Archive of SID

بررسی تنوع روش‌های موجود برای تشخیص حلیت در فرآورده‌های ژلاتینی

مریم قبادی دانا[1*]، نرگس کمندی[2]، مهرداد قوامی[2]، امیر محمد مرتضویان[3]

۱- گروه پژوهشی میکروبیولوژی و بیولوژی، پژوهشکده صنایع غذایی و فرآورده‌های کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، کرج، ایران
۲- گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳ –گروه صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله

دریافت مقاله: ۰۰/۸/۸

پذیرش مقاله: ۰۰/۱۰/۴

کلمات کلیدی:

تشخیص تقلب

ژلاتین

شناسایی گونه

فرآورده ژله‌ای

PCR کیفی

چکیده

سابقه و هدف: ژلاتین مورد مصرف صنایع عمدتاً از گونه‌های حیوانی گاو و خوک تهیه می‌شود. گاهی برای کاهش هزینه تمام شده محصول از ماده اولیه نامرغوب یا غیر از آنچه در نشانه‌گذاری محصول عنوان شده است، استفاده می‌شود. این موضوع در مواردی که سلامت مصرف‌کننده به مخاطره بیفتد و یا زمانی که مصرف ماده‌ای خاص با دستورات و عقاید دینی افراد جامعه مغایرت داشته باشد، دارای اهمیت بیشتری است. از این رو توانایی شناسایی، تشخیص و به عبارت جامع‌تر احراز هویت اجزای تشکیل دهنده ماده غذایی با منشأ موجود زنده برای سیستم کنترل بهداشتی کشور از ضروریات است. شناسایی و تشخیص منشأ گونه به کار رفته در ساختار ژلاتین از دیدگاه تأمین اطمینان مصرف‌کننده در مورد ایمنی بهداشتی غذا و نیز عقاید و باورهای مذهبی مورد نیاز می‌باشد.

نتایج: روش‌های متعددی با هدف تعیین گونه موجود در ژلاتین و فرآورده‌های آن از سراسر جهان معرفی شده است که هر کدام دارای مزایا و معایب خاص خود می‌باشند. در این تحقیق سعی شده است روش‌های تحلیلی فیزیکی، شیمیایی و زیستی مورد استفاده برای تشخیص منشأ ژلاتین و احراز هویت محصول حلال مورد بررسی قرار گیرند. روش‌هایی همچون طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، کروماتوگرافی، الایزا (ELISA) و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بدین منظور استفاده شده‌اند. یکی از روش‌هایی که در این زمینه موفق‌تر بوده است و مطالعات مختلفی درباره آن انجام شده است، روش PCR و متدهای توسعه یافته آن می‌باشد که با حساسیت، اختصاصیت، سرعت بالا و هزینه کم قادر به تشخیص، شناسایی و افتراق گونه‌های نزدیک به هم است.

نتیجه‌گیری: روش‌های مبتنی بر DNA از جمله PCR نسبت به بقیه روش‌ها از کارایی بیشتری برخوردار هستند. این روش‌ها در صورت استانداردسازی می‌توانند به‌عنوان روش‌های مطمئن با درصد اطمینان ۹۹٪ ، با حد تشخیص کم (در حدود نانوگرم DNA در گرم نمونه) مورد استفاده قرار گیرند. البته لازم است اختصاصیت، حساسیت، استحکام، تکرارپذیری و تجدیدپذیری روش‌های مبتنی بر DNA مورد بررسی قرار گیرند.

استناد (ونکوور): قبادی دانا م، کمندی ن، قوامی م، مرتضویان الف م. بررسی تنوع روش‌های موجود برای تشخیص حلیت در فرآورده‌های ژلاتینی. مجله پژوهشنامه حلال. پاییز ۱۴۰۰؛۴(۳):۶۰-۷۶.

مقدمه

ژلاتین به‌عنوان پروتئین به‌دست آمده از هیدرولیز جزئی کلاژن به دلیل خصوصیات خاص خود همچون ژل‌سازی، قوام‌دهندگی، پوشش‌دهندگی و منبع پروتئین بدون چربی به‌عنوان یکی از اجزای مهم در ساختار مواد غذایی و دارویی و آرایشی استفاده می‌شود. ژلاتین مورد مصرف در صنایع عمدتاً از گونه‌های حیوانی گاو و خوک تهیه می‌شود. مطابق

* نویسنده مسئول: مریم قبادی دانا، آدرس پست الکترونیکی: dana.m@standard.ac.ir، شماره تماس: ۰۲۶-۳۲۸۰۸۴۱۳

This paper is open access under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license
www.SID.ir
https://doi.org/10.30502/H.2022.312633.1093

Archive of SID

آمار منتشر شده در وبسایت‌های آماری جهان میزان ژلاتین استخراجی از منبع پوست گونه خوک در همه جای دنیا بیش از ژلاتین استخراجی گاوی است، یکی از دلایل این موضوع زمان کوتاه‌تر استخراج ژلاتین از گونه خوک است که منجر به تولید محصول باکیفیت‌تر می‌شود(۱).

شناسایی و تشخیص منشأ گونه به کار رفته در ساختار ژلاتین از دیدگاه تأمین اطمینان مصرف کننده در مورد ایمنی بهداشتی غذا و نیز عقاید و باورهای مذهبی، آلرژی‌های غذایی، بیماری‌های زئونوز[1] و فرهنگ‌های غذایی مورد نیاز می‌باشد. تشخیص اجزا در محصول فرآیند شده یا ترکیبی همیشه آسان نیست و نیاز به آزمون‌های تأییدی برای تشخیص منشأ اصلی فرآورده دارد(۲). بنابراین برای احراز هویت گونه موجود در ماده غذایی نیاز به روش‌های تشخیصی دقیق و قابل اطمینان و قابل اجرا است که باعث ایجاد اطمینان در مصرف‌کننده گردند.

روش‌های جدید تولید در صنایع غذایی با افزودن ترکیبات مختلف همانند نگهدارنده‌ها و امولیسفایرها و سایر افزودنی‌ها به نگهداری طولانی مدت و سالم ماندن غذا و همچنین حفظ کیفیت بافت، مزه، ظاهر و قابلیت پذیرش محصول کمک می‌کند. انواع مختلفی از افزودنی‌ها بسته به ترکیبات موجود در فرآورده و هدف نهایی به طور گسترده در صنعت غذا مورد استفاده قرار می‌گیرند. در صورتی که این مواد اولیه منشأ حیوانی داشته باشند، احتمال اینکه محصول غیر حلال باشند، وجود دارد.

یکی از موارد منع شده در دین اسلام حضور گوشت خوک یا اجزا آن در فرآورده غذایی است. احتمال حضور مشتقات گونه خوک در طیف وسیعی از محصولات غذایی و افزودنی‌های این صنعت همانند انواع ژله‌ها، پاستیل‌ها، دسرها و پودینگ‌های ژله‌ای، بستنی و ماست، ترکیبات طعم‌دهنده، سوپ‌ها و سس‌های پودری حاوی مونوسدیم گلوتامات، امولیسفایرهایی همچون لستین، مونو و دی‌گلیسرید و غیره وجود دارد، اطلاعات نشانه‌گذاری برخی از محصول به صورت کامل و شفاف بیان نشده است و یا حاوی فرمولاسیون بسیار پیچیده و فاش‌نشده می‌باشند.

در کشور ایران مقررات خاصی جهت ذبح بهداشتی و شرعی محصولات دامی داخلی و وارداتی رعایت می‌شود(۳). کنترل‌های لازم جهت واردات دامی و کنترل لاشه گوشت انجام می‌شود. همچنین بازرسی فرآورده‌ها و مشتقات حیوانی که به صورت افزودنی‌های مختلف در فرمولاسیون انواع محصولات غذایی استفاده می‌شوند، صورت می‌گیرد.

همچنین با در نظر گرفتن بازار تجارت جهانی محصولات حلال، در بسیاری از کشورهای اسلامی که علاقمند به مصرف محصولات حلال می‌باشند، ساز و کار کنترلی همانند کشور ما جهت رعایت شرایط بهداشتی و شرعی ذبح وجود ندارد و نیاز به سیستم بازرسی و تأییدی محصول نهایی می‌باشد. شناسایی گونه از این دیدگاه دارای اهمیت است که گروه‌های قومی یا مذهبی می‌توانند انتخاب درستی در مورد غذاهای حلال، کوشر[2] و گوشت گاو که برای هندوها ممنوع است، داشته باشند(۴).

از آنجا که تقلب در مواد غذایی می‌تواند عواقب جدی بر سلامت انسان داشته باشد، در نتیجه بر بازار فروش تأثیر گذاشته و اعتماد مشتری را از بین می‌برد(۵-۶). بنابراین باید گونه حیوانی که در تولید فرآورده استفاده شده معین شود و برچسب‌گذاری آن به صورت واضح بیان گردد و نیاز است که محتوای برچسب‌گذاری با محتوای نمونه مطابق باشد و راستی‌آزمایی شود. در بیشتر موارد تشخیص همه اجزای فرآورده غذایی از روی برچسب آن به سختی امکان‌پذیر است.

از طرف دیگر برای تشخیص تقلب‌های جدید استفاده از روش‌های مدرن ضروری به نظر می‌رسد. در میان روش‌های مدرن تشخیصی، تکنیک‌های بر پایه آنالیز اسیدهای نوکلئیک به ویژه روش PCR بسیار اهمیت دارند و به دلیل داشتن قدرت بالا در افتراق بین گونه‌های مختلف، می‌توانند در غذاهای پخته و فرآیند شده مورد استفاده قرار گیرند.

