بررسی حضور پروتئین گیاهی سویا در تعدادی از محصولات گوشتی تجاری با آزمون PCR

سارا بازیاری[a*]، حمیدرضا زمانی‌زاده[b]، مریم میزانی[c]، انوشه شریفان[d]

[a] دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[b] استاد گروه بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[c] دانشیار دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[d] استادیار دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۱۲/۲۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۲/۲۶

چکیده

مقدمه: امروزه از سویا به سبب خصوصیات کاربردی و تغذیه‌ای موجود در پروتئین‌های آن در محصولات گوشتی استفاده می‌گردد. با این وجود سویا و مشتقات آن بر اساس استاندارد ملی ایران به عنوان مواد حساسیت‌زای شدید برای برخی افراد شناخته شده‌اند که باید از قوانین برچسب‌گذاری تبعیت کنند. بنابراین هدف این پژوهش توسعه یک آزمون PCR برای شناسایی سویا به عنوان یک ماده آلرژن پنهان در محصولات گوشتی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، ابتدا نمونه‌های سویا و محصولات گوشتی تجاری تهیه و DNA هر یک با استفاده از کیت MBST، استخراج و خالص‌سازی گردید. پرایمر اختصاصی سویا طراحی و سفارش داده شد. سپس شرایط آزمون PCR برای تکثیر قطعه ۱۱۸ جفت بازی متعلق به سویا، بهینه‌سازی و محصولات PCR، بوسیله ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید. در نهایت کارایی این تکنیک برای شناسایی سویا در محصولات گوشتی تجاری مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج آزمون PCR بکار رفته با اظهارات برچسب محصولات گوشتی مقایسه شد.

یافته‌ها: تحت شرایط بهینه‌سازی شده، قطعه DNA با طول ۱۱۸جفت بازی برای سویا تکثیر یافت. سپس تکنیک توسعه یافته به طور موفقیت‌آمیزی برای شناسایی سویا در محصولات گوشتی تجاری مورد استفاده قرار گرفت، نتایج نشان داد که ۱۰۰٪ محصولات سوسیس و ناگت مرغ ، ۳۳٪ محصولات کالباس، ۶۰٪ محصولات همبرگر، ۷۵٪ محصولات کباب‌لقمه باند ۱۱۸ جفت بازی متعلق به سویا را ظاهر ساختند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد آزمون PCR توسعه یافته در مطالعه حاضر، روشی سریع، حساس، ساده، قابل اعتماد و مقرون به صرفه برای شناسایی پروتئین گیاهی سویا به عنوان یک ماده حساسیت‌زا در محصولات گوشتی تجاری خام و حرارت دیده می‌باشد..

واژه‌های کلیدی *سویا، محصولات گوشتی، PCR*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: sara_bazyari64@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

امروزه آلرژی‌های غذایی به عنوان یک مشکل سلامت همگانی در دنیا مطرح می‌باشند. بر اساس مطالعات نویسندگان مختلف اروپایی و آمریکایی، آلرژی‌های غذایی تا حد ۲٪ جمعیت بالغ و ۸٪ کودکان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. گرچه درجه شیوع مشاهده شده از علائم ایجاد شده غذایی ممکن است به ۲۲٪ جمعیت کل برسد (Gomes Galan *et al*., 2011; Poms *et al*., 2004). در افراد بسیار حساس حتی جذب مقادیر جزئی از مواد آلرژی‌زا می‌تواند اختلالات گوارشی، تنفسی، گردش خون و واکنش‌های پوستی را برانگیخته سازد. در بعضی افراد حساس، تماس با مواد غذایی آلرژن بخصوص می‌تواند واکنش‌های مخاطره‌آمیز زندگی(شوک آنافیلاکتیک) را برانگیخته کند. بر اساس گزارش FAO در سال ۱۹۹۵، بیش از ۱۶۰ ماده غذایی به عنوان مواد آلرژیک شناخته شده‌اند که تنها ۸ مورد از آنها بیش از ۹۰٪ از کل آلرژی‌های غذایی را موجب می‌شوند (Poms *et al*., 2004).

