشتی موجود در بازار و سبد کالای مصرف‌کننده (۳۰-٤۰ درصد گوشت قرمز) بوده‌است. نتایج حاصل از بررسی

نمونه‌های تهیه شده در جدول٤ نمایش داده شده است. بنابراین این توالی‌ها قابلیت شناسایی گونه‌های مورد نظر در محصولات تجاری عرضه شده در بازار را دارد.



شکل ۴- نتایج حاصله از بررسی بهبود دقت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای پرایمرهای اسب

M مارکر ۱۰۰ جفت بازی. نمونه ۱ :۰/۱ نانوگرم DNA گوشت اسب، نمونه ۲ :۰/۰۱ نانوگرم DNA گوشت اسب، نمونه ۳ :۰/۰۰۱ نانوگرم DNA گوشت اسب، نمونه٤ :۰/۰۱ نانوگرم DNA گوشت اسب فرآیند شده در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ دقیقه، نمونه۵ :۰/۰۰۱ نانوگرم DNA گوشت اسب فرآیند شده در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ دقیقه ،NC : کنترل منفی و CH: کنترل مثبت.

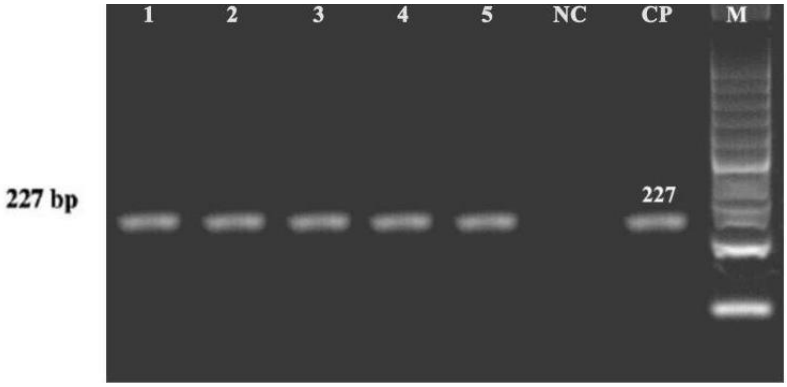


شکل۵- نتایج حاصله از بررسی بهبود دقت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای پرایمرهای الاغ

M مارکر ۱۰۰ جفت بازی. نمونه ۱ :۰/۱ نانوگرم DNA گوشت الاغ، نمونه ۲ :۰/۰۱ نانوگرم DNA گوشت الاغ، نمونه ۳ :۰/۰۰۱ نانوگرم DNA گوشت الاغ، نمونه٤ :۰/۰۱ نانوگرم DNA گوشت الاغ فرآیند شده در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ دقیقه، نمونه۵ :۰/۰۰۱ نانوگرم DNA گوشت الاغ فرآیند شده در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ دقیقه ،NC: کنترل منفی و CD: کنترل مثبت.

پس از بررسی اولیه برنامه انتخابی، میزان دقت روش بهبود داده شد. به این منظور آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مرکب برای ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ نانوگرم از DNA نمونه‌های خام تهیه شده و ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ نانوگرم نمونه‌های فرآیند شده با استفاده از دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ دقیقه انجام گرفت. نتایج مطالعه موفقیت‌آمیز بودن مارکرهای انتخاب شده جهت شناسایی عدم اصالت گوشت مصرفی را در

فراورده‌های خام و فراوری‌شده با دقت حداقلی ۰/۰۰۱ تایید می‌کند که نشان‌دهنده صحت و دقت روش حتی جهت گوشت‌های تیمار شده به علت مقاومت حرارتی DNA در طی فرآیند حرارتی محصول می‌باشد(شکل ٤، ٥ و ٦). بنابراین مشخص گردید که با استفاده از روش کاربردی و بهینه سازی شرایط آزمون به همراه برنامه پیشنهادی میزان دقت روش تا ۰/۰۰۱ نانوگرم بهبود یافت.



شکل ۶- نتایج حاصله از بررسی بهبود دقت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای پرایمرهای خوک

M مارکر ۱۰۰ جفت بازی. نمونه ۱ :۰/۱ نانوگرم DNA گوشت خوک ، نمونه ۲ :۰/۰۱ نانوگرم DNA گوشت خوک ، نمونه ۳ :۰/۰۰۱ نانوگرم DNA گوشت خوک ، نمونه٤ :۰/۰۱ نانوگرم DNA گوشت خوک فرآیند شده در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ دقیقه، نمونه٥ :۰/۰۰۱ نانوگرم DNA گوشت خوک فرآیند شده در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ دقیقه ،NC : کنترل منفی و CP: کنترل مثبت.

