شناسایی تقلبات موجود در سوسیس و کالباس تهیه شده از گوشت گاو بر اساس شناسایی ژن‌های میتوکندریایی گونه‌های حیوانی در استان تهران

فهیمه پرچمی نژاد[۱]، سید ابراهیم حسینی[۲*]، فرزانه تفویضی[۳]، مریم تاج آبادی ابراهیمی[۴]، انوشه شریفان[۵]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، تهران، ایران.
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، تهران، ایران.
۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، استادیار گروه زیست شناسی، پرند، ایران.
۴- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهرا ن مرکزی، استادیار گروه زیست شناسی، تهران، ایران.
۵- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، تهران، ایران.
[*]نویسنده مسئول مکاتبات: ebhoseini@yahoo.com
(دریافت مقاله: ۹۲/۵/۱۶ پذیرش نهایی: ۹۳/۲/۳۱)

چکیده

هدف از این مطالعه توسعه روش PCR خاص گونه‌ها برای شناسایی دقیق و سریع گوشت گونه‌های حیوانی در فرآورده‌های گوشتی برای تشخیص تقلبات احتمالی در این محصولات است. برای تعیین گوشت گاو و مرغ، پرایمرها بر اساس ژن سیتوکروم b میتوکندریایی طراحی و قطعات bp ۲۷٤ و bp ۱۸۳به ترتیب برای گوشت گاو و مرغ تکثیر گردید. از ده برند مختلف سوسیس تهیه شده از گوشت گاو در سرتاسر استان تهران نمونه‌گیری گردید. نتایج PCR اختصاصی نشان داد، تمام نمونه‌ها برخلاف بر چسب‌شان حاوی آلایش مرغی بودند و احشای گاوی در پنج نمونه تشخیص داده شد. به‌علاوه، روش PCR قادر است بدون واکنش متقاطع گونه‌های گوشتی را شناسایی کند. این تکنیک به علت سرعت، سادگی، حساسیت و اختصاصی بودن، پتانسیل بالایی برای تشخیص تقلبات گوشتی در سوسیس دارد.

واژه‌های کلیدی: سوسیس، شناسایی تقلبات، PCR

مقدمه

شناسایی گونه‌های مواد غذایی مساله بسیار مهمی برای ارزیابی ترکیبات غذایی و ارائه اطلاعات صحیح مربوط به مصرف‌کننده است. مقررات برچسب‌زنی مواد غذایی نیازمند این است که گوشت گونه‌های حیوانی در محصولات گوشتی به درستی و بادقت به مصرف‌کننده اعلام شود. که این امر منجر به پیدایش روش‌های قابل اعتماد و مخصوص برای تعیین گوشت گونه‌های حیوانی در محصولات مختلف غذایی شده است، زیرا گوشت در این محصولات در طی فرآوری خرد شده با دیگر ترکیبات مخلوط می‌شود وتحت فرایند حرارتی قرار می‌گیرد. شاید صنایع گوشت بیشترین امکان تقلب را در بین گروه‌های مختلف مواد غذایی داشته باشند زیرا که مواد اولیه پس از مخلوط شدن و یکنواخت شدن، در ظاهر قابل شناسایی نیستند (Isabel Mafra *et al*., 2007).

جنبه‌های مختلفی مثل منبع، قیمت، عوامل مذهبی، سیستم‌های تولیدی و ایمنی بر مقبولیت گوشت به وسیله مصرف‌کننده اثر می‌گذارند. تقاضا و قیمت گوشت با توجه به منابع حیوانی متنوع است. جایگزینی گوشت گران‌تر با گوشت ارزان‌تر یکی از مهم‌ترین مشکلات بزرگ صنعت گوشت است. شناسایی منشاء گوشت گونه‌های حیوانی خصوصاً جهت آنالیز مواد غذایی و همچنین رعایت برخی از مقررات مذهبی بسیار مهم است اصطلاح " گوشت گونه‌های حیوانی (Meat species)" به طیف گسترده‌ای از گونه‌های حیوانی شامل پستانداران، پرندگان و حیوانات دریایی اشاره دارد (Pattersan, 1985).

