

(مقاله پژوهشی)

تشخیص روغن پالم در فرمولاسیون ماست با روش DNA بارکد گذاری به وسیله Real-time PCR

محمد دولت آبادی^۱، سید علی مرتضوی^{۲*}، حسن روانسالار^۳، محمدرضا سعیدی اصل^۱، احمد پدرام نیا^۱

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۹

DOI: [10.30495/jfst.2021.1935354.1736](https://doi.org/10.30495/jfst.2021.1935354.1736)

چکیده

یکی از تقلبات رایج در شیر و فرآورده‌های لبنی، افزودن روغن‌های گیاهی با قیمت پائین نظیر روغن پالم با هدف افزایش سودآوری محصولات می‌باشد. بنابراین نیاز فوری برای توسعه تکنیک‌های شناسایی دقیق، سریع و قابل اعتماد برای محافظت از مصرف کنندگان در برابر این گونه از تقلبات وجود دارد. هدف از پژوهش حاضر، استفاده از روش DNA بارکد گذاری با انجام PCR زمان واقعی به عنوان یک روش قابل اعتماد برای ردیابی تقلب روغن پالم با سطوح ۲، ۳، ۴، ۵، ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۱۰۰ درصد و نمونه کنترل مثبت و منفی در ماست است. نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر حاکی از آن بود که بیشترین و کمترین غلظت DNA استخراج شده به ترتیب متعلق به نمونه روغن پالم ۳ درصد و ۱۰۰ درصد بود؛ در حالی که در بین تمام نمونه‌ها، غلظت DNA استخراج شده در روغن کنجد و بعد از آن در نمونه روغن کنترل کمتر از سایر نمونه‌ها تعیین گردید. در نمونه‌های مورد بررسی کمترین و بیشترین میزان جذب (10mm) به ترتیب مربوط به نمونه روغن کنترل (غیر از پالم) و روغن پالم ۱۰۰ درصد بود. بین نمونه‌های روغن پالم ۴ درصد، ۵ درصد و روغن کنجد تفاوت معنی‌داری در میزان جذب وجود نداشت. دامنه مورد نظر برای تشخیص تقلب روغن پالم از ۰/۰۵ تا ۱۰۰ درصد روغن پالم بود. حد کمی‌سازی (LOQ) و حد تشخیص (LOD) به ترتیب برابر با ۰/۱ درصد و ۰/۰۵ درصد روغن پالم بود.

واژه های کلیدی: تقلب، روغن پالم، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز زمان واقعی، ماست، DNA بارکد گذاری.

۱- مقدمه

یکی از متداول ترین انواع غذاهای فراسودمند، فرآورده های لبنی تخمیری از جمله ماست می باشد. ماست، پرمصرفترین و محبوب ترین فرآورده تخمیری شیری در جهان است. هرچند در گذشته ماندگاری بالاتر آن در مقایسه با شیر مورد توجه بوده است، اما امروزه اساساً به سبب خواص حسی و سلامتی بخش ویژه آن مصرف می شود. این فرآورده دارای ارزش تغذیه ای قابل توجه، به ویژه از نظر پروتئین و کلسیم است و دارای خواص درمانی متعددی می باشد (۷). چربی، یکی از اجزاء مهم ماست است که در ایجاد احساس دهانی و بافت مطلوب ماست مؤثر است. ماست ها با میزان چربی بیشتر، دارای بافت مناسب تر و عطر و طعم بهتری هستند (۲۰). طبق نظر پژوهشگران علم تغذیه، چربی ایده آل شیر و فرآورده های شیری مورد استفاده در رژیم غذایی می بایست حاوی ۱۰

درصد اسیدهای چرب چند غیراشباعی، ۸ درصد اسیدهای چرب اشباع و حداقل ۸۲ درصد اسیدهای چرب تک غیراشباع باشد (۱۳). روغن پالم یکی از روغن های گیاهی است که از نسبت مساوی اسیدهای چرب اشباع شده و اشباع نشده تشکیل شده است و به میزان کافی حاوی اسیدهای چرب ضروری نیز می باشد (جدول ۱) (۸). در عین حال، وجود اسیدهای چرب اشباع در روغن پالم عاملی جهت بروز مشکلات مرتبط با سلامتی، به ویژه بیماری های قلبی - عروقی است (۱۷). با توجه به سهولت دسترسی و قیمت پائین روغن پالم، از این ماده در صنایع غذایی به طور گسترده استفاده می شود. امروزه پایه تولید حدود ۶۰ درصد روغن های نباتی ایران از روغن پالم است، اما طبق استاندارد ملی ایران، تاکنون برای استفاده از این روغن در ماست مجوزی صادر نشده و این کار غیرقانونی می باشد و نوعی تقلب محسوب می گردد (۳).

جدول ۱ - پروفایل اسیدهای چرب عمده در روغن پالم خوراکی

نام اسید چرب	تعداد اتم های کربن	میزان (درصد)
لوریک	۱۲	< ۰/۴
میریستیک	۱۴	۰/۵-۲
پالمیتیک	۱۶	۴۱-۴۷
پالمیتولیک	۱۶	< ۰/۶
استئاریک	۱۸	۳/۵-۶
اولئیک	۱۸	۳۶-۴۴
لینولئیک	۱۸	۶/۵-۱۲
لینولئیک	۱۸	< ۰/۵
آراشیدیک	۲۰	< ۱

از آن جا که ترکیبات میکرو و ماکروی روغن نیمه فرار هستند، تعداد قابل توجهی از روش های کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و کروماتوگرافی گازی (GC) برای تعیین ترکیب روغن های مختلف توسعه یافته اند (۶). اگرچه HPLC روشی انتخابی است، اما استفاده از آن به دلیل پاک سازی وسیع نمونه، استفاده از حلال های گران قیمت و دوره های طولانی تثبیت ستون محدود شده است (۱۴). از طرفی، به دلیل اثرات متفاوت شرایط محیطی که منجر به تغییرات کمی و کیفی در مواد