در نهایت نمونه‌های تجاری تهیه شده با استفاده از روش پیشنهادی مورد بررسی قرار گرفت. استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مرکب عدم تطابق مواد مندرج در برچسب محصولات با محتوای گوشتی ارائه شده به مصرف‌کننده را در سه شهر اصفهان، تهران و تبریز اثبات می‌نمود. در مجموع ٤۲۰ آزمون برای ۳۵ نمونه مورد بررسی در چهار پرایمر و در سه تکرار برای نمونه‌ها انجام شد. در ۳۵ نمونه انتخاب شده، نهایتا شش مورد تقلب شناسایی شد که چهار مورد مربوط به وجود گوشت اسب و دو مورد مربوط به گوشت الاغ بوده است (شکل ۲) و هیچ موردی از وجود گونه خوک مشاهده نگردید. در هر ۳۵ نمونه باند ۱۰٤ جفت بازی، گونه‌ی گاو/گوسفند نیز تایید شد. در مجموع در ۳۵ نمونه مطالعه شده ٪۱۷ تقلب صورت گرفته که٪۱۱ مربوط به گوشت اسب و ٪٦ مربوط به گوشت الاغ بوده است. اکثر تقلبات در محصولات تجاری گوشتی فراوری شده با درصد پایین گوشت قرمز (سوسیس ٪٤۰ و ۵۰ ٪) بوده که احتمالا با هدف صرفه اقتصادی بیشتر تولیدکننده مشاهده شد. استفاده از گوشت گاو/گوسفند در تمام نمونه‌ها اثبات شد که نشان‌دهنده استفاده از گوشت سایر حیوانات صرفا جهت کاهش هزینه‌های اقتصادی بوده است (جدول۵).

جدول۵-نتایج ۳۵ نمونه تجاری بررسی شده در این مطالعه

شماره	نوع محصول	ویژگی محصول (درصد گوشت قرمز)	جفت توالی پرایمرها			
			bp۱۴۵	bp۱۵۳	bp۲۲۷	bp۱۰۴
۱	سوسیس	٪۴۰ , A:۱	-	+	-	+
۲	سوسیس	٪۵۰, A:۱	+	+	-	+
۳	سوسیس	٪۸۰, A:۱	+	-	-	+
٤	سوسیس	٪۴۰ , A:۲	-	-	-	+
٥	سوسیس	٪۵۰, A:۲	-	-	-	+
٦	سوسیس	٪۸۰, A:۲	-	-	-	+
۷	سوسیس	٪۴۰ , A:۳	-	-	-	+
۸	سوسیس	٪۵۰, A:۳	-	-	-	+
۹	سوسیس	٪۸۰, A:۳	-	-	-	+
۱۰	سوسیس	٪۹۰ , A:۳	-	-	-	+
۱۱	سوسیس	٪۵۰, A:٤	-	-	-	+
۱۲	سوسیس	٪۴۰ , B:۱	-	-	-	+
۱۳	سوسیس	٪۵۰, B:۱	-	-	-	+
۱٤	سوسیس	٪۸۰, B:۱	-	-	-	+
۱۵	همبرگر	B:۱	-	-	-	+
۱٦	سوسیس	٪۴۰ , B:۲	-	-	-	+
۱۷	سوسیس	٪۵۰, B:۲	-	-	-	+
۱۸	سوسیس	٪۸۰, B:۲	-	-	-	+
۱۹	همبرگر	B:۲	-	-	-	+
۲۰	سوسیس	٪۴۰, B:۳	-	-	-	+
۲۱	سوسیس	٪۵۰, B:۳	-	-	-	+
۲۲	سوسیس	٪۸۰, B:۳	-	-	-	+
۲۳	همبرگر	B:۳	-	-	-	+
۲٤	کباب لقمه	B:٤	-	-	-	+
۲۵	سوسیس	٪۴۰ , C:۱	-	-	-	+
۲٦	سوسیس	٪۵۰, C:۱	-	-	-	+
۲۷	سوسیس	٪۸۰, C:۱	-	-	-	+
۲۸	همبرگر	C:۱	-	-	-	+
۲۹	گوشت چرخ کرده	C:۱	-	-	-	+
۳۰	سوسیس	٪۴۰ , C:۲	-	+	-	+
۳۱	سوسیس	٪۵۰, C:۲	-	-	-	+
۳۲	سوسیس	٪۸۰, C:۲	-	+	-	+
۳۳	همبرگر	C:۲	-	-	-	+
۳٤	سوسیس	٪۴۰ , C:۳	-	-	-	+
۳۵	سوسیس	٪۵۰, C:۳	-	-	-	+