بر اساس دستورالعمل 2003/89/EC اتحادیه اروپا (The European Parliament and the Council of the European Union, 2003) و استاندارد ملی ایران به شماره ۲۱۳۵ (بی نام، ۱۳۸۹) و همچنین "حداقل ضوابط برچسب گذاری مواد غذایی و مکمل های رژیمی – غذایی و ورزشی" وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی کشور به شماره PEI/CrV1/0029 (بی نام، ۱۳۸۸)، چون ترکیبات و مواد غذایی زیر به عنوان مواد حساسیت زای شدید برای برخی افراد شناخته شده‌اند، باید برروی برچسب محصولات اعلام شوند:

– غلات حاوی گلوتن مانند گندم، گندم سیاه (چاودار)، جو، جودوسر (یولاف)، گندم سخت و سویه‌های هیبرید شده و و فرآورده‌های آن
– سخت پوستان و فرآورده‌های آن
– تخم مرغ و فرآورده‌های آن
– ماهی و فرآورده‌های آن
– سویا و فرآورده‌های آن
– شیر و فرآورده‌های آن (حاوی لاکتوز)
– مغزهای درختی (بادام، فندق، گردو، پسته..) و فرآورده‌های آنها
– کرفس و فرآورده‌های آن
– خردل و فرآورده‌های آن
– کنجد و فرآورده‌های آن
– سولفیت و دی‌اکسید سولفور در غلظت ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و بیشتر

از ترکیبات ذکر شده، از سویا به عنوان پرکننده‌گیاهی و به سبب خصوصیات کاربردی و تغذیه‌ای موجود در پروتئین‌های آن در محصولات گوشتی استفاده می‌گردد. علاوه بر این اهداف، دلایل اقتصادی و سلامت اصلی‌ترین دلایل افزودن سویا به محصولات گوشتی است (Abd El-Nasser *et al*., 2010). با این حال برخلاف ویژگی‌های خوب پروتئین سویا، در بسیاری از کشورها افزودن این پروتئین ممنوع و یا تا حد معینی مجاز شناخته شده است (Belloque *et al*., 2002). علی رغم این که سویا حاوی مواد مغذی بسیار ارزشمندی است و کارشناسان تغذیه هم بر مصرف آن تاکید زیادی دارند، ولی بدن عده‌ای از افراد نمی‌تواند این ماده‌ی غذایی را در خود بپذیرد. حداقل ۱۶ پروتئین در سویا وجود دارد که ممکن است واکنش‌های آلرژیک را برانگیخته سازند. واکنش‌های آلرژیک در ارتباط با مصرف سویا به دلیل آنتی بادی‌های موسوم به ایمونوگلوبین A، G یا M (IgA، IgG یا IgM) ایجاد می‌شوند و ممکن است از ۲ ساعت تا روزها پس از مصرف ماده غذایی بروز کنند. این واکنش‌ها ممکن است به صورت اختلال خواب، شب ادراری، عفونت گوش و سینوس‌ها، آبریزش بینی، تنگی نفس و یا علائم آنافیلاکسی رخ دهند. در سوئد پس از آن که دختری بعد از مصرف همبرگری که تنها حاوی ۲/۲٪ سویا بود، مرد، جستجوها برای یافتن علت مرگ آن دختر آغاز شد. تحقیقات ۳ ساله محققان سوئدی نشان داد که براستی سویای استفاده شده در تهیه همبرگر علت مرگ آن دختر بود، بنابراین افراد دارای حساسیت به سویا، باید این ماده‌ی غذایی را به کلی از رژیم غذایی خود حذف کنند (Daniel, 2004). بر همین اساس حضور این ترکیب در محصولات گوشتی نه تنها از قوانین برچسب-گذاری تبعیت می‌کند بلکه بر اساس استاندارد ملی ایران حضور این ترکیب در بعضی از محصولات گوشتی مجاز نمی‌باشد. بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۲۳۰۴، همبرگرهایی با ۷۴٪–۶۰٪ و ۹۵–۷۵٪ گوشت، باید بدون استفاده از سویا تهیه شوند (بی نام، ۱۳۸۶)، همچنین بر

Archive of SID

www.SID.ir

اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۶۹۳۸ استفاده از سویا و فرآورده‌های آن به هر مقدار در محصول کباب لقمه مجاز نمی‌باشد (بی‌نام، ۱۳۸۸).