تشکیل دهنده می شود، تعیین منبع ماده غذایی باروش های یاد شده به عنوان یک استاندارد معتبر توصیه نمی گردد (۱۵). روش های آنالیزی بر پایه DNA به منظور شناسایی انواع تقلبات در شیر و فرآورده های شیری استفاده می شوند. این روش ها نسبت به روش های سنتی ارزان، سریع و دارای دقت بالایی در تشخیص گونه ها و نیز ارزیابی تنوع زیستی می باشند (۱۹). بارک گذاری DNA^۱ (توالی DNA بسیار کوتاه از یک ژن یا منطقه بین ژنی کاملاً شناخته شده، است که به کمک آن

شد و مخلوط ۱:۲۴ از کلروفورم-ایزوامیل الکل جداگانه تهیه گردید و در زمان استخراج DNA و رسوبدهی پروتئین به صورت هم حجم با فنل استفاده شد.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- استخراج روغن

میزان ۲۵۰ گرم از ماست وزن شد و پس از هم‌وزن شدن به یک ارلن انتقال یافت و چربی ماست با استفاده از روش استاندارد AOAC استخراج گردید. حلال A (حاوی مقادیر مساوی از متانول، هگزان، کلروفورم، اتر دی‌پترولیوم و بنزن) به نمونه اضافه شد تا حدی که حلال، سطح نمونه را پوشاند. در ادامه، مخلوط حاصل از حلال A و نمونه، به مدت ۲ روز در مکانی تاریک قرار داده شد. سپس مخلوط با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شده به منظور تبخیر حلال‌ها در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. در نهایت، جهت از بین رفتن رطوبت، روغن به دست آمده از نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (۱۲).

۲-۲-۲- آماده‌سازی تیمارها برای آزمایش

روغن استخراج شده از ماست بدون پالم در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به فاز مایع، ذوب شد. سپس با روغن پالم مخلوط شد تا رقت‌های ۲، ۴، ۵، ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۱۰۰ درصد (وزنی-وزنی) بدست آمد که به منظور آزمایش کاربرد PCR زمان واقعی، جهت تشخیص حضور جزء روغن پالم در نمونه‌های ماست استفاده شد.

۲-۲-۳- استخراج DNA

استخراج DNA از نمونه روغن به روش CTAB با اندکی تغییرات انجام گرفت. ۱ میلی لیتر روغن برداشته و به فالكون ۱۵ میلی لیتری استریل انتقال داده شد. ۲ میلی لیتر از بافر استخراج CTAB همراه با ۲ میلی لیتر هگزان و ۲۰۰ میکرو لیتر Tween80 اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در حمام بن ماری ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و هر ۵ دقیقه یکبار به آرامی وارونه شدند. نمونه‌ها بعد از خارج شدن از بن ماری، به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق خنک شدند. در مرحله بعد مقدار ۲ میلی لیتر محلول کلروفورم ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) به فالكون‌ها

می‌توان گونه‌جانداران را شناسایی کرد) به دلیل پتانسیل بالای آن در تشخیص و شناسایی گونه‌ها، ابزاری جدید و قابل توجه در پژوهش‌های تاکسونومی به‌شمار می‌رود (۲۶). بارکد گذاری DNA با استفاده از اطلاعات موجود در منطقه مشترک از یک ژن یا ناحیه بین‌ژنی در تمام گونه‌ها و تعیین توالی آنها برای ایجاد یک شبکه جهانی جهت تبادل داده‌های پژوهشگران، روشی موفق در شناسایی و مستندسازی تنوع زیستی موجودات محسوب می‌گردد (۹). از آن‌جا که شیر و فرآورده‌های لبنی توسط طیف وسیعی از مردم مصرف می‌شوند، توجه به ایمنی و سلامت این فرآورده‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. یکی از متداول‌ترین تقلبات برای افزایش میزان چربی شیر، افزودن روغن پالم است. اهمیت فرآورده‌های لبنی در تغذیه انسان از یک سو و خطرات بالقوه ناشی از وجود ترکیباتی نظیر روغن پالم در محصولات لبنی از سوی دیگر، نیاز به روشی بهینه و کارآمد جهت شناسایی حضور روغن پالم را در فرآورده‌های لبنی آشکار می‌سازد. به دلیل این که مصرف کننده معمولی قادر به تشخیص ترکیب محصول لبنی با روغن پالم نیست، بنابراین نیاز فوری توسعه تکنیک‌های شناسایی دقیق، سریع، قابل اعتماد و مقرون به صرفه به منظور محافظت از مصرف کنندگان در برابر این تقلب مواد غذایی وجود دارد (۲۸). لذا هدف از پژوهش حاضر، استفاده از DNA بارکد گذاری شده، به وسیله PCR زمان واقعی به عنوان یک روش قابل اعتماد برای ردیابی تقلب روغن پالم در ماست است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

ماست از یک کارگاه لبنی محلی قابل اعتماد خریداری شد تا اطمینان حاصل گردد در تهیه ماست از روغن پالم استفاده نشده است. روغن پالم اولئین خوراکی برای استفاده در تهیه رقت‌های روغن پالم، از شرکت کارخانجات پنبه و دانه های روغنی خراسان (لیفود) خریداری شد. در این مطالعه، CTAB (مرک، آلمان)، پلی‌وینیل پیرولیدون (مرک، آلمان)، کلروفورم ایزومیل الکل، مرکاپتو اتانول، اتانول ۷۰ درصد، بافر TE (Tris- EDTA) و کلروفورم - ایزوآمیل الکل، خریداری