در نتیجه شناسایی تقلب در این محصولات بدون روش‌های آنالیتیکی مطمئن ممکن نیست. تکنیک‌های آنالیتیکی شامل روش‌های مبتنی بر پروتئین و DNA است (Leighton Jones 1991; Meyer and Candrian, 1996). روش‌های بر اساس پروتئین، شامل تکنیک‌های مختلف الکتروفروتیکی مثل (King and dodecyl ،isoelectric focusing (IEF) (Kurth, 1982 polyacrylamide sulfate (Craig *et al*., 1995) sodium و HPLC (Schonherr, 2002) است، که برای مخلوط‌های گوشتی و شناسایی گونه‌ها در محصولات گوشتی حرارت‌دیده مناسب نمی‌باشد. زیرا روش‌های مبتنی بر پروتئین وابسته به بافت بوده و در اثر حرارت بافت تخریب شود و باعث دناتوره شدن پروتین می‌شود. اخیراً به تکنیک‌های مولکولی مثل PCR به دلیل اینکه DNA مولکول نسبتاً پایداری است و خیلی بهتر قادر به مقاومت در برابر فرایند حرارتی است حتی اگر به شکل قطعه‌ای باشد، توجه ویژه‌ای شده است. روش‌های مولکولی مثل هیبدریداسیون DNA (Ebbehoj *et al*., 1991a; Ebbehoj *et al*.,1991 b; Hunt *et al*., 1997)، [SSCP] (Rehbein *et al*., 1997)، RAPD–[PCR] (Calvo *et al*., 2001)، [RFLP] یا توالی‌یابی [real-[Multiplex PCR], (Fajardo *et al*., 2006) time PCR], (Dalmasso *et al*., 2004; Bottero *et al*., 2003a; Matsunga *et al*., 1999) Sonia Soares *et al*., 2013; Sakalar Ergün *et al*., 2012) و PCR اختصاصی گونه‌ها، این روش برای شناسایی گونه‌های مختلف پستانداران و ماکیان استفاده شده در محصولات گوشتی بکار برده شده است (Che Man *et al*., 2007; Arslan *et al*., 2006; Meyer *et al*., 1995). در مطالعات اخیر، روش PCR اختصاصی خاص گونه‌ها برای اعتبارسنجی گوشت و محصولات گوشتی بر

اساس DNA میتوکندریایی توسعه یافته است (Doosti *et al*., 2011; Yusop *et al*., 2012).

در این تحقیق روش PCR اختصاصی گونه‌ها با استفاده از پرایمرهای خاص گونه‌های گوشتی (مرغ، گاو) برای شناسایی منشاء گوشت گونه‌های حیوانی استفاده شده در سوسیس حرارت دیده بکار برده شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

در مرحلهٔ اول نمونه‌برداری از گوشت مرغ و گاو به عنوان شاهد نمونه‌برداری شد. در مرحلهٔ دوم نمونه‌برداری ۱۰ برند مختلف سوسیس ۵۵٪ گوشت قرمز از سراسر استان تهران جمع‌آوری شد. و با حروف لاتین A, B, C, …, J نام‌گذاری شد. نمونه ها در دمای ۲۰ °C- برای استخراج DNA نگه‌داری شد تا از تجزیه آنزیمی DNA جلوگیری شود. از هر برند سوسیس ۳ نمونه تهیه شد.

