مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال نهم، شماره 2، تابستان 1393، صفحات 18-11

شناسایی تقلب شیر گاو در پنیرهای گوسفندی (برند لیقوان) از طریق PCR اختصاصی

فرزانه تفویضی[1]، سید حسین هلالات[2]

1- نویسنده مسئول: استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران، پست الکترونیکی: Tafvizi@piau.ac.ir
2- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 92/7/7 تاریخ پذیرش: 92/10/3

چکیده

سابقه و هدف: روش‌های مولکولی از جمله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز قادر به شناسایی و تمایز شیر گونه‌های نزدیک به هم (گاو و گوسفند) در محصولات لبنی می‌باشند. هدف از تحقیق حاضر، توسعه روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت شناسایی تقلب شیر گاو در پنیرهای گوسفندی (برند لیقوان) و تأیید برچسب حک شده بر روی محصولات می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، 18 پنیر با برچسب 100% گوسفندی از سوپر مارکت‌های شهر تهران جمع آوری شد. استخراج DNA ژنومی از پنیرها صورت گرفت. واکنش PCR جهت شناسایی DNA گاو در پنیرهای گوسفندی با استفاده از پرایمر مختص ژن سیتوکروم b میتوکندریایی بهینه‌سازی شد و نتایج بر روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: واکنش بهینه سازی شده PCR بر اساس تکثیر ژنوم میتوکندریایی، سبب تکثیر قطعه 274 bp با DNA گاوی و قطعه 336bp با DNA گوسفندی گردید. نتایج نشان داد که از 18 برند پنیر گوسفندی مورد مطالعه، 11 برند دارای شیر گاو بودند که برخلاف برچسب اعلام شده بر روی محصولات می‌باشد. این امر تقلب انجام یافته توسط شرکت تولید کننده را به اثبات می‌رساند.

نتیجه گیری: روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، روش بسیار دقیق، سریع و آسان جهت شناسایی تقلبات موجود در پنیر گوسفندی و سایر محصولات لبنی می‌باشد.

واژگان کلیدی: پنیر گوسفندی، سیتوکروم b میتوکندریایی، واکنش زنجیره ای پلی‌مراز

• مقدمه

شناسایی شیرگونه حیوانی بکار رفته در محصولات لبنی از جمله مسائل مهم در مورد ارزیابی ارزش ترکیبات غذایی و تهیه اطلاعات دقیق برای مصرف کننده است. مراقبت و نظارت بر عدم تعویض و جایگزینی محصولات گونه‌های مختلف و یا مخلوط کردن آن‌ها با هم از جنبه‌های مختلف مذهبی، سلامت عمومی، اجتماعی و قوانین دولتی بسیار مهم تلقی می‌شود. از جنبه سلامت عمومی می‌توان به ایجاد واکنش‌های آلرژی‌زا به بعضی پروتئین‌های حیوانی در برخی افراد و وجود پاتوژن‌های آلرژی زای خاص گونه حیوانی اشاره کرد. لذا درج اطلاعات بر روی برچسب محصولات غذایی می‌بایست دقیق باشد تا مصرف کننده بتواند انتخاب آگاهانه در مورد رژیم غذایی خود و محصول مصرفی داشته باشد (2، 1). پنیر از جمله محصولات لبنی است که در تهیه آن می‌توان از شیرهای گونه‌های مختلف حیوانی استفاده نمود. در پاسخ به افزایش مطالبه برای شفافیت در تجارت مواد غذایی، قوانین اروپا (و بسیاری کشورها) تولید کنندگان را ملزم به اعلام نوع شیر مصرف شده جهت تولید پنیر یا سایر فراورده‌های شیری خود کرده است (3). ریشه تولید پنیر لیقوان به دهستان لیقوان در دامنه‌های شمالی سهند در 20 کیلومتری باسمنج و 30 کیلومتری جنوب شرقی تبریز در جوار رودخانه‌ای به نام لیقوان چای بر می‌گردد و این پنیر تنها از شیر گوسفند تولید می‌شود که با توجه به قیمت بالاتر آن نسبت به شیر گاو، استفاده از شیر گاو برای کسب سود بیشتر توسط سودجویان می‌تواند صورت گیرد که توسط مصرف کنندگان قابل تمیز نمی‌باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