۲-۲-۵- واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)

۲-۲-۵-۱- مواد

۲-۲-۵-۱-۱- آغازگرها

در مطالعه حاضر از آغازگرهای فهرست شده در جدول ۲ برای تکثیر ژن Mt3-B استفاده شد. جهت استفاده از این آغازگرها، سنترونوکلئوتیدی با OD بالاتر از ۴ صورت گرفت و برطبق وزن مولکولی هر کدام از آغازگرها مقدار لازم آب دوبار تقطیری از DNAase و RNAase جهت ساخت محلول اصلی ۱۰۰ میکرومولار اضافه گردید. محلول کاری آغازگرها ۱۰ میکرومولار انتخاب و در شرایط استریل جهت استفاده آماده شد. به منظور جلوگیری از ایجاد آلودگی، محلول کاری به شکل دوره ای تعویض شد (۲۹).

۲-۲-۵-۱-۲- آنزیم DNA polymerase

آنزیم Taq DNA Polymerase (Ampliqon, Denmark) مورد استفاده در این مطالعه از میکس تجاری آماده با غلظت ۲x آنزیم ۰/۲ واحد در میکرولیتر، ۳ میلی مولار کاتالیزور MgCl₂، ۰/۴ میلی مولار نوکلئوتیدها، ۰/۲ درصد محلول Tween 20، بافر Tris-HCL با PH ۸/۵ استفاده شد (۲۹).

اضافه شد و به آرامی وارونه شدند. فرآیند سانتریفیوژ جهت تغییر فاز به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه (RPM) انجام شد. فاز رویی به فالكون های جدید منتقل شد. برای شستشوی بیشتر، فرآیند سانتریفیوژ تکرار گردید. ۲ میلی لیتر ایزوپروپانول سرد به نمونه ها اضافه شد و به مدت ۳ ساعت دردمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت و لایه رویی دور ریخته شد. ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد به نمونه ها اضافه و مرحله سانتریفیوژ تکرار گردید. رسوب یا پلاک به دست آمده ۵ دقیقه در زیر هود لامینار خشک شد و در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE حل گردید (۲۹).

۲-۲-۴- اندازه گیری کمی و کیفیت DNA

برای تعیین کمی و کیفیت DNA از ژل آگاروز ۱ درصد و دستگاه نانودراپ (Thermo, 2000c) استفاده شد (شکل ۱). جهت سنجش غلظت DNA استخراج شده از روش جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر استفاده گردید. مقدار ۲ میکرولیتر جهت خوانش بر روی دستگاه استفاده شد. غلظت DNA با استفاده از رابطه ۱ بدست آمد:

$$\text{رابطه (۱)} \quad ۵۰ \times \text{جذب} = ۲۶۰ = \text{غلظت DNA (ng/ul)}$$

جدول ۲- لیست پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

جایگاه	توالی پرایمر (3-5)	دمای اتصال	منبع
Mt1	AGGGCAATTCCTAATGTATTGGAC	58°C	Zhang و همکاران (۲۰۰۹)
Mt2	CGCAGTTAGAGCCGCATT	58°C	

۲۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۸ به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه انجام گرفت. در نهایت جهت تکمیل فرآیند همانندسازی از دمای بسط ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. جهت ارزیابی کیفیت تکثیر PCR، مقدار ۸ میکرولیتر از محصول بر روی ژل آگاروز ۲ درصد در حضور بافر TBE با شدت جریان ۱۲۰ ولت به مدت ۵۰ دقیقه قرار گرفت. تصویر ژل در دستگاه Documentation Gel بررسی شد (۲۹).

۲-۲-۵-۲- روش کار معمولی PCR

عملیات تکثیر با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس PCR (Ampliqon, Denmark)، ۵۰-۱۰۰، نانوگرم DNA، ۰/۵ میکرومولار از آغازگر روبه جلو^۱ و ۰/۵ میکرومولار آغازگر روبه عقب^۲ (غلظت ۱۰ میکرومولار) انجام شد (جدول ۳). چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه و به مدت ۵ دقیقه، ۴۰ سیکل حرارتی که شامل دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت

1. Forward
2. Reverse Primer

جدول ۳ - مواد لازم و مقدار هر یک از آن‌ها برای تهیه محلول پایه PCR

ماده شیمیایی	غلظت اولیه	غلظت نهایی	مقدار مصرف
Taq	۴/۰ U/ul	۲/۰ U/ul	۱۰ میکرولیتر
DNTPs	۴۰۰ uM	۲۰۰ uM	
MgCl ₂	۳ mM	۵/۱ mM	
Taq Buffer	۲x	۱x	
F Primer	۱۰ uM	۵/۰ uM (0.2-1 uM)	۲
R Primer	۱۰ uM	۵/۰ uM (0.2-1 uM)	۲
DNA	۱۰۰ ng/ul	۵ ng/ul	۲
ddH ₂ O	-	-	
Total			۲۰

نرم افزار Excel و تجزیه و تحلیل آماری داده های کمی با نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- انتخاب روش آزمون