استخراج DNA

مقدار ۰/۲ گرم از هر کدام از نمونه‌ها در میکروتیوب‌های ml ۱/۵ جداگانه قرار داده و به میزان ۱۰۰۰µl بافر CTAB (10 ml 1 M Tris HCl pH 8.0, 35 ml 4 M NaCl, 4 ml 0.5 M EDTA pH 0.8, 2 g CTAB) و ۳۰µl پروتئیناز K به آن اضافه و به مدت ۳ تا ٤ ساعت در بن ماری ٦٥ °C قرار گرفت. در مرحله بعد به هر یک از میکروتیوب‌ها زیر هود، ۱۰۰۰µl فنل کلرفرم ایزوآمیل الکل اضافه و بعد ۱۰ دقیقه اینورت در سانتریفوژ rpm ۱۲۰۰۰ در دمای ٤ درجه به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. لایه رویی جدا و در میکروتیوب جدید قرار داده شد و به میزان ٦۰۰µl ایزوآمیل الکل به آن اضافه و مرحله قبل تکرار گردید. در مرحلهٔ بعدی برا ی حذف املاح و تغلیظ DNA به آن اتانول ۱۰۰٪ و ۷۰٪ در مراحل بعدی اضافه و سپس کل محتویات را خالی کرده و بعد از خشک کردن به میزان ۵۰µl به آن اضافه شد DNA های استخراجی به وسیلهٔ دستگاه نانوداپ مورد ارزیابی کمی قرار گرفت و در C ° ۲۰- نگه‌داری شد (Sambrook *et al*., 1989).

نتایج آزمایش کمی (نانودراپ) بر روی DNA استخراج شده بیانگر این بود که میزان جذب محلول DNA در محدودهٔ ۲- ۱/۷ قرار داشت. که نشان‌دهنده کمیت بالای DNA استخراجی است. در حقیقت نتایج استخراج DNA از نمونه‌های گوشت خام (شاهد) و ۱۰ برند سوسیس، نشان داد که DNA استخراج شده برای تکثیر PCR مناسب بود.

پرایمرهای الیگونوکلئوتید پرایمرهای اختصاصی خاص گونه‌های مرغ و گاو برای تشخیص گونه‌های موجود در نمونه‌ها، از ژنوم مختلف میتوکندریایی بر طبق سکانس‌های موجود در بانک اطلاعات ژن، استفاده شد.

جدول ۱- توالی پرایمرها و اندازهٔ قطعات تکثیر یافته با هر پرایمر در هر گونه

Primers	Species	Genes	Sequences	Amplicons	References
پرایمر ماکیان	*Gallus gallus*	12S rRNA	5' TGAGAACTACGAGCACAAAC 3' 5' GGGCTATTGAGCTCACTGTT 3'	183bp	(Dalmasso *et al*., 2004)
پرایمر گاوی	*Bos taurus*	cytochrome b	5'GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTT GATGAAA3' 5'CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG-3'	274bp	(Matsunaga *et al*.,1999)

PCR

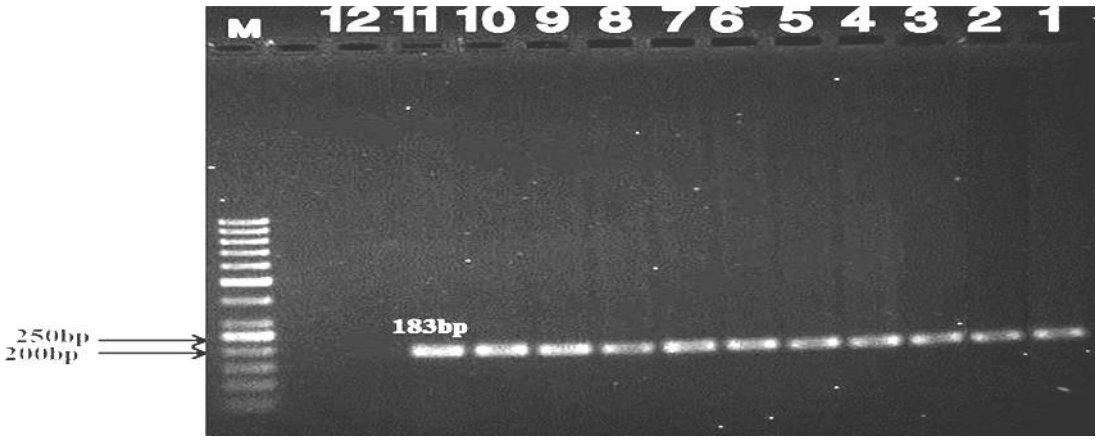
پرایمرهای اختصاصی گونه‌ها و شرایط بهینه PCR برای تشخیص گونه‌های گاو و ماکیان در نظر گرفته شد. برای تعیین اختصاصی بودن پرایمرهای خاص گونه‌های گوشتی شاهد مورد استفاده در این تحقیق (گاو و مرغ)، پرایمر خاص هر گونه همراه با DNA دیگر گونه گوشتی PCR انجام گردید. تکثیر PCR در حجم نهایی ۲۵ µl شامل ۲/۵ µl بافر 10x (pH 8.8) (Fermentas, USA) PCR، ۰/۵ µl از آنزیم Taq DNA Polymerase (Fermentas, USA) ، ۰/۵ µl از dNTPs و ۱/۲۵ µl MgCl2 (Fermentas, USA)، ۰/۵ µl از پرایمرها و ۱ µl از DNA نمونه‌ها انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad, USA) طبق چرخه دمایی مرحلهٔ دناتوراسیون ابتدایی در ۹۵ °C برای ۱ دقیقه، ۳۰ چرخه اتصال (Annelling) به شرح زیر برنامه‌ریزی شد: ۹۵ °C برای ۱ دقیقه، ۶۰ °C برای ۱ دقیقه، ۷۲ °C برای ۹۰ ثانیه و مرحله ساخت و گسترش (Extension) نهایی در ۷۲ °C برای ۵ دقیقه انجام گرفت. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ شامل بافر ۲XTBE مشخص شد و به وسیلهٔ دستگاه ژل داک با اشعه UV مشاهده شد. همچنین PCR با هر کدام از پرایمرهای خاص گونه‌ها، بر روی DNA استخراجی ۱۰ برند سوسیس هم انجام گرفت. این آزمایش حداقل سه بار برای هر کدام از برندها تکرار شد (Ghovvati *et al*., 2008).