روش‌های مختلفی برای شناسایی نوع شیر بکار رفته در محصولات لبنی وجود دارد. از آن جمله، می‌توان به روش‌های ایمونولوژیکی، الکتروفورتیک و تکنیک‌های کروماتوگرافی اشاره کرد. در این میان انواع روش‌های الکتروفورز (4)، HPLC (5) و ELISA (6) در اروپا به طور گسترده برای شناسایی شیر گاو استفاده شده اند. اگرچه روش‌های ایمونولوژیک و الکتروفورتیک همیشه نمی توانند شیر گونه‌های نزدیک به یکدیگر مانند گاو و بوفالو یا بز و گوسفند را از یکدیگر تشخیص دهند و اغلب برای شناسایی مواد حرارت دیده مناسب نیستند. روش‌های کروماتوگرافی نیز تنها قادر به شناسایی اختلاف چند درصدی از اسیدهای چرب می‌باشد (7). در سال‌های اخیر روش‌های مولکولی برای شناسایی گونه‌های مختلف به کار گرفته شده‌اند و ثابت شده که قابل اعتماد، حساس و سریع هستند که در این میان واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) به طور گسترده و بیش از سایر تکنیک‌های مولکولی برای تشخیص گونه حیوانی بکار رفته در مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفته است (8). البته بررسی تصدیق محصولات لبنی در مقایسه با سایر مواد غذایی مثل گوشت و ماهی کمتر به وسیله PCR بررسی شده است (9). مطالعات نشان داده که می‌توان از شیر به دلیل دارا بودن سول‌های سوماتیکی، لکوسیت‌ها و سلول‌های اپیتلیال غدد شیری به عنوان منبع DNA جهت استفاده در آزمایشات مولکولی از جمله PCR استفاده نمود (10-12).

هدف از این مطالعه بهینه سازی واکنش Specific-PCR برای تکثیر ژن‌های میتوکندریایی گونه‌های گاوی و گوسفندی، جهت بررسی تقلبات احتمالی در پنیرهای گوسفندی صنعتی موجود در بازار می‌باشد.

• مواد و روش‌ها

نمونه برداری: 18 برند مختلف پنیر از سراسر استان تهران جمع آوری شد و از 1 تا 18 شماره‌گذاری شدند. از شیر گاو و گوسفند نیز به عنوان کنترل مثبت (شاهد) استفاده شد. نمونه‌ها در یخچال تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند.

استخراج DNA: 0/9 گرم از هرنمونه در میکروتیوپ‌های 1/5 ml جداگانه قرار داده شد. بعد 600 µl از بافر استخراج (CTAB) شامل (1M Tris HCL pH 8.0, 4M NaCL, 0.5M EDTA pH 0.8, 2g CTAB) و 50 میکرولیتر از پروتئیناز K (20ng/µl) برند ویوانتیس به آن اضافه شد و داخل بن ماری 65°C به مدت 3 ساعت قرار داده شد. لازم به ذکر است تمامی مواد مورد استفاده در بافر استخراج متعلق به برند مرک بودند. پس از خروج میکروتیوپ‌ها از بن ماری نمونه‌ها در 12000 rpm و دمای 4 °C به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شدند.

در این مرحله، فاز رویی هر یک از نمونه‌ها جداسازی شد و به میکروتیوپ دیگری منتقل گردید. به هر یک از میکروتیوپ‌ها و هم حجم فاز رویی کلرفرم سرد افزوده شد و سپس 16 ثانیه ورتکس گردید، سپس در سانتریفوژ 12000rpm در دمای 4 °C به مدت 10 دقیقه قرارگرفت. پس ازسانتریفوژ، لایه بالایی برداشته شد و برابر حجم فاز رویی، مجدداً کلروفرم سرد افزوده شد و مانند مرحله اول 16 ثانیه ورتکس گردید و بعد از 10 دقیقه سانتریفوژ (مطابق مرحله اول)، فاز رویی برداشته شد و به میکروتیوپ دیگری منتقل شد. سپس هم حجم فاز برداشته شده ایزوپروپانول سرد به این فاز افزوده شد و 15 تا 20 دقیقه به آرامی اینورت (invert) گردید سپس در سانتریفوژ 12000rpm در دمای 4 °C به مدت 10 دقیقه قرار گرفت. بعد، کل محتوای میکروتیوپ تخلیه گردید.