روش های کیفی استاندارد برای شناسایی تقلب ها، تحت استاندارد ملی کشور مربوطه پوشش داده می شود. مهم ترین این روش ها بر پایه توسعه ویژگی های رنگی، کدورت یا رسوب به منظور ارزیابی میزان ترکیب نشانگر در یک ماده مشکوک به تقلب استوار است (۲۲). در پژوهش Alonso و همکاران (۱۹۹۷) امکان استفاده از کروماتوگرافی گازی برای تفکیک روغن های گیاهی، چربی شیر و مخلوط چربی شیر و روغن های گیاهی بررسی شد. محققین با استفاده از کروماتوگرافی گازی به خوبی توانستند روغن پالم موجود در چربی شیر را در دو سطح ۵ و ۱۰ درصد با استفاده از پروفایل استرولی تشخیص دهند. پروفایل استرولی روغن پالم شامل کلسترول، کمپسترول، استیگماسترول و بتاستیواسترول بود که تمامی این استرول ها در کروماتوگرام مربوط به مخلوط چربی ها قابل تشخیص بود (۵). در حقیقت، تنوع طبیعی ترکیب شیمیایی، مانع از به کار گرفتن نشانگر شاخص برای هر نوع خاص از روغن می شود. روشهای متمرکز بر ترکیبات شیمیایی فاقد حساسیت بالا بوده، محدودیت شناسایی داشته و زمان بر هستند (۱۵). برخی از محققین نیز گزارش کردند که تعیین پروفایل اسیدهای چرب به تنهایی ایزاری مناسب برای اعتبارسنجی نمونه های لبنی محسوب نمی شود. به عنوان

۲-۲-۶- کمی سازی در روش PCR زمان واقعی

۲-۲-۶-۱- روش کار

واکنش های real time PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر در دستگاه stepOne real time PCR (ABI, USA) و کیت SYBR green 2x (Ampliqon, Denmark) در سه تکرار دستگاهی مستقل اجرا گردید. مقدار ۵ میکرولیتر از کیت به همراه ۰/۲۵ میکرولیتر از پرایمرها و ۱۰ میکرولیتر از DNA نمونه در واکنش ها استفاده شد. واکنش تکثیر در برنامه دمایی ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، ۴۰ سیکل با دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه صورت گرفت. در نهایت آزمون نقطه ذوب با شیب دمایی ۰/۳ درجه سانتی گراد از دمای ۶۵ درجه تا دمای ۹۵ درجه سانتی گراد اجرا گردید (۲۹).

۲-۲-۶-۲- آنالیز نتایج

نتایج آزمون کمی سازی از دستگاه به صورت فایل اکسل دریافت شد و فاکتور C یا سیکل آستانه کمی سازی شده دستگاه، جهت آنالیزهای حد کمی سازی (LOQ) و حد تشخیص (LOD) مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲-۷- روش آماری

کلیه آزمایش ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام گرفته و مقایسه میانگین ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($P > 0/05$) انجام گرفت. رسم منحنی ها با

۳-۲- انتخاب ژن هدف مناسب

جفت پرایمر Mt1/Mt2، با تولید آمپلیکون با ۱۰۹ جفت باز، برای ژن MT3-B و PATE1/PATE2، با تکثیر قطعه آمپلیکون با ۲۵۳ جفت باز، برای ژن PATE انتخاب شد. با توجه به این که ممکن است از روش PCR برای شناسایی نمونه‌های به شدت فرابندشده استفاده شود، اولویت به جفت پرایمر Mt1/Mt2 داده شد زیرا آمپلیکونی با اندازه کوتاه تر تولید می‌کند (۲۹).

۳-۳- ارزیابی کمی و کیفی DNA استخراج شده

غلظت‌های مختلف DNA استخراج شده بر حسب واحد (ng/ul) در جدول ۴ نشان می‌دهد که میزان DNA استخراجی در نمونه روغن کنجد و روغن پالم ۱۰۰ درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند. دلیل احتمالی نتیجه مطالعه حاضر را می‌توان در فرآیند استخراج روغن از گیاهان حاوی روغن جستجو کرد؛ زیرا در این فرآیند، بخش زیادی از DNA گیاه وارد روغن نمی‌شود. با این وجود، هدف اصلی مطالعه حاضر این است که حد تشخیص به حد قابل قبولی برسد و بتوان از طریق DNA پالم به میزان تقلب در ماست رسید. مطابق جدول ۴، بیشترین و کمترین غلظت DNA استخراج شده به ترتیب متعلق به نمونه روغن پالم ۳ درصد و ۱۰۰ درصد است. در حالی که در بین تمام نمونه‌ها، غلظت DNA استخراج شده در روغن کنجد و بعد از آن در نمونه روغن کنترل کمتر از سایر نمونه‌ها بود (جدول ۴).