یافته‌ها

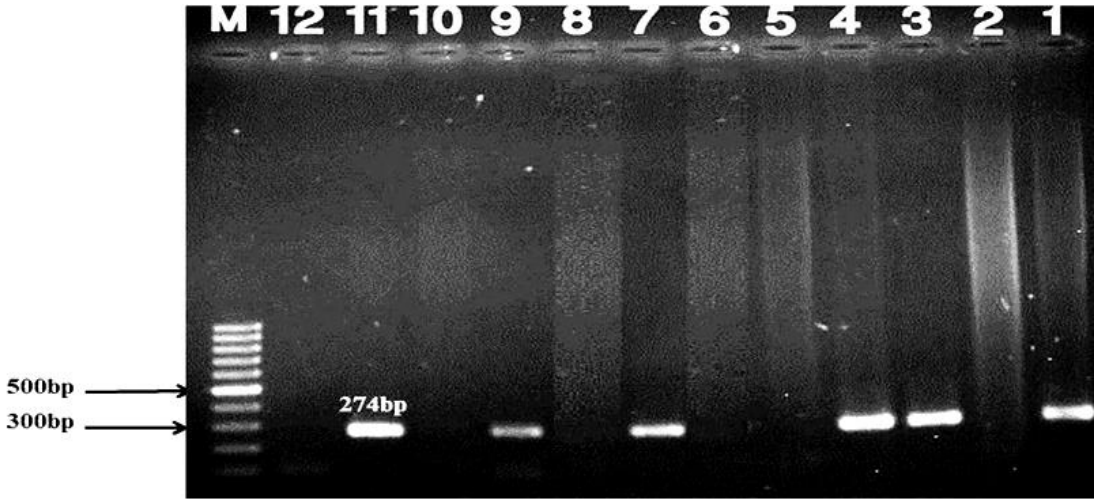
PCR اختصاصی

در مرحلهٔ ابتدایی این تحقیق، PCR بر روی DNA گوشت‌های خام (شاهد) استخراج شده با پرایمرهای اختصاصی هر گونه انجام گردید. پرایمر اختصاصی ماکیان و گاو به ترتیب قطعات ۱۸۳ bp، ۲۷٤ bp را تکثیر کردند. برای تشخیص واکنش متقاطع DNAهای گونه‌های دیگر با پرایمر اختصاصی هر گونه، PCR با DNA غیرهدف گونه‌ها انجام گردید که اختصاصیت پرایمر هر کدام از گونه‌ها به اثبات رسید. این آزمایش حداقل سه بار تکرار شد، که نتایج در تمام آزمایش‌ها یکسان بود که نشان‌دهنده تکرار پذیر بودن این آزمایش بود.