A، B و C شهرهای مورد مطالعه به ترتیب تهران، تبریز و اصفهان و ۱، ۲، ۳ و ٤ برندهای انتخاب شده از هر شهر گوشت اسب و الاغ به ترتیب بیشترین نوع تقلب مشاهده شده بودند که در تهران بیشتر از اصفهان و اصفهان بیشتر از تبریز مشاهده شد. در مجموع ٦ تقلب مشاهده شد که چهار مورد اسب و دو مورد الاغ بوده که دو مورد اسب و دو مورد الاغ در تهران و دو مورد اسب در اصفهان و در تبریز تقلبی مشاهده نشد (جدول ٦). از آنجاییکه در نقاطی از کشور که به علت موقعیت جغرافیای و سکونت اقلیت ارمنی‌نشین حضور گوشت خوک از فرضیه‌های طرح پژوهشی به‌شمار می‌آمد، برخلاف تصور در هیچ‌یک از نمونه‌ها گوشت خوک مشاهده نشد. همچنین بیشتر تقلبات در فراورده‌های گوشتی فراوری‌شده (سوسیس) با درصد ٤٠ و ٥٠ مشاهده گردید.

جدول ۶-نمایش فراوانی تقلبات صورت گرفته در ۳ شهر و میزان تقلبات مشاهده شده در هر سه نوع محصول فراوری شده (سوسیس)، نیمه آماده(همبرگر و کباب‌لقمه) و خام (گوشت چرخ‌کرده بسته‌بندی) در بررسی ۴ پرایمر اسب، الاغ، خوک و گاو /گوسفند

شهر	اسب	الاغ	خوک	گاو/گوسفند
تبریز	۰	۰	۰	۳۵
تهران	۲	۲	۰	۳۵
اصفهان	۲	۰	۰	۳۵

دوستی و همکاران (۲۰۱٤) براساس روش تعیین اصالت RFLP-PCR نمونه‌های تجاری گونه‌های گاو، گوسفند، مرغ و اسب/الاغ مورد بررسی قرار گرفت و ۷٪٦ تقلب در کل نمونه‌ها تایید شد. در مطالعه دوستی و همکاران (۲۰۱٤) هر گونه می‌بایست به صورت مجزا در یک آزمون شناسایی شود. اما روش استفاده شده در این مطالعه قابلیت شناسایی چندین گونه را به صورت همزمان دارد. یافته‌های مطالعه دوستی و همکاران تاییدی بریافته‌های این تحقیق مبنی بر وجود تقلب در بازار گوشت البته در مغازه‌های قصابی سطح شهر است.

در مطالعه موسوی و همکاران (۲۰۱۵) ۹۱ نمونه گوشت گوساله و ٥۳ نمونه گوشت مخلوط گاو وگوسفند با روش species-specific –PCR مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها این تحقیق حاکی از ٤۲/۲٪ تقلب در استفاده از گوشت مرغ و ۰/۷٪ گوشت الاغ بود. مزیت این مطالعه نسب به مطالعه موسوی و همکاران بررسی نمونه‌های فراوری شده تجاری و گونه‌ی اسب و خوک علاوه بر توالی‌های گاو، گوسفند و الاغ می‌باشد که این امر شناسایی طیف وسیع‌تری از تقلبات را پوشش می‌دهد.

در مطالعه اولکا و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از روش Real time-PCR نمونه از محصولات گوشتی شامل گوسفند، بوقلمون، مرغ و خوک مورد بررسی قرارگرفت که در چهار نمونه (۱۰٪) وجود گوشت خوک مورد شد. مزیت روش به کار گرفته شده در مطالعه اولکا و همکاران (۲۰۱۳) علاوه براستفاده از گونه‌های بوقلمون و مرغ، تعیین میزان نوع گوشت در نمونه‌ی مورد بررسی می‌باشد. اما علت استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مرکب در این مقاله صرف هزینه کمتر و نیز کفایت مسائل شرعی در اثبات حضور یا عدم حضور گونه مورد بررسی می‌باشد. بنابراین مطالعه حاضر موجب به صرفه بودن انجام ازمون‌های شناسایی نوع گوشت را در موارد گوشت گونه‌های حرام و مکروه در فراورده‌های گوشتی می‌شود.