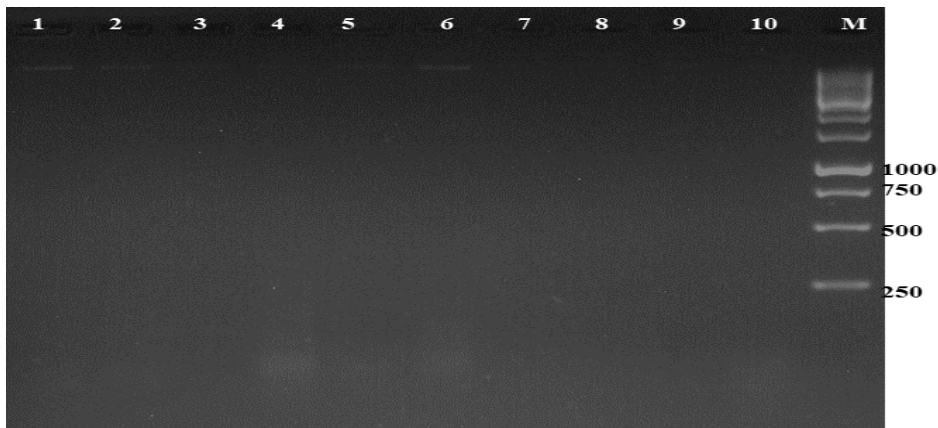
مثال، در بررسی Soha و همکاران (۲۰۱۵)، کارایی پروفایل اسیدهای چرب در جداسازی نمونه‌های چربی شیر مخلوط شده با پالم اولئین، روغن پالم و روغن نارگیل از چربی شیر خالص بررسی شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان کلسترول در نمونه‌های حاوی چربی گیاهی به طور معنی‌داری کمتر از چربی خالص شیر است. همچنین، میزان بتاسیتواسترول به عنوان فیتواسترول شاخص در گره خالص، صفر درصد بود؛ اما در گره مخلوط شده با روغن‌های گیاهی، این میزان بیش از ۱/۵ درصد گزارش گردید. همچنین محققین دریافتند که پروفایل اسیدهای چرب و استرول هیچ یک به تنهایی شاخص مناسبی برای اعتبارسنجی نمونه‌های کره تلقی نمی‌شوند (۲۴). در یک مطالعه دیگر نیز گزارش شد به دلیل اینکه ترکیب اسیدهای چرب شیر از تنوع و تغییرپذیری بالایی برخوردار هستند، ترکیب اسیدهای چرب ابزار مناسبی برای اعتبارسنجی و تشخیص تقلبات در چربی شیر نمی‌باشد (۱۰). علاوه بر لبنیات، از مطالعات صورت گرفته در این زمینه می‌توان به تحقیق پیرانی و همکاران (۱۳۸۸) در مورد مناسب بودن روش multiplex-PCR برای تشخیص هم‌زمان گوشت گاو، گاو میش، گوسفند و بز با استفاده از ژن سیتوکروم میتو کندری اشاره نمود (۲). همچنین به پژوهش هاشم‌زادگان و همکاران (۱۳۹۷) در بررسی همبرگرهای ممتاز در شهر تهران برای اثبات تقلب جایگزینی گوشت مرغ با بخشی از گوشت گاو اشاره کرد (۴). روش آزمون در مطالعه حاضر بررسی وجود روغن پالم روغنی (*E. guineensis*) در ماست بر اساس ژن خاص و ایجاد روش‌های PCR معمولی زمان واقعی، بر اساس توالی ژنی مخصوص گونه نخل روغنی بود.

جدول ۴ - غلظت‌های مختلف از DNA استخراج شده (ng/ul)

غلظت DNA (ng/ul)	نام نمونه
۲/۰۲	روغن کنترل
۵/۳	روغن پالم ۲ درصد
۱۵/۳	روغن پالم ۳ درصد
۳/۱	روغن پالم ۴ درصد
۶/۹	روغن پالم ۵ درصد
۱۳/۳	روغن پالم ۱۰ درصد
۱۰/۹	روغن پالم ۳۰ درصد
۱۱/۶	روغن پالم ۵۰ درصد
۲/۶	روغن پالم ۱۰۰ درصد
۱/۹	روغن کنجد

حضور بافر TBE، با شدت جریان ۱۲۰ ولت به مدت ۵۰ دقیقه انجام گرفت (شکل ۱).

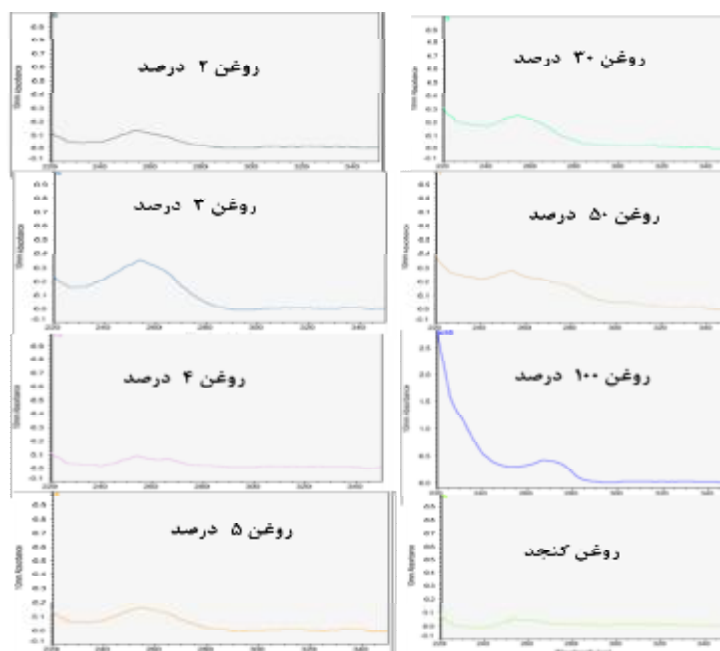
جهت ارزیابی کیفیت تکثیر PCR، الکتروفورز مقدار ۸ میکرولیتر از محصول، بر روی ژل آگاروز ۲ درصد در حضور



شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز برای محصولات PCR معمولی

۱۰۰ درصد بود. بین نمونه‌های روغن پالم ۴ درصد، ۵ درصد و روغن کنجد تفاوت معنی‌داری در میزان جذب وجود نداشت (شکل ۲).