[1] Zoonosis

[2] Kosher

www.SID.ir

Archive of SID

ژلاتین

ژلاتین بیوپلیمر پروتئینی زرد متمایل به قهوه‌ای، و تقریباً بی‌بو و بی‌مزه است(۷)، که محصول هیدرولیز جزئی اسیدی، قلیایی و آنزیمی کلاژن حاصل از پوست، بافت همبند و استخوان حیوانات می‌باشد(۸). کلاژن یکی از فراوان‌ترین پروتئین‌های موجود در بافت حیوانات است و تقریباً یک سوم پروتئین‌های بدن پستانداران (۳۰ درصد) را تشکیل می‌دهد. عملکرد اصلی آن ایجاد مقاومت مکانیکی برای بافت‌ها و اندام‌های مختلف به‌عنوان پروتئین خارج سلولی است(۸). تبدیل کلاژن به ژلاتین یک تغییر شکل الزامی در ساخت ژلاتین است. فرآیند معمولی تولید ژلاتین را می‌توان به سه مرحله تقسیم کرد: پیش تصفیه اسیدی یا قلیایی مواد اولیه، استخراج حرارتی ژلاتین و تصفیه نهایی(۹). علاوه بر اهمیت منبع کلاژن برای تولید ژلاتین، روش و فرآیند تولید نیز بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و کارکردی ژلاتین موثر است(۱۰). در مورد تولید ژلاتین فرآیند اسیدی برای پوست خوک یا ماهی استفاده می‌گردد، که منجر به تولید ژلاتین نوع A و فرآیند قلیایی برای استخوان گاو و گوسفند و کلاژن با اتصالات پیچیده‌تر به کار می‌رود، که ژلاتین نوع B به دست می‌آید(۱۱). اهمیت ژلاتین توانایی تشکیل ژل برگشت‌پذیر است(۱۲). ژلاتین در هنگام خنک شدن ژل تشکیل می‌دهد و در حین گرم شدن به مایع تبدیل می‌شود. کیفیت ژلاتین معمولاً با استحکام ژل یا «بلوم»[3] اندازه‌گیری می‌شود، ژل قوی‌تر با نقطه ذوب و نقطه ژلی بالاتر است(۸).

کاربرد ژلاتین در صنعت غذا

ژلاتین خوراکی برای اولین بار در دسر ژلاتین توسط پیتر کوپر در سال ۱۸۴۵ در ایالات متحده به کار برده شد. در صنایع غذایی به‌عنوان ژل‌ساز، کلوئید محافظت‌کننده و تقویت‌کننده بافت، اتصال‌دهنده، شفاف‌کننده، تشکیل‌دهنده فیلم، امولسیفایر، قوام دهنده و نگهدارنده در محصولاتی همچون ماست (۰/۳ تا ۰/۵ درصد)، بستنی، شیرینی(۲ تا ۳ درصد)، آبنبات، مارمالاد، دسرهای آماده(۷ تا ۹ درصد)، مارشمالو(۱/۷ تا ۲/۵ درصد)، آدامس(۷ تا ۹ درصد) مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین در محصولات لبنی(۰/۲ تا ۱ درصد) و فرآورده‌های گوشتی(۱ تا ۵ درصد) و غذاهای منجمد(۰/۱ تا ۰/۵ درصد) به‌عنوان کلوئید محافظ عمل می‌کند(۸). کاربردهای اصلی ژلاتین در مواد غذایی در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱. کاربردهای اصلی ژلاتین در مواد غذایی(۱۱).

گروه مواد غذایی	کاربرد	فرآورده
گوشت	اتصال‌دهنده پوشش‌دهنده درخشان‌کننده	گوشت، گوشت کنسروشده و سوسیس
نان و محصولات قنادی	پایدارکننده اتصال‌دهنده عامل ژل‌ساز امولسیفایر بهبوددهنده الاستیسیتی خمیر و قابلیت جویدن پوشش‌دهنده	کیک، موس، کرم‌های پرکننده، مارشمالو، آدامس، تافی و شکلات
لبنیات	پایدارکننده امولسیفایر بهبوددهنده بافت اتصال با آب	ماست، خامه، باترمیلک، مارگارین و پنیر
نوشابه و آبمیوه	روشن‌کننده	انواع نوشابه‌ها، آبمیوه و سرکه

[3] Bloom

www.SID.ir

Archive of SID

دسرها	پایدارکننده عامل ژل‌ساز پوشش‌دهنده	پودینگ، شربت، بستنی، شیر یخزده و سس گریوی

منابع تولید ژلاتین

منابع تولید ژلاتین عمدتاً از پوست، استخوان و دیگر بافت‌های گونه‌هایی مانند گاو (Bos taurus)، خوک (Sus scrofa) به دست می‌آید(۱۳). همچنین از منابع دیگر مانند مرغ و موجودات آبزی از قبیل ماهی و جلبک دریایی و حشرات و مخمر نیز استحصال شده است. مطالعات زیادی روی سایر منابع جایگزین برای تولید ژلاتین انجام گردیده است. در مقایسه با ژلاتین حاصل از ماهی، ژلاتین با منبع گاوی یا خوکی دارای استحکام ژلی بالاتر، خصوصیات فیزیکوشیمیایی بهتر و نقطه ذوب بالاتر است(۱۴). همچنین احتمال آلرژی‌زایی کمتر و خصوصیات رئولوژیکی قوی‌تری نسبت به ژلاتین ماهی دارد(۹).

بیشترین ژلاتین تولیدی در دنیا به دلایل قدرت ژلی بیشتر، مقاومت در برابر استرس، توانایی نگهداشتن آب، نقطه ذوب بالاتر، تولید در زمان کوتاه‌تر و ارزان‌تر وآسان‌تر بودن، از منبع خوکی تأمین می‌شود. همچنین بروز جنون گاوی[4] (BSE) باعث محدودیت استحصال ژلاتین از منبع گاوی شده است. با توجه به نگرانی‌هایی که در بین مصرف‌کنندگان از لحاظ بهداشتی و باورهای دینی وجود دارد، نیاز است روش قابل اعتماد و مطمئنی برای تشخیص منبع گونه مورد استفاده در محصولات حاوی ژلاتین وجود داشته باشد.

انواع روش‌های بررسی منشأ گونه

شناسایی و تشخیص اجزا فرآورده به آسانی ممکن نیست. برای شناسایی منشأ گونه به کار رفته در گوشت و فرآورده‌های گوشتی از روش‌های میکروسکوپی مانند هیستو تکنیک(۱۵)، روش‌های مبتنی بر شناسایی چربی(۱۶)، پروتئین یا DNA استفاده شده است. اما تعیین منشأ ژلاتین به ویژه به دلیل شباهت در توالی اسیدهای آمینه در انواع کلاژن در گونه‌های مختلف چالش برانگیز است(۷). از سوی دیگر ژلاتین در فرآیند تولید مراحل مختلفی شامل هیدرولیز، استریلیزاسیون و خشک کردن را می‌گذراند و این موضوع احتمال تخریب ساختار ماده را بالا می‌برد. از این رو محققان توجه بیشتری به توسعه تکنیک‌های دقیق‌تر و پیشرفته‌تر روی آوردند. بسیاری از روش‌های به کار گرفته شده در رسیدن به نتیجه مطلوب ناموفق بودند. به‌عنوان مثال تکنیک ترسیب شیمیایی[5] روش مناسبی جهت تشخیص منبع ژلاتین نمی‌باشد، روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا[6] (HPLC) نیز محدودیت‌هایی در تشخیص هویت در ماتریکس‌های پیچیده دارد(۱۷). روش الایزا[7] (ELISA) نیز به دلیل همسانی در ساختار کلاژن حیوانات مختلف از حساسیت کمتری جهت افتراق ژلاتین با منشأ مختلف دارد(۱۸). برخی از روش‌های استفاده شده در این دانش و محدودیت آنها به طور خلاصه در اینجا ارائه شده است(جدول ۲).

طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)[8]

تکنیک‌های طیف سنجی دارای پتانسیل تفکیک منابع مختلف ژلاتین بر اساس تفاوت طیف‌های خود می‌باشد. این توانایی بر اساس انگشت نگاری زیست مولکولی ترکیبات مختلف بسته به نوع مولکول، ساختار و ترکیب آن ها است. اغلب برای تمایز ژلاتین‌ها در FTIR از ناحیه نور مادون قرمز (IR) چون حاوی اطلاعاتی در مورد ترکیب شیمیایی برخی از مواد خاص است، استفاده می‌شود(۱۷). روش طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز قادر به جمع‌آوری داده‌های با وضوح طیف بالا است. این روش سریع، غیرتهاجمی و دقیق می‌باشد(۱۷). از آنجایی که نمونه مستقیماً مورد تجزیه و

[4] Bovine Spongiform Encephalopathy
[5] Chemical Precipitation
[6] High Performance Liquid Chromatography
[7] Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
[8] Fourier-Transform Infrared Spectroscopy

www.SID.ir

Archive of SID

تحلیل قرار می‌گیرد، زمان آماده‌سازی کوتاه است. استفاده از تجهیزات آن آسان است. به معرف و حلال کمی نیاز دارد(۷). حد تشخیص روش در مقایسه با سایر روش‌های فیزیکوشیمیایی بهتر می‌باشد. برای تفسیر نتایج به دست آمده از این روش از آنجایی که طیف‌ها پیچیده هستند، نیاز به تحلیل با روش‌های مدرن آماری مانند تحلیل مؤلفه‌های اصلی[۹] (PCA) یا تحلیل خوشه‌بندی سلسله مراتبی[۱۰] (HCA) است و در این صورت حد تشخیص روش تا ۰/۵ درصد می‌باشد(۱۹). این روش نیاز به نمونه بسیار خالص دارد (۱۸). هاشم و همکاران (۲۰۱۰) روش FTIR را همراه با PCA برای تمایز ژلاتین‌های گاو و خوک استفاده کردند(۲۰). همچنین سبی و همکاران (۲۰۱۹) آب نبات‌های ژله‌ای را بر اساس منشأ ژلاتین با روش FTIR طبقه بندی کردند(۲۱).