در هر میکروتیوپ 200 µl اتانل 70% سرد اضافه شد. بعد از 10 دقیقه اینورت کردن بسیار آرام، در سانتریفوژ 12000 rpm در دمای 4 °C به مدت 10 دقیقه قرار داده شد تا DNA غیر محلول رسوب نماید. بعد کل محتویات را خالی کرده و میکروتیوپ در یک انکوباتور 45 °C به مدت 20 دقیقه قرار داده شد تا اتانول باقی مانده خشک شود. سپس جهت حل نمودن رسوب DNA، 50 µl آب مقطر تزریقی به آن اضافه شد و به مدت یک شب در یخچال قرار گرفت تا DNA فرصت انحلال بیشتری در آب پیدا کند. پس از ارزیابی DNA استخراج شده، به فریزر 20- تا انجام واکنش‌های بعدی PCR انتقال داده شدند. استخراج DNA بر اساس روش Sambrook و همکاران (1989) با اعمال تغییرات انجام گردید (13).

پرایمرهای الیگونوکلئوتید: پرایمرهای اختصاصی برای ژن سیتوکروم b گونه‌های گاو و گوسفند جهت تشخیص دو گونه فوق در نمونه‌ها، انتخاب گردید. توالی پرایمرها در جدول 1 ارائه شده است (14). توالی پرایمرهای مورد نظر جهت سنتز به شرکت تکاپو زیست سفارش داده شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 1. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن سیتوکروم b گاو و گوسفند

گونه	ژن	توالی پرایمرها	وزن مولکولی (bp)	رفرانس
Bovis	cytochrome b	5´CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG3' 5´GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCT TGATGAAA3´	274	Matsunaga et al. (1999) (14)
Ovis	cytochrome b	5´CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG3' 5'CTATGAATGCTGTGGCTATTGTCGCA3'	336	Matsunaga et al. (1999) (14)

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز: در ابتدا جهت تعیین اختصاصی بودن پرایمرهای ویژه گونه‌های گاو و گوسفند، نمونه شاهد (شیر گاو و گوسفند) مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور، PCR اختصاصی با پرایمر خاص هر گونه و همراه با DNA همان گونه انجام شد. برای اطمینان از عدم واکنش متقاطع پرایمرها با گونه‌های مورد مطالعه (cross reaction)، پرایمر اختصاصی گاو با DNA گوسفند و پرایمر اختصاصی گوسفند با DNA گاو طی واکنش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس واکنش نهایی PCR بر روی نمونه‌های پنیر انجام شد. واکنش PCR در حجم نهایی 25 µl شامل، 12/5 µl میکرولیتر از Amplicon Master Mix، 0/5 µl از پرایمرها (0/4 µl میکرومولار) و 50 ng از DNA نمونه‌های استخراج شده انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad, USA) طبق چرخه دمایی مرحلهٔ دناتوراسیون ابتدایی در 95 °C برای 1 دقیقه، 30 چرخه به شرح زیر برنامه ریزی شد: 94 °C برای 1 دقیقه، 65°C برای 1 دقیقه، 72 °C برای 90 ثانیه و مرحله گسترش نهایی در 72 °C برای 5 دقیقه انجام گرفت. محصول PCR بر روی ژل آگارز 2% شامل بافر 1X TBE بارگزاری شد و توسط دستگاه ژل داک عکسبرداری گردید.