تا به امروز، تنها راه موثر جهت پیشگیری از واکنش‌های مضر مرتبط با مواد غذایی آلرژی‌زا، پرهیز از مصرف مواد آلرژی‌زاست که این نیز نیازمند بیان صحیح و شفاف اجزای تشکیل دهنده محصولات و همچنین در دسترس بودن محصولاتی است که سهوا با مواد آلرژی‌زا آلوده نشده‌اند، می‌باشد (Gomes Galan *et al*., 2011). مشکل تعیین مواد آلرژی‌زای پنهان و بیان نشده در غذا بزرگترین نگرانی هم مصرف‌کنندگان و هم صنعت مواد غذایی است. به علت رشد واکنش‌های آلرژیک، داشتن روش‌های سریع و قابل اعتماد برای تعیین ماده آلرژن در محصولات غذایی فرآوری شده لازم و ضروری است (Slowianek & Majak, 2011). امروزه تکنیک‌های بر پایه DNA به خوبی توانسته‌اند کاربرد خود را در این زمینه اثبات کنند. از مهمترین تکنیک‌های بر پایه DNA می‌توان به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR[1]) اشاره کرد. روش‌های مختلف بر پایه PCR، بخاطر اختصاصی بودن، صحت، دقت و سرعت بالا، زمان پروسه کم و هزینه پایین آنها به عنوان ابزاری مفید برای شناسایی مواد اولیه در منابع غذایی ارائه گردیده‌اند (Jonker *et al*., 2008; Sawyer *et al*., 2003). در همین راستا Meyer و همکارانش در سال ۱۹۹۶، یک آزمون Nested PCR را برای شناسایی سویا در محصولات گوشتی فرآوری شده، ارائه کردند. برای این منظور جهت تکثیر DNA با آزمون PCR، دو جفت پرایمر از ژن لکتین سویا طراحی گردید که قطعات ۴۱۴ bp و ۱۱۸ bp را تولید می‌کردند. نتایج نشان داد که پروتکل ارائه شده قادر به تعیین کمتر از ۱٪ سویای هیدرولیز شده و ۰/۰۱٪ سوسپانسیون سویا در گوشت (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) می‌باشد (Meyer *et al*., 1996).

Abd El-Nasser و همکاران در سال ۲۰۱۰، مطالعه‌ای را با هدف تعیین سویای طبیعی و دستورزی شده در محصولات گوشتی با آزمون PCR انجام دادند. نتایج پژوهش این نویسندگان نشان داد که آزمون PCR بهینه‌سازی شده قادر به تعیین سویا در سطح ۱۲٪، ۳۰٪ و ۲۰٪ به ترتیب در کوفته خام، سوسیس و برگر تهیه شده از گوشت گاو می‌باشد. همچنین نتایج نشان داد که با آزمون PCR ۱۰۰٪ سویا طبیعی و ۶۹٪ سویای دستورزی شده در برگرهای تهیه شده از گوشت گاو قابل تعیین می‌باشد.

بر همین اساس هدف این مطالعه در مرحله نخست، توسعه یک آزمون PCR جهت شناسایی سویا بود. سپس وجود پروتئین گیاهی سویا به عنوان یک ماده حساسیت‌زا در محصولات گوشتی تجاری خام و حرارت دیده با استفاده از آزمون PCR توسعه یافته، مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت نتایج بدست آمده از آزمون با اظهارات برچسب محصولات گوشتی مورد مطالعه، مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

- تهیه نمونه‌ها

نمونه سویا از پژوهشگاه ملی ژنتیک تهیه گردید. به منظور ارزیابی آزمون توسعه یافته، ۵ محصول گوشتی مختلف شامل سوسیس (۴ برند)، کالباس (۶ برند)، همبرگر (۵ برند)، کباب لقمه (۴ برند) و ناگت مرغ (۳ برند) از ۴ مرکز خرید در سطح تهران خریداری و با Cooling box به آزمایشگاه منتقل گردیدند. مشخصات محصولات مورد بررسی از نظر ترکیبات ذکر شده بر روی برچسب محصولات در جدول ۱ آورده شده است. همه محصولات تا قبل از استخراج DNA، در C °۲۰- جهت جلوگیری از تخریب آنزیمی نگهداری شدند.

- استخراج DNA

استخراج DNA از نمونه‌های گیاهی و حیوانی مورد مطالعه با استفاده از کیت‌های ایرانی MBST مخصوص بافت‌های گیاهی و حیوانی و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده صورت پذیرفت (گروه پژوهشیMBST، تهران، ایران). عملکرد این کیت به این صورت است که ابتدا بافت با بافر لیزکننده و آنزیم پروتئیناز K متلاشی شده و سپس محلول سلول‌های متلاشی شده از یک یا دو ستون فیلتردار عبور داده می‌شود. DNA به فیلتر می‌چسبد، سپس ستون با یک بافر جهت حذف ممانعت‌کننده‌های PCR شسته شده و DNA از نمک‌ها، پروتئین‌ها و بقایای سلولی عاری

[1] Polymerase Chain Reaction

Archive of SID

www.SID.ir

می‌شود. در پایان، DNA خالص بدست می‌آید. برای تعیین خلوص DNA از روش طیف‌سنجی (spectrophotometery) (اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر) استفاده گردید و نمونه‌هایی با خلوص ۲-۱/۷ به عنوان نمونه‌های قابل قبول در آزمون‌های PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

- پرایمرهای الیگونوکلئوتید

در مطالعه حاضر، پرایمر اختصاصی سویا از ژن لکتین سویا طراحی (Meyer *et al*., 1996) و جهت سنتز به شرکت فزاپژوه سفارش داده شد (شرکت فناوری زیستی فزاپژوه، تهران، ایران) که توالی آنها در جدول ۲ قابل مشاهده می‌باشد.

- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز:

بهینه سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به منظور تکثیر قطعه ۱۱۸ جفت بازی برای سویا صورت پذیرفت. برای این منظور واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ×۱۰، ۱/۲ میکرولیتر از 100 $MgCl_2$ میلی مولار، ۰/۶ میکرولیتر dNTP (با غلظت ۱۰ میلی مولار از هر نوکلئوتید)، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمرهای Forward و Reverse سویا (با غلظت۱۰ پیکومول)، ۰/۳ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (۵۰۰U) ، ۱ میکرولیتر از DNA خالص استخراجی و آب دیونیزه دوبار تقطیر شده جهت رساندن به حجم صورت پذیرفت. تمامی آزمایشات حداقل با ۳ تکرار انجام شد. کنترل مثبت و منفی در کنار همه‌ی آزمون‌ها انجام پذیرفت. کنترل منفی از طریق انجام آزمون بدون حضور DNA و کنترل مثبت با حضور DNA هدف و جهت اطمینان از اینکه اجزای به کار رفته در بهترین شرایط هستند صورت پذیرفت. برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر تحت شرایط زیر بدست آمد:

جدول ۱- مشخصات محصولات گوشتی مورد بررسی

نام اختصاری محصول	محتویات
سوسیس برند A	گوشت قرمز۷۰٪، روغن، شیرخشک، گلوتن، ادویجات ،افزودنی‌های مجاز
سوسیس برند B	گوشت قرمز۷۰٪، روغن مایع، ادویجات، نمک طعام، شیرخشک
سوسیس برند C	گوشت قرمز۷۰٪، آب، روغن مایع،شیرخشک، گلوتن، ادویجات، نشاسته، نمک، لاکتات سدیم
سوسیس برند D	گوشت قرمز۷۰٪، روغن مایع پودر تخم‌مرغ، شکر،سیر، نشاسته اسیدآسکوربیک، شیرخشک، فسفات و نیتریت‌سدیم ، نمک و ادویه
کالباس برند A	گوشت قرمز۶۰٪، آرد، گلوتن، نشاسته، فسفات، روغن مایع، شیرخشک، سیر، نمک، اسیدآسکوربیک، یخ،آب، ادویه
کالباس برند B	گوشت قرمز۶۰٪، آب،روغن، نشاسته، آرد گندم، گلوتن، نمک، شیرخشک، ادویجات، پلی‌فسفات‌سدیم، اسیدآسکوربیک، نیتریت‌سدیم
کالباس برند C	گوشت گوساله ۹۰٪، نشاسته، ادویجات، افزودنی مجاز
کالباس برند D	گوشت قرمز۷۰٪، روغن مایع، ادویجات، نمک طعام، شیرخشک
کالباس برند E	گوشت قرمز۹۰٪،روغن مایع، نشاسته، کازئینات سدیم، نمک، فسفات‌سدیم، ادویجات، ویتامین ث
کالباس برند F	گوشت گوساله ۹۰٪، نشاسته، ادویجات، افزودنی مجاز
همبرگر برند A	گوشت قرمز۶۰٪، پیاز، نمک، ادویجات، آرد سوخاری، بدون سویا
همبرگر برند B	گوشت قرمز۳۰٪، پیاز، نمک، ادویه، روغن، آردسوخاری، سویا، آب ، یخ
همبرگر برند C	گوشت قرمز۹۰٪، پیاز، نمک و ادویه
همبرگر برند D	گوشت گوساله۶۰٪، پیاز، روغن مایع، آرد سوخاری، نمک و ادویه
همبرگر برند E	گوشت گوساله تازه ۷۵٪، پیاز، آردسوخاری، نمک و ادویه
کباب لقمه برند A	گوشت قرمز۷۰٪، تخم‌مرغ، پیاز، آردسوخاری،نمک، ادویجات
کباب لقمه برند B	گوشت قرمز۷۰٪،پیاز، نمک، روغن گیاهی، ادویه، بدون سویا
کباب لقمه برند C	گوشت قرمز۷۰٪، پیاز، آردسوخاری، نمک و ادویه
کباب لقمه برند D	گوشت ۳۰٪، پیاز، نمک، ادویه،آردسوخاری، پروتئین گیاهی و روغن مایع
ناگت مرغ برند A	گوشت مرغ۷۵٪پودر سوخاری، روغن، شیرخشک، تخم مرغ، طعم‌دهنده، نمک و ادویجات
ناگت مرغ برند B	گوشت مرغ۷۰٪، آردسوخاری، آرد سفید، ایزوله سویا، روغن مایع،نمک، تخم مرغ، نشاسته، ادویه، سیر
ناگت مرغ برند C	گوشت مرغ۷۰٪، آردسوخاری، نشاسته اصلاح شده، تخم مرغ، پیاز، صمغ خوراکی، ادویجات، روغن مایع، نمک، فیبرگندم و ترکیبات مجاز خوراکی