روش‌های کروماتوگرافی

از روش‌های کروماتوگرافی مایع[۱۱](LC) و کروماتوگرافی مایع معکوس[۱۲](RP-LC) و HPLC برای تشخیص منشأ ژلاتین استفاده شده است. ژانگ و همکاران (۲۰۰۸) HPLC را به همراه طیف سنجی جرمی[۱۳] برای شناسایی پپتید مارکرها در توالی کلاژن گونه‌های مختلف جانوری در نمونه‌های ژلاتین هضم شده، به کار گرفتند. بنابراین روش HPLC دارای توانایی تشخیص منشأ گونه در ژلاتین است و این روش باید با استفاده از سایر آشکارسازها مانند اسپکتروسکپی جرمی(۲۲)، یا آشکارساز فلورسنت برای تمایز مورد مطالعه قرار گیرد.

جدول ۲. روش‌های مطالعه شده برای سنجش منشأ گونه موجود در فرآورده‌های ژلاتینی.

روش	مبنای روش	مزایا	معایب	مرجع
ترسیب شیمیایی	تفاوت در زمان ترسیب شیمیایی با رسوب دهنده‌ها	توانایی تشخیص در محلول‌های خالص	عدم توانایی تشخیص در ماتریس پیچیده مواد غذایی	(۲۳)
اسپکتروسکوپی FTIR	تشخیص گروه‌های عملکردی متفاوت حاضر در ژلاتین از نظر تعداد موج وشدت	ساده و سریع، وضوح طیف بالا	به نمونه با خلوص بالا احتیاج است. ماتریس‌های متفاوت نیاز به بهینه‌سازی دارند.	(۲۰) و (۲۱)
HPLC	جداسازی بر اساس قطبیت	برای تشخیص نوع ژلاتین بر مبنای اسیدهای آمینه اصلی و پپتدهای نشانگر مناسب است.	به دلیل مشابهت ساختار شیمیایی قادر به افتراق در همه محلول‌های ژلاتینی نیست. نیاز به تجهیزات گران قیمت دارد.	(۲۲)
SDS-PAGE	تشخیص انواع ژلاتین برمبنای اسیدهای آمینه گلیسین، آرژنین و پرولین	ابزاری مناسب برای تمایز گونه‌های خاص نمونه‌های مخلوط و فرآیند شده	وقت گیر و هزینه‌بر است. در مورد نمونه‌هایی که از منابع نزدیک به هم استحصال شده‌اند، کارایی کمی دارد. نیاز به تکنسین ماهر برای بررسی نمونه‌های مختلط از چندین گونه مناسب نیست.	(۲۴)
ELISA	بر مبنای واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی	توانایی تمایز و افتراق انواع ژلاتین	به دلیل همسانی در توالی کلاژن گاهی حساسیت ضعیفی دارد.	(۱۸)
PCR	تشخیص منشأ ژلاتین با کمک species-specificprimers	توانایی تمایز و افتراق انواع ژلاتین با حساسیت و اختصاصیت بالا	احتمال آلودگی نمونه به دلیل حساسیت بالای روش نیاز به تکنسین ماهر	(۲۵)

[9] Principle Component Analysis
[10] Hierarchical Cluster Analysis
[11] Liquid Chromatography
[12] Reversed-Liquid Chromatography
[13] Mass Spectrometry

www.SID.ir

Archive of SID

سایر روش‌های کروماتوگرافی به کار رفته در زمینه ژلاتین شامل کروماتوگرافی مایع طیف سنج جرمی متوالی [14] (LC-MS/MS)، کروماتوگرافی مایع با کارایی فوق‌العاده بالا همراه با طیف سنجی یونیزاسیون[15] (۲۶)، تکنیک جذب و یونش لیزری بوسیله ماتریکس یا طیف سنج مالدی-تاف [16] (Malditof) همراه با طیف سنجی جرمی یونیزاسیون به روش الکترواسپری [17] (Esi-Lc-MS/MS) (۲۷)، است. از محدودیت‌های این روش علاوه بر تجهیزات گران قیمت، عدم توانایی روش در تشخیص ماتریکس‌های پیچیده به دلیل نزدیک بودن خصوصیات شیمیایی ترکیبات است.

روش‌های مبتنی برآنالیز پروتئین با الکتروفورز

با استفاده از روش‌های همانند متمرکزسازی ایزوالکتریک [18] (IEF)، الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید [19] (SDS-PAGE)، الکتروفورز دو بعدی [20] و تکنیک‌های پروتئومیکس، می‌توانند از طریق پروفایل پروتئین‌های ماهیچه، گونه مورد انتظار را تشخیص دهند. در مورد ژلاتین سنجش سه اسید آمینه آرژنین، گلایسین و پرولین که ترکیب آن ها در گونه‌های گاو و خوک متفاوت است، عامل تمایز می‌باشد(۱۷). از روش SDS-PAGE برای شناسایی منشأ گونه موجود در کپسول‌های ژلاتینی با کمک ۷/۵ درصد از پلی‌آکریل آمید استفاده شده است(۲۴). در تحقیقی که توسط آینا و همکاران انجام شد، بیومارکرهای پلی‌پپتیدی موجود در ژلاتین حاصل از پوست خوک توسط روش الکتروفورز دو بعدی سنجش شد. در این تحقیق ابتدا تکنیک الکتروفورز IEF و سپس الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید SDS-PAGE انجام شد و سپس نقاط پروتئینی حاصل بر روی صفحه مورد آنالیز قرار گرفتند(۲۸). یکی از چالش‌ها در طی انجام این تکنیک آماده‌سازی نمونه است که مرحله مشکلی می‌باشد. تکنیک‌های الکتروفورز و پروتئومیکس گران هستند، برای انجام آن به تکنسین‌های ماهر نیاز است و برای بررسی نمونه‌های مختلط از چندین گونه مناسب نیست(۲۹). برای افتراق گونه‌های نزدیک به هم کارایی ضعیفی دارند و زمان انجام تکنیک طولانی است(۱۷).

روش‌های مبتنی بر واکنش‌های ایمونولوژیک

در بین روش‌های مبتنی بر واکنش‌های ایمونولوژیک، روش ELISA بیشترین کاربرد را در شناسایی منشأ مواد غذایی دارد. این روش بر پایه واکنش‌های آنتی ژن-آنتی‌بادی شکل گرفته است. دو نوع پرکاربرد ELISA برای تأیید مواد غذایی، ELISA غیرمستقیم رقابتی و ساندویچ است. برای شناسایی ژلاتین گاوی و خوکی روش ELISA غیرمستقیم رقابتی با استفاده از آنتی بادی آنتی پپتید پلی‌کلونال انجام شده است(۱۸). روش ELISA در زمان کوتاه‌تر و با کاربری آسان‌تری انجام می‌شود. اما حد تشخیص آن نسبتاً بالا است. همچنین زمانی که نمونه هدف بسیار فرآیند شده است، روش کارایی زیادی ندارد(۳۰). از دیگر محدودیت‌های روش ELISA این است که آنتی بادی گران‌قیمت و تهیه آن مشکل می‌باشد. احتمال بی‌ثباتی آنتی بادی در صورتی که فرآورده تحت فرآیند حرارتی و فشار قرار گرفته باشد، وجود دارد. تحقیقات نشان داده‌اند که احتمال وجود نتایج مثبت و منفی کاذب در تست ELISA نسبت به تست PCR بیشتر است(۳۱).

علاوه بر این، ایمونواسی اغلب به دلیل بروز واکنش متقاطع بین گونه‌های نزدیک به هم دچار اشکال می‌شود، زیرا این تکنیک بر پایه تولید آنتی بادی بر علیه یک پروتئین خاص استوار است(۳۲). ELISA در مقایسه با سایر

[14] Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry
[15] Ultra-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry
[16] Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
[17] Electrospray Ionization Mass Spectrometry
[18] Isoelectric Focusing
[19] Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
[20] Two Dimmensional Electrophesis

www.SID.ir

Archive of SID

روش‌های مبتنی بر پروتئین ارزان‌تر و دقیق‌تر و حساس‌تر است ولی در مقایسه با روش‌های مبتنی بر DNA، روش گران‌قیمت و نامطمئنی است(۱۷).

آنالیز بر مبنای DNA

در ده سال اخیر، روش‌های مبتنی بر DNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و روش‌های توسعه یافته مربوط به آن مانند ریل تایم بر مبنای تک من پروب[۲۱] جهت آنالیز ژلاتین به دلیل اختصاصیت، حساسیت، دقت، استحکام، سرعت و ارزان بودن بیش از سایر روش‌ها گزارش گردیده و به صورت گسترده‌تر در سراسر دنیا استفاده شده است(۷).