یعقوب علی و همکاران (۲۰۱۵) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مرکب را جهت تعیین اصالت با دقت ۰/۰۱ تا ۰/۰۲ نانوگرم معرفی کرده‌است. همچنین نتایج پنج گونه غیر شرعی شامل گوشت گربه، خوک، سگ، میمون و

موش را در محصولاتی که تحت عنوان غذای حلال به فروش رسیده در مالایای هند نشان داد. در مطالعه حاضر دقت آزمون تا ۰/۰۰۱ نانوگرم DNA بهبود داده شده است.

در مطالعه‌ی قوتی و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از واکنش زنجیره‌ای مرکب،۱۰ نمونه شامل سوسیس، گوشت یخ زده و گوشت چرخ‌کرده (ground meat)مورد بررسی قرار گرفت که گوشت خوک در هیچ نمونه‌ای یافت نشد. در ٤٠٪ از نمونه‌های سوسیس و ۳۰٪ نمونه‌های گوشت یخ‌زده (cold cut meat) وجود گوشت ماکیان شناسایی شد. مزیت این مطالعه نسبت به مطالعه قوتی و همکاران (۲۰۰۹) استفاده ازگونه‌های اسب و الاغ ، برنامه تکثیر کاربردی، بهبود محدودیت شناسایی روش و تفاوت در توالی تعدادی از گونه‌های مورد ارزیابی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

شرایط بهینه‌سازی‌شده آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، اختصاصی بودن پرایمرهای به کار رفته در این مطالعه را اثبات کرد. همچنین مشاهده باندهای مربوط به نمونه‌های اولیه آماده شده با درصد های معین و همچنین محصولات فراوری شده (سوسیس با سه درصد متفاوت) و نیمه آماده (کباب‌لقمه، همبرگر) و فراورده‌های خام (گوشت چرخ‌کرده بسته‌بندی شده) این مطلب را تایید می‌کرد که تمام مواد و تیمارهای مورد استفاده اثر منفی بر روی تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت شناسایی این گونه‌ها نداشته که به علت پایداری حرارتی DNA نسبت به حرارت (به‌ویژه ژن میتوکندریایی) و حضور تعداد بالای کپی‌های DNA حتی زمانی که محصول تحت فرآیند شدید حرارتی قرار دارد می‌باشد. در این مطالعه قابلیت شناسایی تا ۰/۰۰۱ نانوگرم DNA بهبود داده شد ودر مجموع از ۱۷٪ تقلب صورت گرفته۱۱٪ مربوط به گوشت اسب و ٦٪ مربوط به گوشت الاغ بوده است. اکثر تقلبات در محصولات گوشتی فراوری شده با برچسب گوشت قرمز در سوسیس ٤٠٪ و یا ٥٠٪ بوده است که بیشتر تقلبات در شهر تهران و سپس اصفهان صورت گرفته است. نهایتا یافته‌های این مقاله نشان داد متاسفانه تقلب در گوشت و فراوردهای گوشتی وجود دارد. وجود این امر مختل کننده‌ی سلامت جامعه، مغایر با شرع و اخلاق و برهم زننده اعتماد مردم به نظام تجارت کشور می‌باشد. بنابراین نظارت جدی توسط سازمان‌های ذیربط اجرای استانداردهای تولید نوع گوشت مصرفی بویسله مراکز تجاری تولیدکننده محصولات گوشتی بیشتر از گذشته ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از دانشکده تغذیه و علوم غذایی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان و دانشگاه آزاد شهرکرد که در راستای انجام این طرح ما را یاری نمودند. همچنین تشکر از جناب آقایان مهندس مومنیان و دکتر حسین صادقی که ما را با نظرات و راهنمایی‌هایشان یاری رساندند.

منابع مورد استفاده

هاشم زادگان م، تفویضی ف، حسینی س، بیات م، ۱۳۹۳، بررسی تطابق مواد اولیه اصلی درج شده در برچسب همبرگرهای ممتاز شهر تهران توسط آنالیز مولکولی، نوآوری در علوم و فناوری غذایی،۲۲، ٥٦-٤٩.

پیرانی ن و الیاسی زرین قبایی ق، ۱۳۸۸، میتوکندری برای تشخیص همزمان گوشت گاو، گاومیش، گوسفند و بز به b استفاده از ژن سیتوکروم با روش Mutiplex-PCR، پژوهشهای علوم دامی، ۱۹، ٤١-٤٩.

Amaral JS, Santos CG, Melo VS, Oliveira M. Beatriz PP, Mafra I, 2014. Identification of duck, partridge, pheasant, quail, chicken and turkey meats by species-specific PCR assays to assess the authenticity of traditional game meat Alheira sausages. Food Control 47: 190–195.

Ballin NZ, Vogensen FK, Karlsson AH, 2009. Species determination – Can we detect and quantify meat adulteration. Meat Science 83: 165–174.