جدول ۲- اطلاعات مربوط به پرایمرهای سویا

نام پرایمر	توالی(۳'<—— ۵')	طول قطعه تکثیرشونده(bp)	نقطه ذوب(Tm (˚c
F GMO3	GCCCTCTACCTCCACCCCATCC	۱۱۸	۷۰
R GMO4	GCCCATCTGCAAGCCGTGTTTTT		

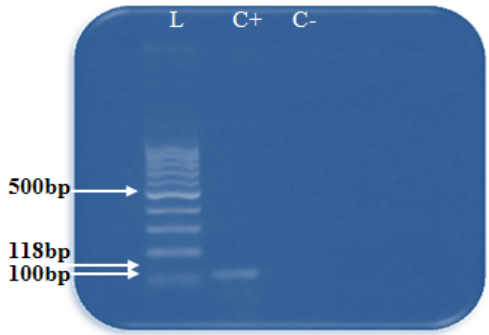
Archive of SID

www.SID.ir

دناتوراسیون ابتدایی ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه، به دنبال آن چرخه میانی با ۳۰ سیکل تکرار (دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه، طویل سازی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه) و طویل سازی نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه.

یافته‌ها

نتایج نشان داد کیت MBST بکار رفته جهت استخراج DNA و حذف بازدارنده‌های آزمون PCR، کیتی مناسب و کارآمد می‌باشد. تحت شرایط بهینه‌سازی شده و برنامه دمایی تنظیم شده برای پرایمر سویا ، قطعه‌ای با طول مشخص ۱۱۸ جفت بازی تکثیر یافت که نتیجه آن در شکل ۱ قابل مشاهده است. به منظور ارزیابی آزمون PCR بهینه سازی شده، روش توسعه یافته در محصولات گوشتی سوسیس، کالباس، کباب لقمه، همبرگر و ناگت مرغ بکار گرفته شد که نتایج آن‌ها به ترتیب در شکل‌های ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ قابل مشاهده می‌باشند.

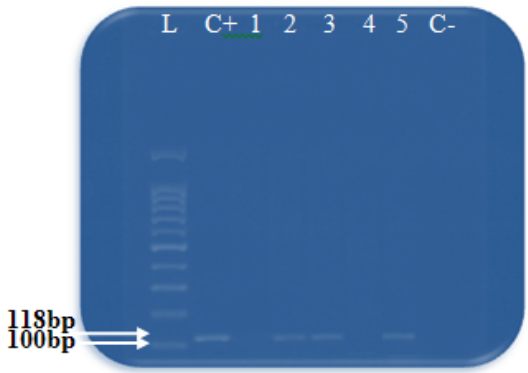


شکل ۱- نتایج حاصل از بهینه‌سازی آزمون PCR برای پرایمر اختصاصی سویا (L : Ladder bp ۱۰۰-۱۰۰۰، C+: کنترل مثبت پرایمر سویا، C-: کنترل منفی)

شکل۲ - شناسایی سویا در محصولات سوسیس (L : Ladder bp ۱۰۰-۱۰۰۰، C+: کنترل مثبت پرایمر سویا، ۱: سوسیس برند A ، ۲: سوسیس برندB ، ۳: سوسیس برند C، ٤: سوسیس برند D، C-: کنترل منفی)

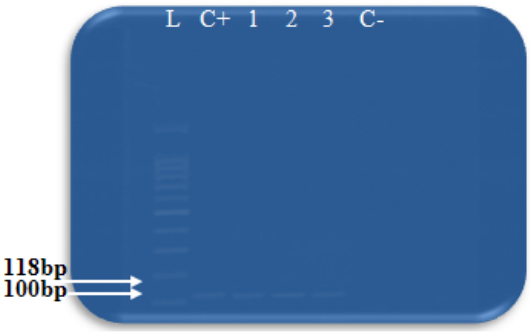
شکل۳- شناسایی سویا در محصولات کالباس (L : Ladder bp ۱۰۰-۱۰۰۰، C+: کنترل مثبت پرایمر سویا، ۱:کالباس برند A، ۲: کالباس برندB، ۳: کالباس برند C، ٤: کالباس برند D، ۵: کالباس برند E، ٦: کالباس برند F، C-: کنترل منفی)

شکل٤- شناسایی سویا در محصولات کباب‌لقمه (L : Ladder p ۱۰۰-۱۰۰۰، C+: کنترل مثبت پرایمر سویا،۱:کباب‌لقمه برند A، ۲: کباب‌لقمه برندB، ۳: کباب‌لقمه برند C، ٤: کباب‌لقمه برند D، C-: کنترل منفی)