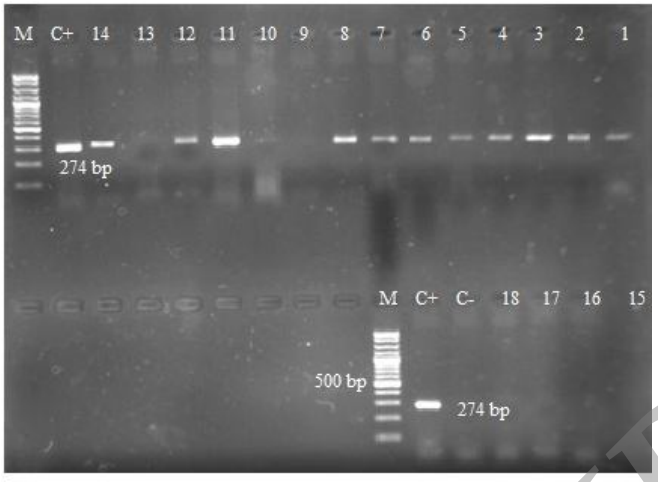
• یافته‌ها

ارزیابی استخراج DNA: نتایج آزمایش کمی DNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ (Thermo 8000) در محدودهٔ 2- 1/7 ارزیابی شد. بررسی کیفی DNA بر روی ژل آگارز نیز انجام گرفت که نشان دهنده کیفیت بالای DNA استخراجی بود. در حقیقت نتایج استخراج DNA از نمونه‌ها حاکی از مناسب بودن DNA استخراج شده برای انجام واکنش PCR بود.

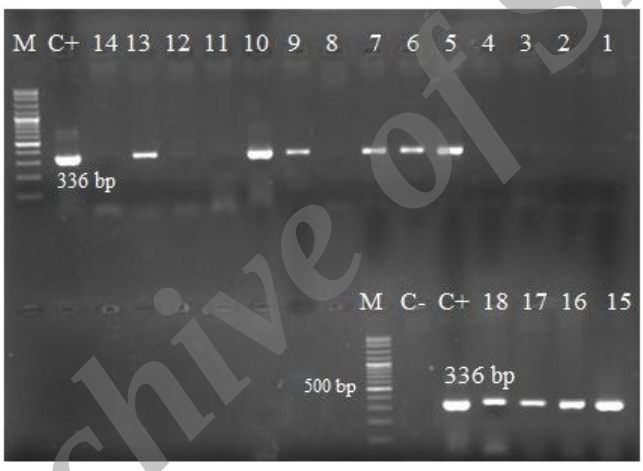
PCR اختصاصی: در مرحلهٔ ابتدایی این تحقیق، واکنش PCRبر روی DNA استخراج شده نمونه‌های شاهد (شیر گاو و گوسفند) با پرایمرهای اختصاصی هر گونه انجام گردید. پرایمر اختصاصی گاو و گوسفند به ترتیب سبب تکثیر قطعات bp 274 و bp336 شدند. جهت تشخیص واکنش متقاطع DNAهای گونه گاو و گوسفند با پرایمر اختصاصی گونه غیر هدف، واکنش PCR با DNA غیرهدف گونه‌ها انجام گردید که اختصاصی بودن پرایمر هر کدام از گونه‌ها تأیید شد. این آزمایش چند بار تکرار شد و نتایج در تمام آزمایش‌ها یکسان بود که این موضوع نشان دهنده تکرار پذیر بودن این آزمایش بود. نتایج واکنش PCR انجام گرفته با DNAهای استخراج شده از 18 برند پنیر همراه با پرایمرهای اختصاصی گاو و گوسفند مختص ژن cytochrome b میتوکندریایی به ترتیب در شکل 1 و 2 قابل مشاهده است. نتایج حاصل از PCR با پرایمرهای اختصاصی گاو و گوسفند نشان داد که در هشت مورد از پنیرهای مورد مطالعه فقط شیر گاو، در سه مورد هم شیر گاو و هم شیر گوسفند و در هفت مورد نیز فقط شیر گوسفند بکار رفته است. بنابراین در 11 پنیر از 18 پنیرهای مورد مطالعه، تقلب استفاده از شیر گاو به جای شیر گوسفند تایید گردد. این در حالی است که بر روی برچسب محصولات عبارت 100% پنیر گوسفندی قید شده بود.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 1. واکنش PCR 18 برند پنیر با پرایمر اختصاصی گاو جهت تکثیر قطعهٔ 274 bp ژن cytochrome b میتوکندریایی روی ژل آگارز 2%. 1-14: برندهای پنیر 1-14، C^+: نمونه شاهد گاو ؛ M: مارکر 100 bp ؛ 15-18: برندهای پنیر 15-18 ؛ C^-: کنترل منفی ؛ C^+: نمونه شاهد گاو ؛M: مارکر 100 bp.