۱۰ DNA, PCR برند سوسیس با پرایمر اختصاصی ماکیان ویژه ناحیه ژن 12S rRNA (شکل۱) DNA PCR ۱۰ برند سوسیس با پرایمر اختصاصی گاو ویژه ناحیه cytochrome b در (شکل۲) قابل مشاهده است.



شکل ۱- Simplex PCR ۱۰ برند سوسیس با پرایمر اختصاصی ماکیان جهت تکثیر قطعهٔ bp ۱۸۳ ژن 12S rRNA میتوکندریایی روی ژل آکارز ۲٪ ؛ نمونه‌های ۱ تا ۱۰ به ترتیب شامل نمونه‌های A تا J می‌باشد؛ شماره‌های ۱۱ و ۱۲ به ترتیب نمونه‌های شاهد مثبت DNA مرغ و منفی؛ M: مارکر bp ۵۰.



شکل۲- Simplex PCR ۱۰برند سوسیس با پرایمر اختصاصی گاو جهت تکثیر قطعهٔ bp ۲۷۴ ژن cytochrome b میتوکندریایی بر روی ژل آکارز ۲٪: نمونه‌های ۱ تا ۱۰ به ترتیب شامل نمونه‌های A تا J می‌باشد؛ شماره‌های ۱۱ و ۱۲ به ترتیب نمونه‌های شاهد مثبت DNA گاو و منفی؛ M: مارکر bp ۱۰۰.

نتایج حاصل از تکثیر قطعهٔ bp ۱۸۳ ناحیهٔ ژن 12S rRNA میتوکندریایی در شکل (۱) در تمام نمونه‌ها تکثیر شده است که نشان‌دهنده وجود اجزای مرغی در تمام نمونه‌ها می‌باشد. تکثیر قطعهٔ bp ۲۷٤ ژن cytochrome b میتوکندریایی در شکل ۲ نمایش داده شده است، بر این اساس، نمونه‌های A,C, D,G,I حاوی گوشت گاو هم بودند. نتایج نشان داد که هیچ یک از نمونه‌ها با اجزای خوکی آلوده نشده بود. اما ٤۰٪

نمونه‌ها آلوده به اجزای ماکیان بود ولی نمونه‌های گوشت چرخ‌کرده با اجزای ماکیان آلوده نشده بود.

بحث و نتیجه‌گیری

اخیرا نگرانی‌ها از وجود تقلبات در محصولات گوشتی مخصوصاً سوسیس و کالباس افزایش یافته است، به این دلیل نیاز به شناسایی محتویات محصولات گوشتی برای جلوگیری از تقلبات بکار رفته در این محصولات بیشتر احساس می شود.

در این تحقیق برای شناسایی گونه‌های گوشتی از DNA میتوکندریایی استفاده شد. زیرا DNA میتوکندریایی به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد وراثت مادری، تعداد کپی‌های بالا از 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. داده‌های DNA میتوکندریایی می‌تواند به شناسایی گونه‌های حیوانی از قطعات بافت کمک کند. توالی‌های ناقص و کامل DNA میتوکندریایی در خیلی از حیوانات تشخیص داده می‌شوند (Umetsu *et al.*, 2005). نشان داده شده که مقاومت حرارتی و تعداد کپی‌های زیاد DNA میتوکندریایی در بافت گوشت به حفظ و بقای قطعاتDNA کمک می‌کند تا به اندازه کافی به وسیلهٔ PCR تکثیر شود. تعداد کپی‌های بالای DNA میتوکندریایی تضمین‌کننده کمیت زیاد و کافی محصول PCR حتی وقتی مقدار کمی از نمونه‌های گوشت خام یا فرایند شده استفاده می‌شود، است. زیرا به دلیل تعداد کپی‌های بالای DNA میتوکندریایی، کوچک، دورشته‌ای و حلقوی بودنشان در سلول، شانس بقای آن‌ها تحت شرایط مختلف فرایند کردن، بیشتر است. این دلایل، آن ها را برای شناسایی گونه‌های گوشتی فرایند شده ایده آل ساخته است(Girish et al.,2003). در مطالعات متعدد اثرات روش‌های مختلف پخت بر روی تکثیر PCR، DNA میتوکندریایی استخراج شده از گوشت و محصولات گوشتی بدون هیچ گونه اثرات نا مطلوب،مورد بررسی قرار گرفته است (Mane *et al.*, 2012; Kesmen *et al.*, 2007; Arslan *et al.*, 2006).