شکل۵- شناسایی سویا در محصولات همبرگر (L : Ladder bp ۱۰۰-۱۰۰۰، C+: کنترل مثبت پرایمر سویا،۱: همبرگر برند A، ۲: همبرگر برندB ، ۳: همبرگر برند C، ٤: همبرگر برند D، ۵: همبرگر برند E، C-: کنترل منفی)

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ٦- شناسایی سویا در محصولات ناگت مرغ
(L : Ladder ۱۰۰۰bp-۱۰۰، C+: کنترل مثبت پرایمر سویا، ۱: ناگت مرغ برند A ، ۲: ناگت مرغ برندB ، ۳: ناگت مرغ برند C، C-: کنترل منفی)

بحث

امروزه آلرژی‌های غذایی به عنوان یک مشکل سلامت همگانی در دنیا مطرح می‌باشند. به سبب رشد فزاینده‌ی واکنش‌های آلرژیک، داشتن روش‌های سریع، دقیق و قابل اعتماد برای تعیین مواد آلرژن در محصولات غذایی فرآوری شده ضروری است. مطالعه حاضر نیز در همین راستا به بهینه‌سازی آزمون PCR جهت شناسایی سویا به عنوان ماده آلرژن بکار رفته در محصولات گوشتی تجاری پرداخت. استخراج DNA از نمونه‌های گیاهی و حیوانی با استفاده از کیت ایرانی MBST و به دنبال آن الکتروفورز ژل آگارز جهت بررسی DNA استخراج شده، مناسب بودن این کیت را در استخراج موفقیت آمیز DNA از نمونه‌های مورد بررسی تایید می‌کرد. از مزایای استفاده ازکیت MBST می‌توان به آماده استفاده بودن کیت، پاسخ دهی در زمان کوتاه، تولید در کشور، قیمت پایینتر نسبت به کیت‌های مشابه خارجی، برطرف کردن پیچیدگی و خطر استخراج به روش دستی اشاره کرد. در مرحله بعد پرایمر خاص سویا سفارش داده شد و شرایط آزمون PCR برای تکثیر قطعه خاص با طول مشخص بهینه‌سازی گردید. تحت شرایط بهینه‌سازی شده قطعه DNA از ژن لکتین سویا با طول ۱۱۸ جفت بازی برای سویا تکثیر یافت که با نتایج بدست آمده از تحقیق Meyer و همکاران در سال ۱۹۹۶ تطابق داشت (شکل۱). پیش از این نیز Rott و همکاران در سال ۲۰۰۳ و Randhawa و Firke در سال ۲۰۰۶، توانستند در تحقیقات خود، قطعه ۱۱۸ جفت بازی متعلق به لکتین سویا را با آزمون PCR تکثیر دهند. در نهایت این تکنیک به طور موفقیت‌آمیزی برای شناسایی سویا در محصولات گوشتی تجاری مورد استفاده قرار گرفت و نتایج آزمون PCR بکار رفته با اظهارات برچسب محصولات گوشتی تجاری مقایسه شد(جدول ۳). نتایج نشان داد که از بین محصولات مورد بررسی بجز کالباس برند A، C، D و E، همبرگر برند A و کباب لقمه برند A، همگی حاوی پروتئین گیاهی سویا بودند. در میان محصولاتی که در آنها سویا شناسایی شده بود تنها همبرگر برند B و ناگت برند B به وجود سویا در برچسب محصول خود اشاره داشتند در حالیکه بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره‌های ۲۱۳۵ و حداقل ضوابط برچسب‌گذاری مواد غذایی اعلام شده توسط وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی معاونت غذا و دارو به شماره PEI/CrV1/0029 ، سویا و فرآورده‌های آن به عنوان مواد حساسیت‌زای شدید برای برخی افراد شناخته شده‌اند و باید بر روی برچسب محصولات اعلام شوند. همچنین لازم به ذکر است که در میان محصولات مورد بررسی، محصولات همبرگر برند A و کباب‌لقمه برند B از عنوان " بدون سویا" در کنار نام محصول خود استفاده کرده بودند که نتایج این تحقیق نشان داد در مورد محصول همبرگر برند A این عنوان به درستی به کار برده شده بود در حالیکه در مورد محصول کباب لقمه برند B، سویا شناسایی شد و این ادعا رد گردید. بنابراین تحت شرایط بهینه‌سازی شده، مشخص شد که وجود ماده آلرژن سویا به درستی در برچسب بعضی از محصولات اعلام نشده است، نتایج این تحقیق در محصولات گوشتی مختلف، کاربرد آزمون PCR در شناسایی ماده آلرژن سویا، حتی در محصولات غذایی تهیه شده تحت شرایط مختلف فرآوری را تایید می‌کرد. در همین راستا، Rott و همکاران در سال ۲۰۰۳ حضور سویا در انواع محصولات غذایی تهیه شده با روش‌های مختلف فرآوری را با آزمون PCR مورد بررسی قرار دادند. همچنین Marcelino و همکاران در سال ۲۰۰۸ باقیمانده سویا را در محصولات سوسیس با آزمون PCR و Realtime PCR تعیین کردند. Soares و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰، توانستند یک آزمون PCR را توسعه دهند که قادر به تعیین مقادیر جزئی سویا در محصولات سوسیس بود. مشاهده باندهای مربوط به سویا در محصولات حرارت دیده مورد بررسی (سوسیس، کالباس و ناگت) و حرارت ندیده (کباب لقمه و همبرگر) این مطلب را تایید می‌کرد که تیمارها و