در روش PCR معمولی [۲۲]، قسمتی ازDNA که به‌عنوان نشانگر زیستی[۲۳] تعیین شده به تعداد بسیار زیاد[۲۴] تکثیر می‌شود(۲). برای انجام آزمون PCR ابتدا DNA از نمونه مورد نظر با روش مناسب استخراج می‌شود. بعد از تخلیص DNA با استفاده از روش‌های مختلف، غلظت DNA توسط بررسی کیفی (الکتروفورز) یا بررسی کمی (اسپکتوفوتومتری) تعیین می‌گردد. پس از تهیه مواد اولیه آزمون PCR، مرحله عملیات بهینه‌سازی بر حسب اجزای PCR انجام می‌گیرد و شرایط زمانی، دمایی و تعداد سیکل مشخص می‌گردد. عملیات در دستگاه ترموسایکلر به منظور تکثیر مقادیر زیادی از DNA هدف انجام می‌شود. کل واکنش در طی سه مرحله اصلی انجام می‌شود: الف) واسرشت شدن یا دناتوراسیون[۲۵]، در این مرحله به علت گسستن پیوندهای هیدروژنی بین نوکلئوتیدها DNA الگو و پرایمرها از هم جدا می‌شوند و تک رشته‌های DNA حاصل می‌گردد. ب) اتصال پرایمر یا آنیلینگ[۲۶] در این مرحله اتصال پرایمرها به نواحی مکمل روی DNA و تعیین محدوده تکثیر قطعه انجام می‌شود. دمای نامناسب مرحله آنیلینگ باعث مهار فعل و انفعالات پرایمر می‌شود، بنابراین نیاز است که دما در این مرحله بهینه سازی شود(۳۳). توسعه یا طویل شدن[۲۷]، که همانندسازی DNA آغاز می‌شود و رشته DNA جدید در جهت ۵ به۳ و در مقابل رشته‌های الگو ساخته می‌شود؛ این سیکل به دفعات انتخاب شده انجام می‌شود. در پایان هر سیکل تعداد کپی‌های DNA دو برابر می‌شود تا در نتیجه مقدار زیادی از DNA در طی ۳۰ تا ۴۰ سیکل تولید شود؛ سپس محصولات تکثیر شده بر ژل آگارز و یا پلی‌اکریل‌آمید، الکتروفورز می‌شوند.

برای طراحی پرایمرهای اختصاصی گونه، از ژن‌های حفاظت شده[۲۸] استفاده می‌شود. نکته اصلی برای تشخیص موفقیت‌آمیز یک گونه توسط PCR، انتخاب نشانگرهای[۲۹] ژنتیکی مناسب برای انجام عملیات می‌باشد(۳۲). نشانگر مولکولی، یک ژن یا بخشی از توالی DNA است که در زیست‌شناسی مولکولی و زیست‌فناوری برای شناسایی یک توالی مشخص از DNA استفاده می‌شوند. قطعاتی از DNA که مستعد انتخاب به‌عنوان نشانگر هستند، توانایی تمایز گونه با وجود قطعات کوچک DNA را داشته باشند. نشانگرهای مختلفی شامل نواحی ژن D-loop(۱۹)، 12S rRNA(۳۴)، 16S rRNA(۳۵)، سیتوکروم C اکسیداز زیر واحد I (COI)[۳۰](۳۲)، و سیتوکروم b میتوکندریایی(۱۹)، برای طراحی پرایمر استفاده شده است. برای عملیات تشخیصی گونه‌های مختلف مانند ماهی، پرندگان اهلی و وحشی، حیوانات اهلی و به خصوص خوک، معمولاً از DNA ژنومی یا میتوکندریایی[۳۱] استفاده می‌شود(۲). DNA میتوکندریایی انتخاب بهتری است، زیرا: الف) تقریباً ۱۰۴ کپی از DNA میتوکندریایی در مقایسه با یک کپی از DNA ژنومی در هر سلول وجود دارد، بنابراین تنوع زیاد ژن mtDNA اجازه شناسایی دقیق DNA خوک را می‌دهد(۳۶). ب)استفاده از mtDNA حساسیت تکثیر با PCR را افزایش می‌دهد. ج) تکامل سریع‌تر نسبت به ژن‌های هسته‌ای دارد، در نتیجه آن

[21] Taqman Probe Real-Time
[22] Conventional PCR
[23] Biomarker
[24] Multiplecopies
[25] Denaturation
[26] Annealing
[27] Extension/Elongation
[28] Conservative
[29] Markers
[30] Cytochrome C Oxidase Subunit I
[31] Mitochondrial DNA (Mtdnaor Mdna)

www.SID.ir

Archive of SID

حاوی توالی متنوعی است که تسهیل‌کننده شناسایی گونه‌های وابسته فیلوژنتیکی است(۳۲). د) همچنین دارای مقاومت بیشتر به تخریب بافتی است چون به تعداد زیاد (۱۰۰۰-۸۰۰) است و با دو غشا حمایت شده است(۳۷). میتوکندری برخلاف سایر اندامک‌های سلولی دارای دو غشای بیرون و درونی است، که غشای بیرونی صاف و غشای درونی دارای چین خوردگی (crista) است. وجود این نوع غشا در میتوکندری باعث ایجاد مناطق و فضاهایی درون این اندامک می‌شود که هر کدام از این فضاها، محل انجام عملکردهای مهمی در سلول هستند، همچنین نقش حفاظتی برای اجزای داخل آن را دارد. ه) mtDNA دارای تنوع درون گونه‌ای بیشتر است(۳۸). بنابراین استفاده از DNA میتوکندریایی در بررسی‌های DNA اختصاصی گونه مؤثرتر است.

انواع مختلفی از روش‌های PCR مورد بررسی قرار گرفته است. برخی از روش‌های PCR که جهت شناسایی منشأ ژلاتین نیز استفاده شده‌اند، عبارتند از:

روش PCR اختصاصی یا SPECIES-SPECIFIC PCR

در این روش در یک واکنش شناسایی گونه‌های منفرد انجام می‌شود. PCR اختصاصی به دلیل حساسیت، دقت، صحت و استحکام روش مناسبی برای تشخیص گونه‌های مختلف با آمپلیکون‌های هدف مختلف شناخته شده است. لی و همکاران در سال ۲۰۱۶ از روش PCR اختصاصی گونه برای تمایز بین ژلاتین گاو، خوک، ماهی و گیاهان در پوسته‌های کپسول دارویی استفاده کردند. آن ها جفت پرایمرهای اختصاصی گونه برای ماهی تیلاپیا، گاو، خوک و یک جفت پرایمر عمومی برای گونه‌های ماهی با هدف‌گیری ژن میتوکندریایی 16s rRNA طراحی کردند. کمترین حد تشخیص برای تیلاپیا، گاو و خوک به ترتیب۰/۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۱ نانوگرم در میکرولیتر بود(۳۹). شعبانی و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که تکنیک PCR اختصاصی گونه برای اعتبارسنجی منبع ژلاتین از ۸ فرآورده غذایی (۲ مارشمالو، ۲ دسر، ۲ ژله و ۲ کیک) و هشت کپسول ژلاتینی با برچسب حاوی ژلاتین گاوی موفق می‌باشد. در این پژوهش پرایمری از ناحیه ژن سیتوکروم b میتوکندریایی با اندازه آمپلیکون ۲۱۲ جفت باز برای گونه خوک و ۲۷۱ جفت باز برای گونه گاو برای ارزیابی صحت برچسب حلال محصولات حاوی ژلاتین از مطالعات قبلی انتخاب شد. در نمونه‌های مورد بررسی DNA گونه خوک شناسایی نشد و کلیه فرآورده‌ها حاوی ژلاتین گاوی بودند(۴۰).

روش PCR چندگانه یا Multiplex PCR

PCR چندگانه فناوری بسیار مفیدی برای تشخیص چند هدف در یک زمان و در یک واکنش است، که باعث کاهش زمان و هزینه می‌شود. این روش امکان تشخیص DNA چند گونه همراه با پرایمر هر کدام از گونه‌ها را در طی یک واکنش PCR فراهم می‌کند. سلطانا و همکاران (۲۰۱۸) برای افتراق بین ژلاتین حاصل از گونه گاو، خوک، یوکاریوت و ماهی درمحصولات قنادی از روش مالتی‌پلکس PCR استفاده کردند. از بین ۳۸ نمونه انتخابی با برند حلال شامل آدامس، مارشمالو، پاستیل و آب‌نبات، ۳۳ نمونه حاوی ژلاتین گونه گاو بودند. بقیه نمونه‌ها حاوی ژلاتین حاصل از خوک و یوکاریوت بودند(۴۱). نیکزاد و همکاران (۲۰۱۷) روی ۲۴ کپسول ژلاتینی آزمون Duplex PCR اختصاصی گونه با پرایمر ۱۴۹ جفت بازی برای گونه خوک و پرایمر ۲۷۱ جفت بازی برای گونه گاو انجام دادند. میزان LOD گزارش شده تا ۱ درصد DNA گونه خوک بود. نتیجه نهایی نشان داد ۵۰ درصد از نمونه‌ها هم به صورت ژلاتین خالص خوک و هم به صورت ترکیب با ژلاتین گاو از ژلاتین خوک و غیر حلال بودند(۴۲).

روش Real-Time PCR

تکنیک Real-time PCR جهت تکثیر DNA و تعیین مقدار کمی آن به صورت همزمان، به کار می‌رود. این عمل باعث شناسایی توالی های اختصاصی DNA و تعیین مقدار آن در یک نمونه می‌شود. روش Real-time PCR امکان