بنابراین در این مطالعه روش PCR خاص گونه‌ها برای شناسایی گونه‌های ماکیان و گاو در سوسیس استفاده شد. متمایز کردن گونه‌ها مخصوصاً در نمونه‌های مخلوط مثل سوسیس که در معرض حرارت قرار گرفته‌اند بسیار مشکل است. در این پژوهش، DNA ۱۰ گونه سوسیس استخراج شده با موفقیت برای هر دو گونه ذکر شده مورد شناسایی قرار گرفت، بدون اینکه ادویه اضافه شده و فرآیند حرارتی اثری بر روی تکثیر بگذارد (Kesmen *et al.*, 2007) و سبب گردید بدون هیچ واکنش متقاطعی قطعات DNA مرغ در تمامی ۱۰ نمونه و قطعات DNA گاو در ۵ نمونه تکثیر یابد، همچنین قوتی و همکاران در سال ۲۰۰۸ با استفاده از سه نوع پرایمر خاص گونه‌های ماکیان، نشخوارکنندگان و خوک PCR انجام دادند. از هر کدام منابع غذایی (گوشت چرخ‌کرده، سوسیس و کالباس) ۱۰ نمونه جمع‌آوری کردند و آن‌ها را مورد ارزیابی قرار دادند، در این تحقیق در طی آزمایش PCR گونه‌های ماکیان، پستانداران و خوک در نمونه‌های فرآورده‌های گوشتی صنعتی شناسایی شدند که Multiplex PCR انجام شد. پرایمرها برای ناحیه ۱۲S rRNA، tRNA

Val، ۱٦ S rRNA ژن های میتوکندریایی طراحی شدند (Ghovvati *et al*., 2008).

مانه و همکاران هم در سال ۲۰۰۹ از جفت پرایمر طراحی شده بر اساس ژن D-loop میتوکندریایی برای تکثیر قطعات ٤٤۲ bp DNA برای تشخیص گوشت مرغ در گوشت و فرآورده های گوشتی استفاده کردند (Mane *et al*., 2009). در این تحقیق آنزیم‌های هضمی برای تشخیص بین گونه‌ها بکار برده شد. برای شناسایی تقلب بکار رفته در محصولات گوشتی صنعتی در سال ۲۰۱۱ محققینی ازایران روش PCR-RFLP را بکار بردند. در این روش برای تشخیص گوشت گاو، گوسفند، خوک، مرغ، االاغ و اسب در ۲۲٤ محصولات گوشتی شامل ٦۸ سوسیس، ٤۸ فرانکفورتر، ۵۵ همبرگر، ۳۳ ژامبون و ۲۰ کالباس بکار برده شد. نمونه‌ها از شرکت‌های مختلف و مغازه‌های مواد غذایی در ایران جمع‌آوری شدند. در این مطالعه از آنزیم‌های هضمی بر روی محصول PCR برای تمایز بین گونه‌ها استفاده شد (Doosti *et al*., 2011). ولی در این مطالعه بدون استفاده از آنزیم بین گونه‌های مختلف گاو و مرغ بدون واکنش متقاطع تمایز ایجاد شد.