Archive of SID

www.SID.ir

مواد اولیه‌ی به کار رفته برای آماده‌سازی امولسیون محصولات، اثر مضری روی تکثیر PCR جهت شناسایی سویا نداشتند این ممکن است به دلیل پایداری حرارتی و تعداد زیاد کپی DNA در بافت و کوتاه بودن طول قطعه موردنظر باشد که به باقی ماندن یک تعداد کافی از کپی-های DNA حتی زمانی که تحت شرایط شدید فرآوری قرار می‌گیرند کمک کند. این مطلب در تحقیق انجام شده توسط Abd El-Nasser و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نیز ذکر گردید.

نتیجه‌گیری

تا به امروز، تنها راه موثر جهت پیشگیری از واکنش‌های مضر مرتبط با مواد غذایی آلرژی‌زا، پرهیز از مصرف مواد آلرژی‌زاست که این نیز نیازمند بیان صحیح و شفاف اجزای تشکیل دهنده محصولات و همچنین در دسترس بودن محصولاتی است که سهوا با مواد آلرژی‌زا آلوده نشده‌اند، می‌باشد. به علت رشد واکنش‌های آلرژیک، داشتن روش‌های سریع و قابل اعتماد برای تعیین مواد حاوی ترکیبات آلرژن در محصولات غذایی فرآوری شده لازم و ضروری است. در این خصوص روش‌های مختلف بر پایه PCR، به دلیل داشتن ویژگی‌هایی چون صحت، دقت و سرعت بالا، زمان پروسه کم و هزینه پایین به‌عنوان ابزاری مفید جهت شناسایی ترکیبات اولیه در محصولات غذایی معرفی گردیده‌اند (Jonker *et al*., 2008; Sawyer *et al*., 2003). نتایج بدست آمده از آزمون PCR در رابطه با محصولات مورد بررسی در این مطالعه نشان داد که ۱۰۰٪ محصولات سوسیس، ۳۳٪ محصولات کالباس، ۶۰٪ محصولات همبرگر، ۷۵٪ محصولات کباب‌لقمه و۱۰۰٪ محصولات ناگت مرغ، باند ۱۱۸ جفت بازی متعلق به سویا را ظاهر ساختند در حالیکه مقایسه این نتایج با اظهارات برچسب آن محصولات نشان داد ۱۰۰٪ محصولات سوسیس، ۳۳/۳۳٪ محصولات کالباس، ۴۰٪ محصولات همبرگر، ۷۵٪ محصولات کباب لقمه و ۶۶/۶٪ محصولات ناگت مرغ، به حضور سویا در برچسب خود اشاره‌ای نداشتند. نتایج این تحقیق نشان داد که آزمون PCR توسعه یافته در مطالعه‌ی حاضر، یک روش سریع، حساس، قابل اعتماد و مقرون به صرفه برای شناسایی سویا به عنوان یک ماده حساسیت‌زا در محصولات گوشتی ساخته شده تحت شرایط فرآوری مختلف می‌باشد که می-تواند در آزمایشگاه‌های کنترل کیفیت محصولات گوشتی مورد استفاده قرار گیرد.

جدول ۳- مقایسه نتایج بدست آمده با آزمون PCR توسعه یافته و اظهارات برچسب محصولات گوشتی از نظر وجود یا عدم وجود سویا

نام محصول	مقایسه نتایج	
	نتایج آزمون PCR	اظهارات برچسب محصولات
سوسیس برند A	√	×
سوسیس برند B	√	×
سوسیس برند C	√	×
سوسیس برند D	√	×
کالباس برند A	×	×
کالباس برند B	√	×
کالباس برند C	×	×
کالباس برند D	×	×
کالباس برند E	×	×
کالباس برند F	√	×
همبرگر برند A	×	×
همبرگر برند B	√	√
همبرگر برند C	√	×
همبرگر برند D	×	×
همبرگر برند E	√	×
کباب لقمه برند A	×	×
کباب لقمه برند B	√	×
کباب لقمه برند C	√	×
کباب لقمه برند D	√	×
ناگت مرغ برند A	√	×
ناگت مرغ برند B	√	√
ناگت مرغ برند C	√	×