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی مقادیر بسیار کم از گونه‌های مختلف را در ترکیبات پیچیده فراهم می‌کند(۳۲). از خصوصیات این روش آن است که محصول تکثیر شده در هر مرحله و هر زمان قابل پایش و بررسی است. نتایج حاصل از آن در همان مرحله ابتدایی واکنش به صورت کمی ارائه می‌شود و در مقایسه با روش‌های دیگر PCR که به طور معمول همراه با الکتروفورز ژل آگارز یا پلی‌آکریل‌آمید هستند، دقیق‌تر است(۳۲)، و خطر آلودگی را کاهش می‌دهد. از دیگر مزایای این روش آن است که روند PCR، عدم تکثیر و شروع فاز سکون کاملاً مشخص است و کاربر می‌تواند جهت جلوگیری از اتلاف وقت و انرژی در هر زمان که تشخیص داد، واکنش را پایان دهد. واکنش‌ها در زمان سریع‌تر انجام می‌شود و محدوده تشخیص آن بیش از PCR معمولی است. Real-time PCR با روش‌های مختلف بر مبنای پروب [۳۲] انجام می‌شود، که شامل پروب‌های هیدرولیزی مانند TaqMan، پروب‌های سنجاق سری [۳۳] مانند پروب بیکنز[۳۴]، پروب‌های ترکیبی با برچسب فلورسنت و رنگ‌های متقاطع DNA هستند(۳۲). همچنین روش‌های ساده‌تر و ارزان‌تر دیگر استفاده از رنگ‌های ردیابی SYBR green و green Eva می‌باشد. این رنگ‌ها به شیارهای کوچک DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود و دارای ویژگی فلورسنتی می‌باشند. استفاده از Real-time PCR مشکلاتی نیز به همراه دارد، از جمله این که راه‌اندازی آن‌ها سخت‌تر از PCR استاندارد است. پرایمرها و پروب‌های مخصوص روش Real-time PCR نیاز به طراحی دارند و همیشه در دسترس نیستند و نیز گران قیمت می‌باشند(۳۲). تاسارا و همکاران در سال ۲۰۰۵، برای تشخیص و تمایز ژلاتین گاو، خوک و ماهی از روش PCR اختصاصی گونه معمولی[۳۵] و روش qPCR استفاده کردند، که حد تشخیص در روش PCR کیفی ۰/۱ درصد از گونه گاو در مخلوط گاو و خوک و ۰/۵٪ در مخلوط گاو و ماهی گزارش شد و حساسیت روش qPCR ۰/۱ تا ۰/۰۰۱ درصد بود(۴۳). دمیران و همکاران در سال ۲۰۱۲، از تکنیک‌های Real-time PCR و پرایمرهای اختصاصی گونه خوک بر مبنای ژن سیتوکروم b کپی چندگانه و پروب برای تأیید اعتبار منبع ژلاتین در مارشمالو، راحت‌الحلقوم و لوکوم استفاده کردند. در طی تحقیق به این نتیجه رسیدند که دو محصول از ۱۴ محصول تولیدی کشور آلمان و ۱ نمونه از ۲۹ محصول تولیدی کشور ترکیه از بین نمونه‌ها، حاوی ژلاتین خوکی می‌باشد. حد تشخیص گزارش شده ۱٪ وزنی/وزنی بود(۲۵). سودجادی و همکاران در سال ۲۰۱۶، با تکنیک Real Time-PCR و رنگ فلورسنت SYBR Green I و با هدف طراحی پرایمر D-loop پوسته کپسول دارویی را از نظر منشأ ژلاتین موجود در آن بررسی کردند؛ بدین منظور دو پرایمر اختصاصی از ناحیه D-loop طراحی شد. برای تست اختصاصیت، از منابع ژلاتینی خوک، گاو و گربه‌ماهی و همچنین بافت تازه خوک، گاو، بز، مرغ و موش استفاده شد. برای تست حساسیت، شش سری رقت(۱۰۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۱۰، ۵ و ۱ pg/µl) استفاده شد. از بین دو سری پرایمر موجود تنها پرایمر ۱۰۸ جفت بازی قادر به تشخیص گونه خوک در مخلوط ژلاتینی و بافت تازه بود. حد تشخیص روش در محصولات ژلاتینه و کپسول ژلاتینی ۵ پیکو گرم بیان شد(۴۴). کانگ و همکاران در سال ۲۰۱۸، پرایمرهای مختلف حاصل از DNA میتوکندریایی با محل‌های هدف D-loop، ATP8، ND5 و 12S rRNA را مورد مقایسه از لحاظ توانایی سنجش منشأ ژلاتین با روش Real-time PCR بر مبنای SYBR green قرار دادند. همه توالی‌ها به جز توالی با ژن هدف 12S rRNA اختصاصیت بالا داشتند و در نتیجه در تشخیص گونه خوک موفق بودند. همچنین بیان شد که با مقایسه نتایج Real-time PCR و تعیین میزان LOD از نقطه نظر کیفی، نقاط هدف D-loop و ND5 دارای حد تشخیص ۰/۰۱ و حد تشخیص ATP8، پنج مرتبه بیشتر از آن ها است و سیستم ردیابی با منطقه هدف D-loop کاراترین و برترین انتخاب نسبت به سایر پرایمرها است و می‌تواند روشی مؤثر و ساده برای تأیید اعتبار محصولات حلال باشد(۴۵). ملکی و همکاران در سال ۲۰۱۷،

[32] Reporter Probe
[33] Hairpinprobes
[34] Molecular Beacons Probes
[35] Conventional Species-Specific PCR (SS-PCR)

www.SID.ir

Archive of SID

با استفاده از روش PCR زمان واقعی بر مبنای SYBR green مشتقات خوکی را در نمونه‌های گوشت و غذاهای بسیار فرآوری‌شده مشکوک شناسایی نمودند. پرایمر ۱۱۴ جفت بازی از ناحیه D-loop میتوکندری خوک طراحی شد. نتایج نشان داد که توان تشخیص رقت ۰/۰۰۱ در مقایسه با DNA اولیه با کارایی ۰/۹۲ وجود دارد. روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان واقعی بر مبنای SYBR green درتشخیص نمونه‌های پودر و ورق ژلاتین موفق بود(۴۶).

توالی‌یابی نسل جدید یا Next Generation Sequencing (NGS)

NGS نسبت به روش‌های توالی‌یابی قبل از خود همانند Sanger، توالی‌یابی DNA و RNA را با سرعت بیشتر و ارزان‌تر انجام می‌دهد(۴۷). این روش دارای برتری‌هایی نسبت به روش‌های قدیمی است: ۱) بر مبنای تهیه کتابخانه‌های NGS هستند. ۲) به جای صد واکنش توالی‌یابی، توانایی خوانش میلیون‌ها واکنش را دارند. ۳) خروجی توالی بدون نیاز به تجزیه و تحلیل‌هایی مانند الکتروفورز به صورت مستقیم قابل بررسی است(۴۸).

این روش در سه مرحله انجام می‌شود: ۱) تشکیل کتابخانه ژنومی که در طی آن نمونه ژنومی که می‌تواند ژن هدف یا ژن کامل باشد به کتابخانه‌ای از قطعات کوچکتر تقسیم شده، سپس این کتابخانه تکثیر می‌شود. ۲) تعیین توالی و تصویربرداری که در طی آن از هر کدام از قطعات کتابخانه رشته جدید حاصل می‌شود، کیفیت کنترل می‌گردد و از روی قطعه DNA توالی‌یابی انجام می‌یابد. ۳) تجزیه و تحلیل داده‌ها در طی مرحله سوم با کمک طیف گسترده‌ای از ارزیابی‌های بیوانفورماتیکی انجام می‌شود(۴۹). برای اهداف شناسایی گونه این روش از نظر سرعت، طول خواندن، توان عملیاتی و کاهش هزینه دارای برتری است. در سال ۲۰۰۵، سیستم توالی ژنوم ۴۵۴ معرفی شد که قادر به تولید حدود ۲۰۰۰۰۰ خوانش با اندازه ۱۱۰ جفت باز (bp) بود(۴۷).

روش‌هایی همچون توالی‌یابی نسل جدید نسبت به روش‌های قبلی دارای اختصاصیت، حساسیت، سرعت و توانایی انجام عملیات در یک مرحله هستند(۵۰). این روش دارای قدرت شناخت و کشف بسیار بالا است. در حالتی که با ژن‌های بسیار زیاد و نمونه‌های متفاوت روبرو هستیم، این روش در زمان و منابع صرفه‌جویی می‌کند و انتخاب مناسبی است. در حالی که وقتی تعداد نمونه کم است، این روش در مقایسه با روش PCR کمّی بسیار زمان‌گیر بوده و به صرفه نیست(۵۱).

حد تشخیص روش‌های مبتنی بر DNA

به منظور صحه‌گذاری روش‌های مبتنی بر DNA باید آزمون‌های اعتبارسنجی انجام گیرد. این آزمون‌ها شامل تعیین اختصاصیت روش در دو مرحله تئوری و عملی، تعیین حساسیت روش و کمترین حد تشخیص[۳۶] یا (LOD) و تعیین پایداری روش می‌باشد(۵۲). برای تعیین کمترین حد تشخیص ابتدا غلظت‌های سریالی از DNA هدف تهیه می‌شود و با انجام آزمون PCR برای غلظت‌های مختلف DNA هدف، کمترین غلظت از DNA که روی ژل، باند قابل مشاهده تشکیل داد، به‌عنوان کمترین حد تشخیص در نظر گرفته می‌گردد. در واقع کمترین غلظت DNA موجود در ماتریکس که قابل تشخیص می‌باشد، LOD یا کمترین حد تشخیص است. حد تشخیص ژن‌های میتوکندریایی در روش PCR کیفی، بر حسب ژن یا قطعه ژنی و پرایمر انتخابی متفاوت است. نوع، میزان استخراج ژلاتین و مرحله‌ای که استحصال انجام شده است نیز بر مقدار LOD تأثیرگذار می‌باشد. وقتی هدف یافتن محصولات حلال و کوشر باشد، Cut off= ۱/۰ درصد برای میزان حد تشخیص کفایت می‌کند(۲۵).