شکل2. Simplex PCR 18برند پنیر با پرایمر اختصاصی گوسفند جهت تکثیر قطعهٔ 336 bp ژن cytochrome b میتوکندریایی روی ژلآگارز 2%. 1-14: برندهای پنیر 1-14، C^+: نمونه شاهد گاو ؛ M: مارکر 100 bp ؛ 15-18: برندهای پنیر 15-18 ؛ چاهک C^+ : نمونه شاهد گاو؛ چاهک C^-: کنترل منفی ؛M: مارکر 100 bp.

• بحث

اشتهار داخلی و خارجی پنیر گوسفندی موسوم به لیقوان موجب شده که عده‌ای از تولیدکنندگان نقاط مختلف آذربایجان و استان‌های شمال غرب و امروزه تقریباً در بسیاری نقاط دیگر کشور، برند موسوم به "لیقوان" را برای پنیر تولیدی خود استفاده کنند و حتی روزانه چند محموله پنیر از این استان‌ها به لیقوان حمل می‌شود تا به نام لیقوان صادر شود که این مسئله سبب افزایش اهمیت بررسی مواد اولیه برای تولید این محصول و آگاهی مصرف کنندگان از صحت مندرجات به کار رفته بر روی محصولات می‌شود. مقررات برچسب زنی مواد غذایی نیازمند این است که گونه‌های حیوانی در محصولات لبنی از جمله پنیر به درستی و با دقت به مصرف کننده اعلام شود که این امر منجر به پیدایش روش‌های قابل اعتماد و اختصاصی برای تعیین گونه‌های حیوانی در محصولات مختلف غذایی شده است. شیر نشخوارکنندگان حاصل از غده‌های شیری سالم دارای مقدار زیادی از سلول‌ها می‌باشد از جمله سلول‌های سوماتیک، لکوسیت‌ها و همچنین سلول‌های اپیتلیال که دارای DNA هستند. سلول‌های سوماتیک شیری در طول تهیه و تولید پنیر باقی می‌مانند و منبع مناسبی برای استخراج DNA و ردیابی گونه حیوانی از شیر و محصولات

Archive of SID
www.SID.ir

آن به شمار می‌روند (15-13). از طرفی، شیر سرشار از کلسیم و چربی می‌باشد که هر دو جز ممانعت کننده‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) به حساب می‌آیند (7). بنابراین اگر در طی مراحل استخراج حذف نشوند مشکلاتی را در واکنش‌های فرودستی ایجاد می‌نمایند. با توجه به نوع روش به کار رفته در استخراج در این مطالعه، کلیه چربی ها، پروتئازها و کلسیم از ژنوم سلولی جدا گردید و DNA خاص جهت فرآیند PCR در اختیار قرار گرفت. در این تحقیق، شناسایی حضور شیر گاو و گوسفند در پنیرهای گوسفندی (لیقوان) که به طور اصولی تنها باید دارای شیر گوسفند باشد با کمک روش PCR بر اساس تکثیر قطعه‌ای از ژن سیتوکروم b میتوکندریایی به وسیله پرایمرهای اختصاصی آن‌ها برای گونه‌های گاو و گوسفند به طور مجزا صورت گرفت.

در سال‌های اخیر با به کارگیری روش PCR، مطالعاتی در زمینه بررسی تقلبات محصولات لبنی بر پایه تکثیر نواحی مختلف ژنوم میتوکندریایی صورت گرفته است. به عنوان مثال، بررسی وجود شیر گاو در شیر بوفالوها و در پنیر موزارلا که با شیر بوفالو تولید می‌شود توسط Lopez-Calleja و همکاران به کمک PCR و پرایمرهای طراحی شده جهت تکثیر قطعه ای از ژن 12s rRNA انجام شد (7). In´es L´opez و همکاران (15) از تکثیر ژن 12s rRNA جهت شناسایی شیر بز در پنیرهای گوسفندی استفاده کردند. Samah و همکاران با پرایمرهای اختصاصی ژن 12s rRNA میتوکندریایی به شناسایی تقلب شیر گاو در شیر بوفالو پرداختند (16). جهت شناسایی تقلب شیر و پنیر گاو و بوفالو و شیر گاو در شیر بز به ترتیب Sachinandan De (17) و Monika Kotowicz (18) از پرایمرهای اختصاصی D-Loop میتوکندریایی استفاده کردند. پرایمرهای اختصاصی ژن‌های 16s rRNA و 12s rRNA در واکنش Multiplex-PCR جهت شناسایی شیر گاو، بز و گوسفند در محصولات لبنی مورد استفاده قرارگرفته است (19). در مطالعه‌ای مشابه EVA MAŠKOVÁ و همکاران به بررسی حضور شیر گاو در پنیرهای تولیدی از شیر بز و گوسفند در محصولات چند شرکت اروپایی بر پایه تکثیر ژن سیتوکروم b میتوکندریایی پرداختند (20).