(×= نبود سویا ، √= وجود سویا)

Archive of SID
www.SID.ir

سپاسگزاری

در پایان نویسندگان این مقاله از جناب آقای مهندس احسان انصاری دزفولی و شرکت دانا ژن پژوه به سبب فراهم آوردن امکانات لازم جهت انجام و به ثمر رسیدن این تحقیق تشکر و قدرانی می‌نمایند.

منابع

بی نام. (۱۳۸۶). همبرگر خام منجمد–ویژگی‌ها. استاندارد ملی ایران، شماره ۲۳۰۴. تجدید نظر سوم.

بی نام. (۱۳۸۸). کباب لقمه خام منجمد–ویژگی‌ها. استاندارد ملی ایران، شماره ۶۹۳۸، تجدید نظر اول.

بی نام. (۱۳۸۹). بسته بندی– ویژگی‌های عمومی برچسب‌گذاری مواد غذایی از پیش بسته‌بندی شده. استاندارد ملی ایران، شماره ۲۱۳۵، تجدید نظر اول.

بی نام. (۱۳۸۸). حداقل ضوابط برچسب‌گذاری مواد غذایی، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی– معاونت غذا و دارو. شماره PEI/CrV1/0029، بازنگری اول.

Abdel-Nasser, M., Labieb, H. Y. & Abdel-Aziz, D. M. (2010). Detection of native and modified soybean in some meat products in assiut city, Egyptass. Univ. Bull. Environ. Res, 13(1).

Belloque, J., García, M. C., Torre, M. & Marina, M. L. (2002). Analysis of Soyabean Proteins in Meat Products:A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 42(5), 507–532.

Bryan, G. J., Dixon, A., Gale, M. D. & Wiseman, G. (1998). A PCR based methods for detection of hexaploid wheat adulteration of durum wheat and pasta. Journal of Cereal Science, 28(2), 138- 145.

Daniel, K. T. (2004). The Hidden Dangers of Soy Allergens. Nexus Magazine, 11(5), pp. 1-15.

Gomez Galan, A. M., Brohee, M., Andrade Silva, E., van Hengel, A. J. & Chassaigne, H. (2011). Development of a real-time PCR method for the simultaneous detection of soya and lupin mitochondrial DNA as markers for the presence of allergens in processed food. Food Chemistry, 127(2), 834–841.

Jonker, K. M., Tiburg, J. J. H. C., Hagele, G. H. & De boer, E. (2008). Species identification in meat products using real-time PCR. Food Additives and Contaminants, 25(5), 527-533.

Marcelino, F. C., Guimaraes, M. F. M. & De-Barros, E. G. (2008). Detection and quantification of Roundup Ready® soybean residuesin sausage samples by conventional and real-time PCR. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 28, 38-45.

Meyer, R., Candrian, U. & Luthy, J. (1996). Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, 203, 339–344.

Poms, R. E., Klein, C. L. & Anklam, E. (2004). Methods for allergen analysis in food: A review. Food Additives and Contaminants, 21(1), 1–31.

Randhawa, G. J. & Firke, P. K. (2006). Detection of transgenes in genetically modified soybean and maize using polymerase chain reaction. Indian Journal of Biotechnology, 5, 510-513.

Rott, M., Lawrence, T. S., Wall, E. M. & Green, M. J. (2004). Detection and Quantification of Roundup Ready Soy in Foods by Conventional and Real-Time Polymerase Chain Reaction. J. Agric. Food Chem, 52(16), 5223-5232.

Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout, S. & McDowell, D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. Food Control, 14(8), 579–583.

Słowianek, M. & Majak, I. (2011). Methods of allergen detection based on DNA analysis. Biotechnology and Food Science. Biotechnol Food Sci, 75 (2), 39-44.

Soares, s., Mafra, I., Amara, J. S. & Oliveira, M. B. P. P. (2010). A PCR assay to detect trace amounts of soybean in meat sausages. International Journal of Food Science and Technology, 45(12), 2581–2588.

The European Parliament and the Council of the European Union. (2003). Directive 2003/89/EC of the European Parliament and of the Council of 10 November 2003 amending Directive 2000/13/EC as regards indication of the ingredients present in foodstuffs. O.V. J. Eur Union L, 308, 15–18.

Tilley, M. (2003). PCR amplification of wheat sequences from DNA extracted during milling and baking. Cereal Chem, 81(1), 44-47.

Archive of SID

www.SID.ir