روش‌های تأییدی بعد از روش‌های مبتنی بر DNA

برای تأیید نتایج به دست آمده از روش PCR از روش‌های تکمیلی جهت مقایسه نتیجه حاصل شده استفاده

[36] Limit of Detection

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شود. تکنیک‌های به کار رفته برای محصولات ژلاتینی شامل موارد زیر است:

– واکنش زنجیره‌ای پلیمراز پلی‌مورفیسم قطعات طولی محدود شونده یا PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism

PCR-RFLP یکی از تکنیک‌های مهم مولکولی انجام شده توسط محققان متعدد است. در این روش به کمک آنزیم‌های محدود کننده[37]، توالی خاص از مولکول DNA شناسایی شده و برش داده می‌شود. هدف این تکنیک اثبات شباهت دو مولکول DNA است. به کمک این روش تمایز گونه‌های نزدیک به هم نیز امکان‌پذیر است(۵۳). سلطانا و همکاران(۲۰۱۸)، با روش PCR-RFLP اقدام به شناسایی منابع حیوانی ژلاتین در ۳۰ نمونه از کپسول دارویی با برند حلال نمودند و مشخص گردید ۳ نمونه حاوی ژلاتین خوک می‌باشد. این روش برای تشخیص۰/۱ تا ۰/۰۱ نانوگرم از DNA استخراج شده از ژلاتین خالص یا ترکیبی مناسب اعلام شد(۵۴). هر چند این روش دارای مزیت‌هایی همچون بارز بودن نشانگرها و قابلیت تکرارپذیری بالا است، اما نیاز به میزان بالای DNA با درجه خلوص بالا و زنجیره طویل دارد(۵۵). طراحی پروب هزینه‌بر است.

تعیین توالی محصول PCR

توالی‌یابی DNA[38] فرایندی است که در آن با تعیین توالی یک قطعه از DNA، می‌توان از ترتیب قرارگیری چهار باز نوکلئوتیدی آدنین، گوانین، سیتوزین و تیمین در آن مولکول اطلاع پیدا کرد. توالی‌یابی DNA پیشرفت مهمی در شناسایی گونه‌های موجود در مواد غذایی و ایجاد قابلیت ردیابی دارد(۵۰). توالی‌یابی DNA به دو روش اصلی انجام می‌گیرد، روش‌های قدیمی مانند روش خاتمه زنجیره‌ای یا روش سنگر[39] و هضم شیمیایی یا ماکسام-گیلبرت می‌باشد، و روش‌های جدیدتر که می‌توانند تعداد زیادی از مولکول‌های DNA را با سرعت و قدرت بالا پردازش کنند، در مجموع با عنوان روش‌های توالی‌یابی نسل جدید معرفی می‌شوند. برتری این روش‌ها نسبت به روش تعیین توالی بر پایه ختم زنجیره‌ای آن است. این تکنیک‌ها بدون نیاز به ژل و در حین سنتز DNA، توالی DNA را ثبت می‌کنند.

همچنین این سیستم نیازی به کلونینگ نداشته و از فرایند PCR جهت ازدیاد قطعه مورد نظر استفاده می‌کند. این امر منجر به افزایش سرعت و بازدهی تعیین توالی DNA می‌گردد(۵۰). ابتدا منطقه حفاظت شده از یک ژن خاص تکثیر می‌شود و محصول PCR توالی‌یابی می‌گردد. توالی‌یابی DNA روشی قابل تکرار و پایداری[40]است که مجموعه‌ای از اطلاعات را فراهم می‌کند و با انتخاب مناطق هدف ژنومی مناسب توانایی سازگاری با سطوح مختلف افتراقی را دارد(۴۷). سلطانا و همکاران (۲۰۲۰)، بعد از شناسایی گونه خوک در نمونه جمع آوری شده، برای تأیید نتایج به دست آمده از روش توالی‌یابی بهره جستند که ۹۹ تا ۱۰۰ درصد شباهت با گونه خوک در محصولات PCR مشاهده شد(۵۶). انواع روش‌های PCR به کار رفته برای تعیین منشأ گونه موجود در ژلاتین در جدول ۳ خلاصه شده است.

جدول ۳. انواع روش‌های PCR به کار رفته برای تعیین منشأ گونه موجود در ژلاتین.

روش PCR	کاربرد	نشانگر	حد تشخیص	مرجع
SPECIES-SPECIFIC PCR assay	شناسایی گونه‌های گاو، خوک، ماهی و ژلاتین گیاهی در کپسول مکمل‌های غذایی	طراحی پرایمرهای اختصاصی گونه با هدف‌گیری ژن میتوکندریایی 16s rRNA	گاو ۰/۰۰۱ و خوک ۰/۰۱ نانوگرم در میکرولیتر	(۳۹)
Duplex PCR	افتراق بین ژلاتین حاصل از گونه گاو و خوک در کپسول دارویی	آزمون Duplex PCR روی ۲۴ پوسته کپسول دارویی پرایمر ۱۴۹ جفت بازی برای گونه خوک و پرایمر ۲۷۱ جفت بازی برای گونه گاو	۱	(۴۲)

[37] Restriction Enzymes
[38] DNA Sequencing
[39] Sanger Method
[40] Robust

www.SID.ir

Archive of SID

		۵۰ درصد از نمونه‌ها هم به صورت ژلاتین خالص خوک و هم به صورت ترکیب با ژلاتین گاو از ژلاتین خوک و غیرحلال		
Multiplex PCR	افتراق بین ژلاتین حاصل از گونه گاو، خوک، یوکاریوت و ماهی در محصولات قنادی	از بین ۳۸ نمونه انتخابی با برند حلال، ۳۳ نمونه حاوی ژلاتین گونه گاو بودند. بقیه نمونه‌ها حاوی ژلاتین حاصل از خوک و یوکاریوت بودند.	۰/۱ تا ۰/۰۰۱ نانوگرم	(۴۱)
PCR-RFLP	افتراق بین ژلاتین حاصل از گونه گاو، خوک و ماهی در پوسته کپسول دارویی	آنزیم محدود کننده با نام‌های *BsaAI*، *Hpy188I* و *BcoDI* استفاده شد. در ۳۰ نمونه ۳ نمونه حاوی ژلاتین خوک بودند.	۰/۱ تا ۰/۰۱ نانوگرم	(۵۴)
RT-PCR SYBR Green I	شناسایی گونه‌های گاو و خوک در نمونه‌های گوشت وغذاهای بسیار فرآوری شده پودر و ورق ژلاتین مشکوک	طراحی پرایمر ۱۱۴ جفت بازی از ناحیه D-loop میتوکندری خوک	خوک ۰/۰۰۱	(۴۶)

چالش‌های مربوط به روش‌های شناسایی بر پایه DNA

با وجود این که روش PCR جهت تشخیص و شناسایی گونه مورد استفاده در مواد غذایی از موفق‌ترین روش‌ها است و در عین سادگی، سریع و بسیار حساس نیز می‌باشد، اما دارای محدودیت‌هایی نیز هست. ۱)DNA پلیمرازهای مورد استفاده در PCR مستعد خطا بوده و می‌تواند در قطعات تولید شده جهش ایجاد کند. ۲) ویژگی محصولات PCR توسط آغازگر غیراختصاصی که به سایر توالی‌های مشابه در DNA الگو متصل می‌شوند، ممکن است تغییر یابد. ۳)اطلاعات توالی DNA برای طراحی آغازگرهای خاص لازم است(۳۳). به دلیل حساسیت فوق‌العاده و قدرت تکثیر زیاد روش، نمونه‌های مورد بررسی مستعد آلودگی هستند. هر قطعه DNA خارجی که وارد محیط PCR شود، مورد تکثیر قرار گرفته و منجر به نتایج مثبت یا منفی کاذب می‌گردد.

همچنین این روش به طور معمول وابسته به مرحله الکتروفورز در ژل آگارز است. از نکات برجسته در اجرای یک واکنش PCR موفق استخراج مقادیر کافی و قابل محاسبه DNA گونه مورد نظر می‌باشد، اما فرآیندهای اعمال شده بر سیستم های غذایی، عامل محدودگر در این مورد می‌باشند. بسیاری از پرایمرهایی که توانایی شناسایی گونه در محصولات گوشتی خام و پخته شده را دارند، به دلیل تخریب و واسرشتی DNA در ترکیب محصول ژلاتینه که تحت فرایند شدید بوده‌اند، همیشه قادر به شناسایی و تشکیل باند مورد انتظار نیستند. به عبارتی تخریب و کم شدن مقادیر آمپلیکون باعث کاهش تعداد قطعات DNA با اندازه مناسب برای آنالیز مولکولی می‌گردد(۵۷). همچنین دناتوره و غیر فعال شدن آنزیم بعد از ۲۵ تا ۳۰ سیکل به علت حرارت، احتمال Reannealing به علت غلظت زیاد رشته‌های هدف و رقابت آن‌ها با پرایمرها، نیاز به تست‌های تأییدی پس از واکنش PCR و سایر موارد از عوامل محدودکننده این روش است.

نتیجه‌گیری

ژلاتین به طور گسترده‌ای در بسیاری از محصولات دارویی، غذایی و آرایشی استفاده می‌شود. ژلاتین از منابع گاو، خوک و ماهی قابل استحصال است. به طور معمول در دنیا ژلاتین تولیدی از گونه خوک دارای قیمت پایین‌تری نسبت به گونه گاو است و در جریان فرآیند کوتاه‌تری به دست می‌آید، بنابراین احتمال استفاده از آن در مقایسه با ژلاتین گاو به‌عنوان ماده اولیه ارزان‌تر وجود دارد و این خود الزام وجود روش‌های کنترلی در این باره را مشخص می‌سازد. از آنجایی که ژلاتین در مرحله تولید در معرض هیدرولیز اسیدی یا بازی کلاژن، استخراج در دمای بالا، استریلیزاسیون