در تحقیق حاضر سعی شده است روش دقیق، سریع، مطمئن و تکرار پذیر برای شناسایی شیر گاو و گوسفند به کار رفته در محصولات لبنی معرفی شود. بدین منظور، برای شناسایی گونه‌های گاو و گوسفند از DNA میتوکندریایی استفاده شد. زیرا DNA میتوکندریایی به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد وراثت مادری، تعداد کپی‌های بالا در هر سلول، سرعت بالای جهش و این که این ژن به ندرت دچار نوترکیبی می‌شود، منحصر به فرد می باشد، پلی مورفیسم DNA میتوکندریایی به طور گسترده برای شناسایی گونه‌ها استفاده می‌شود (21). نشان داده شده که مقاومت حرارتی و تعداد کپی‌های زیاد DNA میتوکندریایی به حفظ و بقای قطعات DNA میتوکندریایی در مقایسه با DNA هسته ای کمک می‌کند تا به اندازه کافی به وسیلهٔ PCR تکثیر شود. زیرا به دلیل تعداد کپی‌های بالای DNA میتوکندریایی، کوچک، دورشته ای و حلقوی بودنشان در سلول، شانس بقای آن‌ها تحت شرایط مختلف فرآوری و پاستوریزاسیون، بیشتر است. این دلایل، ژنوم میتوکندریایی را جهت شناسایی گونه‌های حیوانی در محصولات فرآوری شده ایده آل ساخته است(22) از طرفی چون احتمال شکسته شدن مولکول DNA در طی فرآیند پاستوریزه شدن و استریلاسیون وجود دارد، در این تحقیق سعی شده است از پرایمرهایی استفاده شود که طول قطعاتی که تولید می‌کنند کوتاه باشد (bp 336, 274) تا شانس تکثیر و ردیابی حضور ژنوم اختصاصی مورد نظر در طی واکنش PCR افزایش یابد. با بررسی‌های نرم افزاری، ناحیه مشترک برای 2 گونه هدف برای پرایمرها پیدا نشد و این مسئله در آزمایشگاه با آزمایشات PCR اولیه تأیید گردید. عملکرد اختصاصی پرایمرها با انجام PCR های مقدماتی با DNA استخراج شده از شیر گاو و گوسفند تأیید شدند. تکنیک PCR با بکارگیری یک پرایمر رفت مشترک (forward) و دو پرایمر اختصاصی برگشت (reverse) گونه گاو و گوسفند بهینه سازی شد. هر جفت پرایمر تنها سبب تکثیر قطعه مورد نظر در گونه هدف شدند و هیچ واکنش متقاطعی حاصل نشد. پرایمرهای اختصاصی گاو، تنها قطعه bp 274 از DNA میتوکندری گاو را تکثیر نمود و هیچ قطعه‌ای از DNA گوسفندی را تکثیر نکرد و همچنین پرایمرهای اختصاصی گوسفند قطعه bp 336 از سیتوکروم b میتوکندری گوسفند را تکثیر نمود و نتیجه واکنش با DNA گاو منفی بود. متعاقبا روش با استفاده از DNA استخراج شده از پنیرهای تجاری تهیه شده انجام شد. نتایج واکنش PCR حاکی از این بود که در پنیرهای تجاری شماره 1، 2، 3، 4، 8، 11، 12و 14 منحصراً از شیر گاو، پنیرهای 5، 6 و 7 هم از شیر گاو و هم گوسفند