نتایج حاصله از PCR اختصاصی گونه‌های ماکیان و گاو در این تحقیق نشان داد در تمام نمونه‌ها علی‌رغم اینکه بر روی برچسب آنها محتوی ۵۵٪ گوشت گاو درج گردیده بود، با بقایای مرغ آلوده بود که نشان‌دهنده تقلب در این محصولات است. زیرا با توجه به قیمت پایین اجزای مرغی مخصوصاً خمیر مرغ، استفاده از خمیر مرغ در این محصولات تقلب محسوب می‌شود. بر اساس اصلاحیه شماره ۲ استاندارد ملی ایران به شماره ۲۳۰۳ تحت عنوان سوسیس و کالباس، ویژگی‌ها و و روش‌های آزمون، استفاده گوشت‌های قرمز و سفید تهیه شده به روش مکانیکی (خمیر گوشت و خمیر مرغ) در انواع سوسیس و کالباس ممنوع است. در حقیقت نتایج بدست آمده نشان داد که روش PCR اختصاصی گونه‌ها، روشی مطمئن، سریع، قابل اعتماد، ارزان و تکرارپذیر برای بررسی تقلبات در محصولات گوشتی حرارت‌دیده مثل سوسیس و کالباس است.

منابع

- Arslan, A., Irfan, O.I. and Mehmet, C. (2006). Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. Meat Science, 72: 326–330.
- Bottero, M.T., Dalmasso, A., Nucera, D., Turi, R.M., Rosati, S., Squadrone, S., Goria, M. and Civera, T. (2003). Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds. Journal of Food Protection, 66: 2307–2312.
- Calvo, J.H., Zaragoza, P. and Osta, R. (2001). A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment. Journal of American Society of Animal Science, 79: 2108–2112.
- Che Man, Y.B., Aida, A.A., Raha, A.R. and Son, R. (2007). Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for halal verification. Food Control, 18: 885–889.
- Chikuni, K., Tabata, T., Saito, M. and Monma, M. (1994). Sequencing of mitochondrial cytochrome b genes for the identification of meat species. Animal Science and Technology, 65: 571–579.

- Craig, A., Ritchie, A.H. and Mackie, I.M. (1995). Determining the authenticity of raw reformed breaded scampi (*Nephrops norvegicus*) by electrophoretic techniques. Food Chemistry, 52: 451–454.
- Dalmasso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Rosati, S. and Bottero, M. (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. Molecular and Cellular Probes, 18: 81–87.
- Desjardins, P. and Morais, R. (1999). Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. Journal of Molecular Biology, 212: 599–634.
- Doosti, A., Ghasemi Dehkordi, P. and Rahimi, E. (2014). Molecular assay to fraud identification of meat products. Journal of Food Science and Technology, 51(1): 148-152.
- Ebbehoj, K.F. and Thomsen, P.D. (1991a). Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization. Meat Science, 30: 221–234.
- Ebbehoj, K.F. and Thomsen, P.D. (1991b). Differentiation of closely related species by DNA hybridization. Meat Science, 30: 359–366.
- Ergun, S. and Fatih, M.A. (2012). The development of duplex real-time PCR based on SYBR Green florescence for rapid identification of ruminant and poultry origins in foodstuff. Food Chemistry, 130: 1050–1054.
- Fajardo, V., GonzaLez, I., Lopez-Calleja, I., Martian, I., Hernandez, P.E., Garciaa, T.R. and Martian, R. (2006). PCR–RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*). Agricultural and Food Chemistry, 54: 1144–1150.
- Ghovvati, S., Nassiri, M.R., Mirhoseini, S.Z., Heravi Moussavi, A. and Javadmanesh, A. (2008). Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. Food Control, 20(8): 696–699.
- Girish, P.S., Anjaneyulu, A.S.R., Viswas, K.N., Anand, M., Rajkumarb, N., Shivakumar B.M. and Bhaskar, S. (2003). Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. Meat Science, 66: 551–556.
- Hunt, D.J., Parkes, H.C. and Lumley, I.D. (1997). Identification of the species of origin of raw and cooked meat products using oligonucleotide probes. Food Chemistry, 60: 437–442.
- Kesmen, Z., Sahin, F. and Yetim, H. (2007). PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. Meat Science, 77: 649–653.
- King, N.L. and Kurth, L. (1982). Analysis of raw beef samples for adulterant meat species by enzyme staining of isoelectric focusing gels. Food Science, 47: 1608–1612.
- Leighton Jones, J. (1991). DNA probes: applications in the food industry. Trends in Food Science and Technology, 2: 28–32.
- Mane, B.G., Mendiratta, S.K. and Tiwari, A.K. (2009). PCR assay for specific identification of chicken species in meat and meat products. Food Chemistry, 116: 806–810.
- Mane, B.G., Mendiratta, S.K. and Tiwari, A.K. (2012). Detection of adulteration of meat and meat products with buffalo meat employing polymerase chain reaction assay, Food Analytical Methods, 5: 296–300.
- Mafra, I., Ferreira, P.L.V.O., Beatriz, M. and Oliveira, P.P. (2008). Food authentication by PCR-based methods. European Food Research and Technology, 227: 649–665.
- Matsunga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J. and Shinmura, Y. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. Meat Science, 51: 143–148.
- Meyer, R. and Candrian, U. (1996). PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 29: 1–9.
- Meyer, R., Hoefelein, C., Luethy, J. and Candrian, U. (1995). Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis: A simple method for species identification in food. Journal of AOAC International, 78: 1542–1551.