در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که کمترین و بیشترین میزان جذب (10mm) بین نمونه‌های مورد بررسی، به ترتیب مربوط به نمونه روغن کنترل (چربی ماست بدون پالم) و روغن پالم

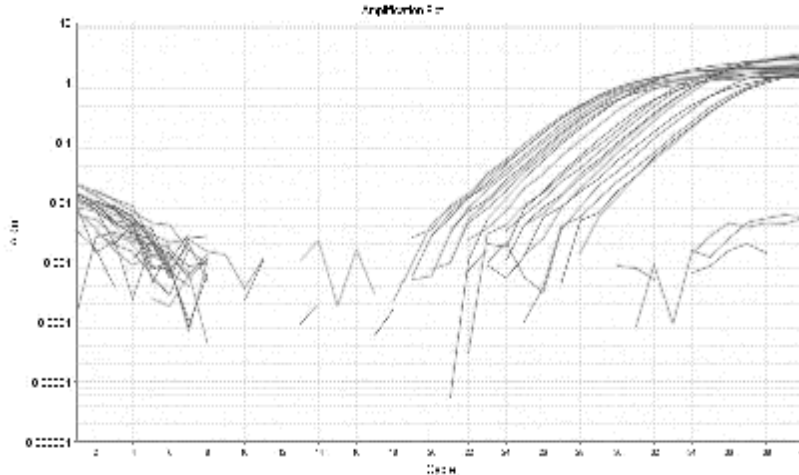


شکل ۲- منحنی‌های جذب مربوط به غلظت‌های مختلف از DNA استخراج شده در روغن کنترل و روغن پالم در رقت‌های مختلف

جهت تسهیل انواع مختلف واکنش‌های qPCR، انواع مختلف پلیمراز استفاده می‌شوند که این پلیمرازها دارای صحت بالا، سرعت و مقاومت حرارتی بالایی هستند؛ بنابراین، تجهیزات PCR زمان واقعی جهت انجام این واکنش‌ها طراحی می‌شوند که شامل ترمال سایکل برای تکثیر DNA، سیستم نوری برای برانگیختن فلوروسانس‌ها (fluorophores)، گرفتن فلورسنس ناشی از شیمی آشکارسازی و نرم‌افزار ویژه برای جمع‌آوری و آنالیز داده‌های کمی تولید شده است (۲۲). اگر منحنی میزان تکثیر محصول در PCR زمان واقعی بر حسب سیکل‌های PCR ترسیم گردد، می‌توان دریافت که این منحنی شامل سه فاز می‌باشد که عبارت است از: مرحله اول: فاز خطی (Linear phase یا Baseline region) در این فاز میزان تکثیر محصولات به اندازه‌ای نیست که منجر به افزایش نور فلورسنت گردد. نور فلورسنت مشاهده شده در این فاز از cDNA، پرایمرها و رنگ‌های فلورسنت آزاد در محیط واکنش نشی می‌یابد؛ بنابراین در این فاز میزان نور ساطع شده به صورت خطی می‌باشد. مرحله دوم: فاز نمایی و فاز لگاریتم خطی (Exponential phase و liner Log phase): در این فاز میزان محصول دو رشته‌ای در هر چرخه دو برابر می‌شود؛ بنابراین میزان محصولات به صورت نمایی افزایش می‌یابد.

۴-۳- Real time-PCR or quantitative PCR (qPCR)
 PCR زمان واقعی یا PCR کمی در سال ۱۹۹۲ توسط Higuchi و همکارانش معرفی شد و می‌تواند به منظور اندازه‌گیری تکثیر DNA در هر چرخه PCR، رنگ فلورسنت گزارشگری مثل سایبرگرین I را آشکارسازی کند. در طول فاز خطی لگاریتمی تکثیر، فلورسنس تا نقطه‌ای افزایش می‌یابد که قابل سنجش شود و به عنوان چرخه آستانه (Ct) یا نقطه تقاطع نامیده می‌شود؛ بنابراین با استفاده از رقت‌های متوالی DNA استاندارد با مقدار مشخص، می‌توان مقدار DNA یا cDNA نمونه ناشناخته را به عنوان ارزش Ct با استفاده از ترسیم منحنی استاندارد لگاریتم غلظت در مقابل Ct محاسبه کرد. qPCR، تکثیر و آشکارسازی نمونه را در یک مرحله انفرادی با هم انجام می‌دهد؛ از این رو نیاز به هر فرآیند پس از تکثیری را رفع می‌کند. مزیت‌های دیگر qPCR، حساسیت، تعیین پیشرفت واکنش در زمان واقعی، سرعت آنالیز و سنجش دقیق مواد مورد آزمون در نمونه است. این امر در نتیجه وجود رنگ‌های فلورسنس یا پروپ‌های اولیگونوکلئوتیدی نشان‌دار با فلورسانس است که شدت آن‌ها با مقدار محصول DNA تولید شده متناسب می‌باشد (۲۳).

مطالعه حاضر میزان محصولات تکثیر شده تا سیکل ۱۹ تغییر محسوسی نداشتند؛ اما از سیکل ۱۹، واکنش وارد فاز افزایشی یا نمایی گردید که به میزان DNA الگوی اولیه بستگی داشت. هر چه میزان الگوی اولیه یا روغن پالم بیشتر بود و به عبارت دیگر، DNA روغن پالم بیشتری داخل نمونه مورد ارزیابی وجود داشت، واکنش PCR در سیکل پایین تری وارد فاز نمایی شد.



شکل ۳ - منحنی تکثیر ژن MT3-B نمونه‌های مورد بررسی در پژوهش حاضر

مرحله سوم: فاز مسطح (phase plateau): در این فاز، ترکیبات واکنش از بین می‌روند و دیگر محصولی تکثیر نمی‌شود؛ بنابراین افزایشی در میزان فلورسنت مشاهده نمی‌شود. در اصطلاح PCR زمان واقعی در این مرحله اشیاع شده است (۱). شکل ۳، نمودار تکثیر محصولات در PCR زمان واقعی بر حسب سیکل را نشان می‌دهد. همان گونه که مشاهده می‌شود در