Archive of SID

www.SID.ir

و در پنیرهـای 9، 10، 13، 15، 16، 17 و 18 فقـط از شـیر گوسفند استفاده شده است. چرا که تکثیر ژن سیتوکروم b با قطعه bp 274 در پنیرهای شـماره 1، 2، 3، 4، 8، 11، 12و 14، تکثیر قطعات bp 274 و bp 336 در پنیرهای 5، 6 و 7 و تکثیر قطعه bp 336 ژن سیتوکروم b در پنیرهای 9، 10، 13، 15، 16، 17 و 18 تایید کننده نوع شـیر بکـار رفتـه در پنیرهای مورد مطالعه می‌باشد و وجود تقلـب در 11 پنیـر از 18 پنیر مورد بررسی از جمله پنیرهـای 1، 2، 3، ۴،۵، 6، 7، 8، 11، 12و 14 را به اثبات می‌رساند که بر خـلاف اظهـارات قید شده بر روی محصولات می‌باشد.

برای جلوگیری از به خطر افتـادن سـلامت عمـومی و بـرای حصول اطمینان مصرف کنندگان از صـحیح بـودن اطلاعـات درج شـده روی محصـولات، گسـترش یـک تکنیـک قابـل اطمینان برای تشخیص تقلبات موجود در شیر و محصـولات لبنی الزامی می‌باشد. در این بررسی سعی شده روشی آسان، حساس و با دقت بالا برای شناسایی گونه‌های گاو و گوسفند بکار رفته در پنیر و سایر محصولات لبنی به سازمان سازمان غذا و دارو (اداره نظارت بر مواد غذایی) ارائه شـود تـا بتـوان گـامی مـؤثر در جلـوگیری از انجـام تقلبـات و اسـتفاده از شیرهای ارزانتر مثل شـیر گـاو بـه جـای شـیر گوسـفند یـا مخلوط نمودن این دو شیر با یکدیگر برای حفظ سود بیشتر برای تولید کنندگان برداشت. لازم به ذکر است روش بهینـه سازی شده در این تحقیق قابل تعمیم در سایر فرآورده‌هـای لبنی می‌باشد.

• References

1. Herman L. Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. J Dairy Res 2001; 68: 420–36.
2. Herna´ ndez M, Ferrando A, Esteve T, Puigdome`nech P, Prat S, Pla M . Real-time and conventional polymerase chain reaction systems based on the metallo-carboxypeptidase inhibitor gene for specific detection and quantification of potato and tomato in processed food. J Food Protect 2003; 66: 1063–70.
3. Woolfe M, Primrose S. Food forensics: Using DNA technology to combat misdescription and fraud. Trends Biotechnol 2004; 22: 222–26.
4. Molina E, Martı´n-A´ lvarez P J, Ramos M. Analysis of cow's, ewe's and goat's milkmixtures by capillary electrophoresis: quantification by multivariate regression analysis. Int Dairy J 1999; 9: 99–105.
5. De Noni I, Tirelli A, Masotti F. Detection of cow's milk in non-bovine cheese by HPLC of whey protein: application to goat milkcheese. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia 1996; 47:7–17.
6. Mimmo P, Pagani S. Development of an ELISA for the detection of caprine gs1-casein in milk. Milchwissenschaft 1998; 53: 363–67.
7. I Lo´ pez-Calleja, I Gonza´ lez Alonso, V Fajardo, M A Rodrı´guez, P E Herna´ ndez, T Garcı´a, et al. PCR detection of cows' milkin water buffalo milkand mozzarella cheese. Int Dairy J 2005; 15:1122–29.
8. Dalmasso A, Fontanella E, Piatti P, Civera T, Rosati S, Bottero MT. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. Mol Cell Probes 2004; 18: 81–87.
9. Asensio L, Gonza´ lez I, Ferna´ ndez A, Ce´spedes A, Rodrı´guez M A, Herna´ ndez P E, et al.Identification of Nile perch (Lates niloticus), grouper (Epinephelusguaza) and wreckfish (Polyprion americanus) fillets by PCR amplification of the 5S rDNA gene. J AOAC Int 2001; 84: 777–81.
10. Amills M, Francino O, Jansa M, Sa´ nchez A. Isolation of genomic DNA from milksamples by using chelex resin. J Dairy Res 1997; 64: 231–38.
11. Murphy A M, Reza Shariflou M, Moran C. High quality genomic DNA extraction from large milksamples. J Dairy Res 2002; 69: 645–49.
12. Lipkin E, Shalom A, Khatib H, Soller M, Friedmann A. Milkas a source of deoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerase chain reaction. J Dairy Sci 1993; 76: 2025–32.
13. Sambrook J, Fritch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual (2nd Edition). New York: Cold spring Habor Laboratory Pp 1989;8.3-15.113.
14. Matsunga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada J,et al. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. Meat Science 1999; 51: 143–48.
15. In´es L´opez-Calleja D´ıaz , Isabel Gonz´alez Alonso ,Violeta Fajardo , Irene Mart´ın , Pablo Hern´andez ,Teresa Garc´ıa Lacarra , Rosario Mart´ın de Sant . Application of a polymerase chain reaction to detect adulteration of ovine