- Pattersan, R.L.S. (1985). Biochemical identification of meat species. Elsevier Applied Science Publishers, London, pp. 313–315.
- Rehbein, H., Kress, G. and Schmidt, T. (1997). Application of PCR SSCP to species identification of fishery products. Journal of the Science of Food and Agriculture, 74: 35–41.
- Sambrook, J., Fritch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. 2th Edition, Cold spring Habor Laboratory, New York, pp. 8-113.
- Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout, S. and McDowell, D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. Food Control, 14: 579–583.
- Schonherr, J. (2002). Analysis of products of animal origin in feeds by determination of carnosine and related dipeptides by high-performance liquid chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 1945–1950.
- Soares, S., Amarala, J.S., Oliveira, M.B.P.P. and Mafra, I. (2013). A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. Meat Science, 94(1): 115-120
- Umetsu, K. and Yuasa, I. (2005). Recent progress in mitochondrial DNA analysis. Legal Medicine, 7: 259–262.
- Yusop, M.H.M., Mustafa, S., Che-Man, Y.B., Omar, A.R. and Mokhtar, N.F.K. (2012). Detection of raw pork targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome B gene by molecular beacon probe real-time polymerase chain reaction. Food Analytical Methods, 5: 422–429.

Fraud identification in beef sausage in Tehran province using mitochondrial genes of animal species

Parchami Nejad, F.[1], Hosseni, S.E.[2*], Tafvizi, F.[3], Tajabadi Ebrahimi, M.[4], Sharifan, A.[5]

1- M.Sc. Student of Food Science and Technology, College of Agriculture & Natural Resource, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Assistant Professor of Food Science and Technology, College of Agriculture & Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3-Assistant Professor, Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran.
4- Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
5- Assistant Professor of Food Science and Technology, College of Food Science and Industrial, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[*]Corresponding author email: ebhoseini@yahoo.com
(Received: 2013/8/7 Accepted: 2014/5/21)

Abstract

The aim of this study was to develop a species-specific PCR method for rapid identification of meat species in order to detect any potential fraud in meat products. For cattle and poultry, a set of primers were designed based on the mitochondrial cytochrome b and subsequently a 183 bp as well as 274 bp fragments were amplified for poultry and beef samples, respectively. For the study, ten different brands of beef sausage were obtained across Tehran province. Results of PCR assay demonstrated that unlike their labels, all of the samples were contained poultry residuals. Moreover, beef offal was detected only in five samples. Since no cross-reaction was observed among the different samples, PCR could be considered as a sensitive and specific method for the identification of meat varieties. In addition, high-speed operation and easiness of the technique are the other advantages of PCR method. Therefore, this technique has the capability for sensitive and specific detection of meat adulteration in sausages.

Key words: Sausages, Fraud identification, Meat species identification, PCR