Cammà C, Domenico MD, Monaco F, 2012. Development and validation of fast Real-Time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures. Food Control 23(2): 400-404.

Doosti A, Ghasemi Dehkordi P1, Rahimi E, 2014. Molecular assay to fraud identification of meat products. Journal of Food Science and Technology 51(1):148-52.

Eaqub Ali Md, Abdur Razzak Md, Hamid SBA, Rahman MdM, Amina MdA, Rashid NRA, Asing, 2015. Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods, Food Chemistry 177:214–224.

Fernandes T J R, Amaral J S, Oliveira M B P P, Mafra Isabel, 2014. A survey on genetically modified maize in foods commercialised in Portugal, Food Control 35: 338-344.

Ghovvati S, Nassiri MR, Mirhoseini SZ, Heravi Moussavi S, Javadmanesh A, 2009. Fraud identification in industrial meat products by Multiplex PCR assay. Food control 20: 696-699.

Kesmen Z, Gulluce A, Sahin F, Yetim H, 2009. Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. Meat Science 82(4): 444–449.

Kitpipit T, Sittichan K, Thanakiatkrai P, 2014. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. Food Chemistry 163: 77–82.

Montowska M, Pospiech E, 2010. Authenticity Determination of Meat and Meat Products on the Protein and DNA basis. Food Reviews International 27(1): 84-100.

Mousavi S, Jahed Khaniki G, Eskandari S, Rabieib M, Mirab Samiee S, Mehdizadeh, M, 2015. Applicability of species-specific polymerase chain reaction for fraud identification in raw ground meat commercially sold in Iran. Journal of Food Composition and Analysis 40: 47–51.

Saderi M, Saderi AH, Rahimi G, 2013. Identification of bovine, ovine and caprine Pure and binaey mixtures of raw and heat processed meat using specific size markers targeting mitochondrial genome, Iranian Journal of veteninary research, Shiraz University 14: 29-34.

Stamoulis p, Stamatis C, Sarafidou T, Mamuris Z, 2010. Development and application of molecular markers for poultry meat identification in food chain, Food Control 21: 1061–1065.

Teh AHT, Dykes GA, 2014. MEAT SPECIES DETERMINATION, Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition). 265–269.

Ulca P, Balta H, Çağın I, Senyuva H, 2013. Meat species identification and Halal authentication using PCR analysis of raw and cooked traditional Turkish foods. Meat Science 94: 280–284.

Viljoen GJ, Nel L, Crowther J, 2005. MOLECULAR DIAGNOSTIC PCR HANDBOOK. Published by Springer.

Woolfe, M. and S. Primrose, 2004. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. Trends in Biotechnology 22 (5): 222-226.

Identification in meat products authentication

M Alikord[1], H Momtaz[2], Gh Yadegarfar[3], J Keramat[4] and A Homayouni Rad[5*]

Received: August 22, 2016 Accepted: June 7, 2017

[1]MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition and Food Science, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2]Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord-Iran
[3]Associate Professor, Department of Epidemiology and biostatistics, School of Public Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[4]Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
[5]Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition and Food Science, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: Email: homayounia@tbzmed.ac.ir

Abstract

There are different ways to assess the label of meat products with their actual contents. The aim of this study was to compare the authenticity of meat with labels on the product and to assess and improve the accuracy of identification techniques are applied.

Thirty-five meat samples were obtained from three brands of raw meat (minced meat), prepared products (hamburger) and processed meat (sausage) from Isfahan, Tabriz and Tehran. As well as the 30, 40 and 50 percent of the raw meat of any horses, pigs and donkey with cattle/sheep consciously mixed and processed products containing samples 30 and 40 percent of the samples in accordance with the sausage-grinding process. DNA extraction was performed on all samples and then multiplex-PCR was performed. DNA fragments of 153,145,227 and 104 respectively to identify four species of meats (horse, donkey, pig and cattle/sheep), and polymerase chain reaction with the proposed two programs for samples used where the results were evaluated.

Then the accuracy and specificity of primers were evaluated using principle program. Finally valid commercial samples of meat species were tested. Limit of determined to 0/001 ng of DNA was promoted. Of those 35 samples, 6(17%) cases of fraud detected. Among 6 frauds 4(11%) cases were horse meat and 2 (6%) donkey. Most of frauds were in low percentage of meat products (sausage 40% and 50 Findings showed that fraud occurred in meat products. This disturbs public health, religious faith and fair- trade economic. Therefore, Food and Drug Association must watch the application quality control guidelines by meat producers.

Key words: Identification, fraud, Meat, Multiplex-PCR, Species