www.SID.ir

Archive of SID

و خشک‌کردن قرار می‌گیرد، پروتئین و اسیدهای نوکلئیک موجود در ژلاتین بسیار تخریب‌شده هستند. تاکنون از روش‌های مختلفی برای آنالیز ژلاتین استفاده شده است از جمله FTIR، HPLC، LC، SDS-PAGE، ELISA و PCR. یکی از بهترین روش‌ها که همراه با اختصاصیت بالا است، روش PCR و روش‌های توسعه‌یافته مربوط به آن می‌باشد. بسیاری از مجموعه‌های پرایمرها و پروب‌ها مخصوص گونه‌ها که تا کنون انتشار یافته‌اند، نمی‌تواند منبع ژلاتینی موجود در مواد غذایی را احتمالاً به دلیل گسترده بودن تخریب الگوهای تکثیرکننده، شناسایی کنند و تشخیص دهند. بالا رفتن احتمال تخریب و شکستگی همانطور که در تحقیقات گذشته اعلام شده است، آزمون شناسایی با PCR را دچار اشکالاتی می‌کند. برای حل این مشکل اولاً باید روش استخراج مناسب به کار برد تا در فرایند استخراج مقدار کافی از DNA نمونه تهیه گردد و ثانیاً نشانگرهای زیستی مناسبی انتخاب گردد تا توانایی تشخیص و افتراق گونه با وجود قطعات کوچک و شکسته شده DNA را داشته باشند. روش‌های مبتنی بر DNA از آن جایی که DNA دارای پایداری بیشتری می‌باشد، یکی از رایج‌ترین روش‌ها جهت تشخیص اصالت گونه هستند. اگر فرآورده غذایی تحت فشار و فرآیند حرارت بالا و مخلوط شدن قرار گرفته باشد، پروتئین‌ها دچار تغییر ساختار و یا تجزیه می‌شوند. از دیگر معایب پروتئین‌ها این است که مدت زمان فعالیت آن ها کوتاه است و نیمه عمر بالایی ندارند. آنالیز پروتئین‌ها به‌عنوان مثال روش‌های کروماتوگرافی گران‌تر است و همچنین پروتئین می‌تواند در بافت‌های مختلف دچار تغییر شود؛ در حالیکه DNA در مقابل دما، فشار و مواد شیمیایی استواری و یکپارچگی خودش را حفظ می‌کند. به عبارت دیگر این روش‌ها دقیق، پایدار و قادر به شناسایی گونه‌های مختلف در محصولات خام تا کاملاً فرآوری شده هستند. DNA برخلاف بیومارکرهای پروتئینی به عوامل فیزیکوشیمیایی مقاوم می‌باشد، حاوی اطلاعات ژنتیکی موجود زنده است، محتوای ژنتیکی آن نسبت به پروتئین بیشتر است و برای مشخص کردن گونه خاص، دارای خصوصیت ویژه بالاتر هست. به دلیل وجود DNA در هر نوع سلولی، امکان استخراج آن از هر بافتی وجود دارد. نکته مهم دیگر در انتخاب روش‌های مبتنی بر DNA آن است که این روش‌ها دارای حد تشخیص بسیار پایین هستند و چون چندین کپی از DNA در هر سلول وجود دارد، مقدار کم نمونه برای تشخیص گونه در این روش کافی است. همچنین با طراحی پرایمر منحصربه‌فرد برای تشخیص گونه خاص این روش دارای ویژگی بالا می‌باشد و می‌توان یک گونه خاص را در مخلوطی از گونه‌های مختلف تشخیص داد. نتیجه حاصل از روش، وجود یا عدم وجود هدف مورد نظر را به صورت مثبت یا منفی گزارش می‌کند و دارای قطعیت تشخیص است. به تجهیزات و دستگاه‌های متعدد نیاز ندارد.

پیشنهادات و پیش بینی آینده

هدف اصلی در این تحقیق بررسی نکات برجسته در زمینه انواع روش‌های تجزیه و تحلیل منابع ژلاتین به صورت مستقیم یا در سیستم‌های غذایی است. بسیاری از روش‌های ارائه شده تا کنون بر مبنای ELISA، PCR و همچنین روش‌های طیف‌سنجی است. در مطالعات آینده برای طبقه‌بندی و شناسایی انواع ژلاتین‌ها بر مبنای منشأ آنها پیشنهاد می‌شود، روش‌های مدرن، کارا و غیر تخریب‌گری همچون روش تصویربرداری فراطیفی[41]، طیف رامان[42]، طیف سنجی فلورسنت[43] و تصویربرداری شیمیایی[44]با تلفیقی از روش‌های امتحان شده استفاده شود. همچنین برای غربالگری محصولات غذایی حاوی ژلاتین و انجام تشخیص‌های افتراقی بسته به گونه‌ای که ژلاتین از آن استخراج شده است، لازم است کتابخانه‌های بر مبنای تصویر آنلاین فراهم شود تا نتایج حاصل از ابزارهای مدرن برای پایش محصولات غذایی و دارویی حاوی ژلاتین به سهولت در دسترس باشد.

[41] Hyperspectral Imaging Technique
[42] Ramanscattering
[43] Fluorescent Spectroscopy And Chemical Imaging
[44] Chemical Imaging

www.SID.ir

Archive of SID

تضاد منافع

نتایج حاصل از این مطالعه با منافع نویسندگان و محققان در تعارض نیست.

References

1.Technaviohttps://www.technavio.com/report/gelatin-market-industry-nalysis.(Retrieved at Jan. 2020).

2. Aida AA, Man YC, Wong CM, Raha AR, Son R. Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for Halal authentication. Meat science. 2005;69(1):47-52. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.06.020

3. Iranian Veterinary Organization (IVO) Quarantine And biosecurity, https://e.ivo.ir/contents.aspx?id=52.(Retrieved at Jan. 2020).

4 .Popping B. The application of biotechnological methods in authenticity testing. Journal of biotechnology. 2002;98(1):107-12. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00089-5

5. Doosti A, Dehkordi PG, Rahimi E. Molecular assay to fraud identification of meat products. Journal of food science and technology. 2014;51(1):148-52. https://doi.org/10.1007/s13197-011-0456-3

6. Abbas O, Zadravec M, Baeten V, Mikuš T, Lešić T, Vulić A, at al. Analytical methods used for the authentication of food of animal origin. Food Chemistry. 2018;246:6-17. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.007

7. Rohman A, Windarsih A, Erwanto Y, Zakaria Z. Review on analytical methods for analysis of porcine gelatine in food and pharmaceutical products for halal authentication. Trends in Food Science & Technology. 2020; 101:122-32. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.008

8. GIMA, Handbook, G. G. Gelatin Manufacturers Institute of America.New York, NY, USA.2012.

9. Karim AA, Bhat R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. Food hydrocolloids. 2009;23(3):563-76. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.002

10. Norziah MH, Al-Hassan A, Khairulnizam AB, Mordi MN, Norita M. Characterization of fish gelatin from surimi processing wastes: Thermal analysis and effect of transglutaminase on gel properties. Food hydrocolloids. 2009;23(6):1610-6. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.12.004

11. Caballero B, Finglas P and Toldrá F. Encyclopedia of Food and Health.1st Edition. Waltham: Academic Press. Elsevier Inc; 2015.

12. Phillips G and Williams P. Handbook of Food Proteins. 1st Edition. Sawston: Woodhead Publishing Limited;2011.

13. Sahilah AM, Fadly ML, Norrakiah AS, Aminah A, Aida WW, Ma'aruf AG, et al. Halal market surveillance of soft and hard gel capsules in pharmaceutical products using PCR and southern-hybridization on the biochip analysis. International Food Research Journal. 2012;19(1):371-75.

14. Cho SM, Gu YS, Kim SB. Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (Thunnus albacares) skin gelatin compared to mammalian gelatins. Food Hydrocolloids. 2005;19(2):221-9. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.05.005

15. Rokni N, Rezaian M, Dayani Dardashti A. Histological histometrical study of different heated sausages. Journal of Veterinary Medicine, Tehran University. 1997;52(1):95-103.

16. Szabo A, Febel H, Sugar L, Romvari R. Fatty acid regiodistribution analysis of divergent animal triacylglycerol samples–a possible approach for species differentiation. Journal of Food Lipids. 2007;14(1):62-77. https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2006.00071.x

17. Ishaq A, Rahman U, Sahar A, Perveen R, Deering AJ, Khalil AA, et al. Potentiality of analytical approaches to determine gelatin authenticity in food systems: A review. LWT. 2020;121:108968. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108968

18. Venien A, Levieux D. Differentiation of bovine from porcine gelatines using polyclonal anti-peptide antibodies in indirect and competitive indirect ELISA. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2005;39(3-4):418-24. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.04.013

19. Che Man YB, Mustafa S, Khairil Mokhtar NF, Nordin R, Sazili AQ. Porcine-specific polymerase chain reaction assay based on mitochondrial d-loop gene for identification of pork in raw meat. International Journal of Food Properties. 2012;15(1):134-44. https://doi.org/10.1080/10942911003754692

20. Hashim DM, Man YC, Norakasha R, Shuhaimi M, Salmah Y, Syahariza ZA. Potential use of Fourier transform infrared spectroscopy for differentiation of bovine and porcine gelatins. Food chemistry. 2010;118(3):856-60. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.049

21. Cebi N, Dogan CE, Mese AE, Ozdemir D, Arıcı M, Sagdic O. A rapid ATR-FTIR spectroscopic method for classification of gelatin gummy candies in relation to the gelatin source. Food chemistry. 2019; 277:373-81. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.125

22. Zhang GF, Tao LI, Qian WA, Jian-Du LE, Guang-Hui MA, Zhi-Guo SU. Identification of

www.SID.ir

Archive of SID

marker peptides in digested gelatins by high performance liquid chromatography/mass spectrometry. Chinese Journal of Analytical Chemistry. 2008;36(11):1499-504. https://doi.org/10.1016/S1872-2040(09)60003-7

23. Hidaka S, Liu SY. Effects of gelatins on calcium phosphate precipitation: a possible application for distinguishing bovine bone gelatin from porcine skin gelatin. Journal of Food Composition and Analysis. 2003;16(4):477-83. https://doi.org/10.1016/S0889-1575(02)00174-6

24. Yap BK, Gam LH. Differentiation of bovine from porcine gelatin capsules using gel electrophoresis method. Food chemistry. 2019;274:16-9. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.111

25. Demirhan Y, Ulca P, Senyuva HZ. Detection of porcine DNA in gelatine and gelatine-containing processed food products—Halal/Kosher authentication. Meat science. 2012;90(3):686-9. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.10.014

26. Yilmaz MT, Kesmen Z, Baykal B, Sagdic O, Kulen O, Kacar O, et al. A novel method to differentiate bovine and porcine gelatins in food products: NanoUPLC-ESI-Q-TOF-MSE based data independent acquisition technique to detect marker peptides in gelatin. Food Chemistry. 2013;141(3):2450-8. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.096

27. Grundy HH, Reece P, Buckley M, Solazzo CM, Dowle AA, Ashford D, et al. A mass spectrometry method for the determination of the species of origin of gelatine in foods and pharmaceutical products. Food Chemistry. 2016;190:276-84. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.054

28. Aina MA, Amin I, Hafidz RM, Yaakob CM. Identification polypeptide biomarkers of porcine skin gelatin by two-dimensional electrophoresis. International Food Research Journal. 2013;20(3):1395-9.