۳-۵-۳ - چرخش آستانه Ct

سیکل مرجع را به صورت توافقی می‌توان به عنوان سیکلی که محصولات وارد فاز لگاریتم خطی می‌شوند در نظر گرفت. در تکنیک PCR زمان واقعی به این سیکل مرجع به اصطلاح چرخش آستانه یا (cycle of threshold) Ct گویند. در دستگاه‌های PCR زمان واقعی این حد آستانه بر اساس فرمولهای خاصی تعیین می‌گردند. با این وجود مفهوم Ct برای همه دستگاه‌ها یکسان است و به مفهوم سیکلی است که در آن محصولات از یک حد آستانه فراتر می‌روند (۱). در نمودار تکثیر ژن (شکل ۴)، خطی به نام خط آستانه در نقطه $Rn = 75/0$ در میان دو خط $Rn = 05/0$ تا $Rn = 5/1$ (محدوده تعیین چرخش آستانه) رسم شد که خطوط را به صورت افقی قطع کرد. همان گونه که مشخص است، شیب خطوط در محل برخورد آن‌ها با خط آستانه، خطی و یکسان می‌باشد. با پیدا کردن نقطه متناظر، محل برخورد خط آستانه با منحنی تکثیر، در محور X مقدار سیکل Ct برای هر خط دست آمد که در مطالعه حاضر در محدوده ۲۶ تا ۴۰ سیکل بود.

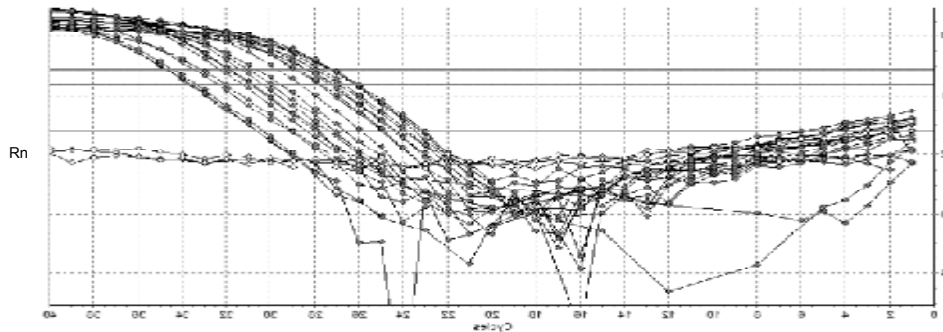
۳-۵-۴ - معیارهای حساسیت و قابلیت اطمینان آزمون

۳-۵-۴-۱ - LOD

بر اساس نتایج آزمون PCR زمان واقعی، LOD در محدوده ۰۵/۰ درصد روغن پالم تخمین زده شد. LOD به عنوان کمترین مقدار آنالیت (اندازه گیری شونده) در یک نمونه در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند با احتمال - تشخیص داده شود تعریف می‌شود؛ اگر چه ممکن است به عنوان یک مقدار دقیق، کمی سازی نشده باشد (۱۱).

۳-۵-۴-۲ - LOQ

بر اساس نتایج آزمون PCR زمان واقعی، LOQ در محدوده ۱/۰ درصد روغن پالم به دست آمد. LOQ به عنوان کمترین مقدار اندازه گیری شونده در یک نمونه در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند به صورت کمی تعیین شود و در شرایط آزمایشی بیان شده، با دقت قابل قبول تعیین شود (۱۱).



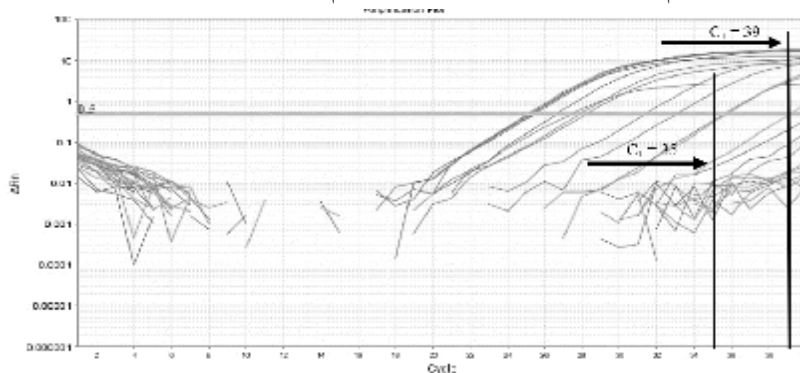
شکل ۴- محدوده تعیین خط آستانه منحنی تکثیر ژن Mt3-B

مطابق جدول ۵، برای رقت روغن پالم ۱۰۰ درصد، ۲۰ نانوگرم DNA وارد واکنش PCR زمان واقعی شد و برای رقت روغن پالم ۲ درصد، میزان DNA برابر با ۰/۵ نانوگرم تعیین گردید.

جدول ۵- ارزیابی حد تشخیص با توجه به چرخش آستانه (Ct)

میزان DNA (نانوگرم)	چرخش آستانه	نام هدف	روغن پالم (درصد)
۲۰	۹۰۷۹۹/۲۶	Mt3-B	۱۰۰
۱۰	۶۴۲۹۸/۲۷	Mt3-B	۵۰
۶	۳۶۷۴۷/۲۸	Mt3-B	۳۰
۲	۱۵۳۹۰/۳۰	Mt3-B	۱۰
۱	۴۶۳۶۱/۳۱	Mt3-B	۵
۸/۰	۴۴۰۱۴/۳۲	Mt3-B	۴
۷۵/۰	۷۴۶۰۷/۳۲	Mt3-B	۳
۵/۰	۳۷۵۶۸/۳۴	Mt3-B	۲
۰۲/۰	۲۴۵۸۲/۳۸	Mt3-B	۱/۰
۰۱/۰	۳۹/۸۰۰۹۶	Mt3-B	۰۵/۰