Archive of SID

www.SID.ir

cheeses with caprine milk. Eur Food Res Technol 2007; 225:345–49

16. Samah F, Darwish H, Allam A and Amin AS. Evaluation of PCR Assay for Detection of Cow's Milk in Water Buffalo's Milk. World Appl Sci J 2009; 7 (4): 461-67.

17. Sachinandan De, Biswajit B, Shamik P, Ayan M, Deepak B,Moloya G, et al. Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. Food Contr 2011; 22(5): 690-96.

18. Kotowicz M, Adamczyk E, Bania J. Application Of A Duplex-PCR For Detection Of Cows' Milk In Goats' Milk. Ann Agric Environ Med 2007; 14: 215-18.

19. Botteroa MT, Civeraa T, Nuceraa D, Rosatib S, Sacchib P, Turia RM. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheep's milk in dairy products. Int Dairy J 2003;13: 277–82.

20. Eva Maskova , Ivana Paulickova. PCR-Based Detection of Cow's Milk in Goat and Sheep Cheeses Marketed in the Czech Republic. Czech J Food Sci 2006; 24(3): 127–32

21. Kazuo U, Isao Y. Recent progress in mitochondrial DNA analysis. Leg Med 2005;7: 259–62.

22. Girish PS, Anjaneyulu ASR, Viswas KN, Anand M, Rajkumarb N, Shivakumar BM, et al. Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. Meat Science 2003; 66 :551–56.

Archive of SID

www.SID.ir

Detection of adulteration of sheep cheese (*Lyghvan Brand*) with cow's milk by a specific PCR method

Tafvizi F[*1], *Helalat H* [2]

*1-*Corresponding author: Assistant Prof, Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, E-mail: Tafvizi@piau.ac.ir*

2- M.Sc Student of Biology, Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received 29 Sept, 2013 **Accepted 24 Dec, 2013**

Background and objective: By using molecular methods, e.g., polymerase chain reaction (PCR), it is possible to detect and differentiate the milks of closely related species (such as sheep and cow) in dairy products. The aim of the present study was to develop a specific PCR method for identification of cow's milk fraudulently used in making sheep cheeses (*Lighvan* Brand).

Materials and methods: Eighteen different samples of sheep cheeses (*Lighvan* Brand) claimed on the label to be 100% sheep cheese were collected from supermarkets in Tehran city. Total genomic DNA was extracted from all the samples. PCR was optimized for detection of specific cow's DNA in the sheep cheese samples based on amplification of mitochondrial cytochrome b gene (using the specific cytochrome b gene primer). The results were tested on a 2% agarose gel.

Results: Using the optimized PCR reaction based on amplification of the mitochondrial gene, 274 bp fragments of cow's DNA and 336 bp fragments of sheep's DNA were obtained. The results demonstrated that cow's milk could be detected in 11 of the 18 brands tested. Thus, adulteration by the company was confirmed.

Conclusion: The proposed PCR assay is a rapid, robust and reproducible method for the detection of adulterations in sheep cheese and other dairy products.

Keywords: Sheep cheese, Mitochondrial cytochrome b, Polymerase chain reaction

Archive of SID

www.SID.ir