29. Addis MF, Cappuccinelli R, Tedde V, Pagnozzi D, Porcu MC, Bonaglini E, et al. Proteomic analysis of muscle tissue from gilthead sea bream (Sparus aurata, L.) farmed in offshore floating cages. Aquaculture. 2010;309(1-4):245-52. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.08.022

30. Perestam AT, Fujisaki KK, Nava O, Hellberg RS. Comparison of real-time PCR and ELISA-based methods for the detection of beef and pork in processed meat products. Food Control. 2017; 71:346-52. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.017

31. Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, Phoolcharoen W, Shoyama Y, Tanaka H, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. Journal of natural medicines. 2018;72(1):32-42. https://doi.org/10.1007/s11418-017-1144-z

32. Fajardo V, González I, Rojas M, García T, Martín R. A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. Trends in Food Science & Technology. 2010;21(8):408-21. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.06.002

33. Erwanto Y, Rohman A, Arsyanti L, Pranoto Y. Identification of pig DNA in food products using polymerase chain reaction (PCR) for halal authentication-a review. International Food Research Journal. 2018;25(4):1322-31.

34. Man YC, Aida AA, Raha AR, Son R. Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for halal verification. Food control. 2007;18(7):885-9. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.05.004

35. Dalmasso A, Fontanella E, Piatti P, Civera T, Rosati S, Bottero MT. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. Molecular and cellular probes. 2004;18(2):81-7. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2003.09.006

36. Sahilah AM, Norhayati Y, Norrakiah AS, Aminah A, Aida WW. Halal authentication of raw meats using PCR amplification of mitchondrial DNA. International Food Research Journal. 2011;18(4):1489-91.

37. Girish PS, Anjaneyulu AS, Viswas KN, Anand M, Rajkumar N, Shivakumar BM, Bhaskar S. Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. Meat Science. 2004;66(3):551-6. https://doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00158-X

38. Linacre A. Forensic science in wildlife investigations. 1st edition. CRC press; 2009.

39 .Lee JH, Kim MR, Jo CH, Jung YK, Kwon K, Kang TS. Specific PCR assays to determine bovine, porcine, fish and plant origin of gelatin capsules of dietary supplements. Food chemistry. 2016;211:253-9. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.060

40. Shabani H, Mehdizadeh M, Mousavi SM, Dezfouli EA, Solgi T, Khodaverdi M, Rabiei M, Rastegar H, Alebouyeh M. Halal authenticity of gelatin using species-specific PCR. Food Chemistry. 2015;184:203-6. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.140

41. Sultana S, Hossain MM, Zaidul IS, Ali ME. Multiplex PCR to discriminate bovine, porcine, and fish DNA in gelatin and confectionery products. LWT. 2018; 92:169-76. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.019

42. Nikzad J, Shahhosseini S, Tabarzad M, Nafissi-Varcheh N, Torshabi M. Simultaneous detection of bovine and porcine DNA in pharmaceutical gelatin capsules by duplex PCR assay for Halal authentication. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. 2017;25(1):1-3. https://doi.org/10.1186/s40199-017-0171-3

www.SID.ir

Archive of SID

43. Tasara T, Schumacher S, Stephan R. Conventional and real-time PCR–based approaches for molecular detection and quantitation of bovine species material in edible gelatin. Journal of food protection. 2005;68(11):2420-6. https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.11.2420

44. Sudjadi, Wardani HS, Sepminarti T, Rohman A. Analysis of porcine Gelatin DNA in a commercial capsule shell using real-time polymerase chain reaction for halal authentication. International Journal of Food Properties. 2016;19(9):2127-34. https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1110164

45. Kang SS, Lee HG, Kim H. Development and comparison of a porcine gelatin detection system targeting mitochondrial markers for Halal authentication. LWT. 2018; 97:697-702.

46. Maleki E, Ghorbani M, Hamid M, Sadeghi Mahounak A & Khomeiri M. Detection of pork derivatives in meat and suspicious highly processed foods by Real-time PCR. Food scince and Technology. 2018;15(75):13-22. [In Persian]

47. Rao MS, Chakraborty G, Murthy KS. Market drivers and discovering technologies in meat species identification. Food Analytical Methods. 2019;12(6):2416-29.

48. Downey G. Advances in food authenticity testing. Woodhead Publishing; 2016.

49. Li P. Explore the Novel Biomarkers through Next-Generation Sequencing. In Genotyping; 2018.

50. Böhme K, Calo-Mata P, Barros-Velázquez J, Ortea I. Review of recent DNA-based methods for main food-authentication topics. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2019;67(14):3854-64. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07016

51. Gupta AK, Gupta UD. Next generation sequencing and its applications. InAnimal Biotechnology 2020 Jan 1 (pp. 395-421). Academic Press.

52. ISO 20813 Molecular biomarker analysis-Methods of analysis for the detection and identification of animal species in foods and food products (nucleic acid-based methods)-General requirements and definitions. 2018.(Retrieved at Aug. 2019).

53. Hsieh YW, Hwang DF. Molecular phylogenetic relationships of puffer fish inferred from partial sequences of cytochrome b gene and restriction fragment length polymorphism analysis. Journal of agricultural and food chemistry. 2004;52(13):4159-65. https://doi.org/10.1021/jf0354621

54. Sultana S, Hossain MM, Naquiah NN, Ali ME. Novel multiplex PCR-RFLP assay discriminates bovine, porcine and fish gelatin substitution in Asian pharmaceuticals capsule shells. Food Additives & Contaminants: Part A. 2018;35(9):1662-73. https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1500719

55. Bottero MT, Dalmasso A. Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. The Veterinary Journal. 2011;190(1):34-8. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.09.024

56. Sultana S, Hossain MM, Azlan A, Johan MR, Chowdhury ZZ, Ali ME. TaqMan probe based multiplex quantitative PCR assay for determination of bovine, porcine and fish DNA in gelatin admixture, food products and dietary supplements. Food chemistry. 2020; 325:126756. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126756

57. Abd Mutalib S, Muin NM, Abdullah A, Hassan O, Mustapha WA, Sani NA, et al. Sensitivity of polymerase chain reaction (PCR)-southern hybridization and conventional PCR analysis for Halal authentication of gelatin capsules. LWT-Food Science and Technology. 2015;63(1):714-9. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.006

www.SID.ir

Archive of SID

Investigation of the diversity of existing methods for the detection of Halal gelatin products

Maryam Ghobadi Dana[1*], Narges Kamandi[2], Mehrdad Ghavami[2], Amir Mohammad Mortazavian[3]

1-Department of Microbiology Research Group, Faculty of Food Industry and Agriculture, Standard Research Institute, Institute of Standard and Industrial Research of Iran, Karaj, Iran.
2-Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3-Department of Food Technology, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology/National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, 19395-4741 Tehran, Iran

ARTICLE INFO

Received:30 October 2021

Acceptance:25 December 2021

Keywords:
Fraud Detection
Gelatin
Species Identification
Jelly Product
Qualitative PCR

ABSTRACT

Background and objective: Gelatin is used as an important component in the structure of food and medicine due to its special properties. The gelatin used in industry is mainly produced from animal species of bovine and porcine. In some cases, to reduce the cost of the product, a substandard raw material or other than what is stated in the product labeling is used. This is especially important in cases where the health of the consumer is endangered or when the use of certain substances is contrary to the religious precepts and beliefs of the community. Therefore, the ability to identify, detect and, in a more comprehensive way, authenticate the components of food with the origin of living organisms is essential for the health control system of the country. Identification of the species used in the gelatin structure is necessary from the perspective of consumer confidence in food health safety as well as religious beliefs.

Results: Several methods have been introduced to determine the species in gelatin and its products from around the world, each has its advantages and disadvantages. In this research, the physical, chemical, and biological analytical methods used to identify the origin of gelatin and the authentication of the Halal product have been investigated. Methods such as FTIR spectroscopy, chromatography, ELISA, and polymerase chain reaction have been used for this purpose. One of the most successful methods is the PCR and its developed methods that can detect, identify and differentiate close species with sensitivity, specificity, high speed, and low-cost process.

Conclusion: The validated DNA based methods such as PCR are more efficient than other methods and they can be used as reliable methods with 99% confidence, with a low detection limit (about nanograms of DNA per gram of sample). of course, specificity, sensitivity, robustness, reproducibility and repeatability of test method must be tested.

OPEN ACCESS
Use your device to scan and read the article online

Citation (Vancouver): Ghobadi Dana M, Kamandi N, Ghavami M, Mortazavian AM. Investigation of the diversity of existing methods for the detection of Halal gelatin products. Journal of Halal Research. Autumn 2021; 4(3):60-76. [In Persian]
https://doi.org/10.30502/H.2022.312633.1093

*Correspondance to: Maryam Ghobadi Dana, Email: Dana.m@standard.ac.ir, Tel: +98(26)32808413

www.SID.ir

This paper is open access under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license