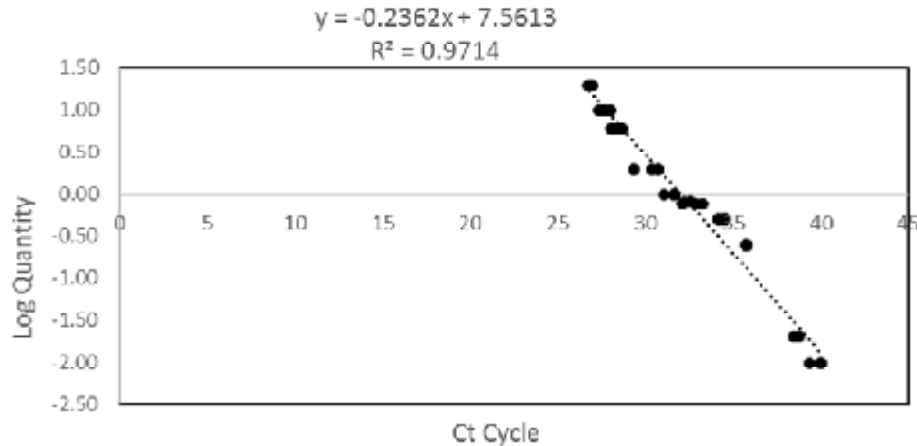
در PCR زمان واقعی، Ct مبنای تشخیص تقلب است. دامنه تشخیص تقلب در این پژوهش از ۰/۵ تا ۱۰۰ درصد روغن پالم بود. میزان آلودگی به روغن پالم با توجه به عدد چرخش Ct مشخص گردید (شکل ۵).



شکل ۵- منحنی تکثیر با تنظیم حد آستانه بهینه ۰/۵ برای تشخیص LOD و LOQ ژن Mt3-B

نمونه اولیه و مقادیر Ct را نشان داد. بر اساس شیب منحنی استاندارد، راندمان تکثیر MT3-B، ۹۹/۹۹ درصد و با تقریب حدود ۱۰۰ درصد محاسبه شد که در محدوده ۹۰ تا ۱۰۵ درصد توصیه شده توسط کمیسیون اروپا بود.

به منظور سنجش کارایی Real-time PCR، در هر واکنش PCR زمان واقعی، یک منحنی استاندارد با رسم مقادیر Ct به دست آمده در برابر لگاریتم مقدار اولیه DNA روغن پالم ایجاد شد (شکل ۶). منحنی استاندارد رابطه خطی بین مقدار



شکل ۶- منحنی استاندارد تهیه شده از داده های تکثیر ارائه شده در شکل ۴

۳-۵-۴- منحنی ذوب

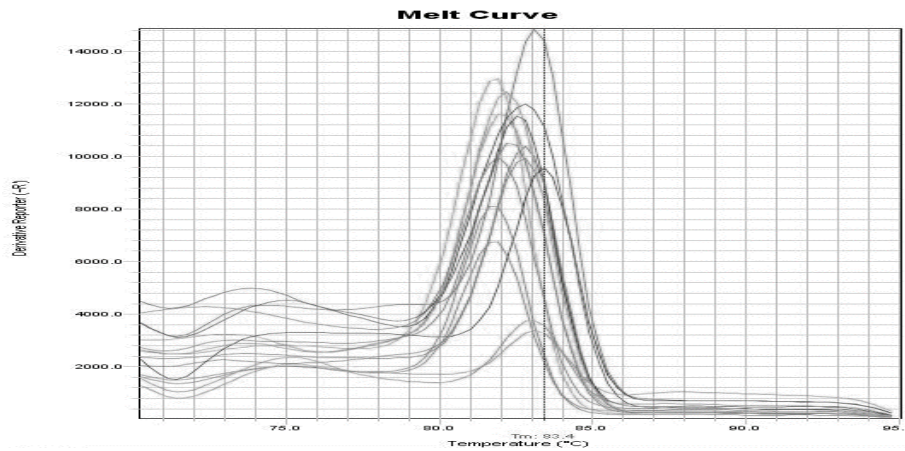
دمای ذوب DNA دو رشته‌ای به عنوان دمایی تعریف می‌شود که نیمی از مولکول‌های اسید نوکلئیک دو رشته و نیم دیگر، تک رشته هستند. دمای ذوب، انتقال از حالت مارپیچ دو رشته‌ای به حالت پیچ نامنظم را نشان می‌دهد (۲۵). تجزیه و تحلیل دمای ذوب محصول PCR در ترکیب PCR زمان واقعی اولین بار با Light Cyclers توسط Wittwer و همکاران (۱۹۹۷) معرفی شد. این روش برخلاف بسیاری از تکنیکهای تجزیه و تحلیل DNA، نیازمند هیچگونه پردازش یا جداسازی نیست (۲۸). تجزیه و تحلیل قله ذوب DNA، یک ابزار مفید و قوی برای تشخیص سریع محصولات PCR است. یک مطالعه کارایی نشان داد که این تکنیک به نیمی از زمان نیاز دارد و هزینه آن نصف PCR و الکتروفورز ژل آگارز است (۲۷).

به طور مداوم جمع‌آوری می‌شود، نمونه از طریق طیفی از دماها گرم می‌شود. هر DNA دو رشته‌ای موجود در نمونه در دماهای پایین به شدت فلورسانس می‌کند. با افزایش دما، فلورسانس ابتدا به آرامی کاهش می‌یابد و سپس در دمای مشخص، فلورسانس به سرعت کاهش می‌یابد و ذوب DNA به رشته‌های منفرد را نشان می‌دهد. دمای ذوب (Tm) یک DNA، مشخصه مقدار GC، طول و توالی آن هاست و دمایی است که در آن فلورسانس نرمال شده ۵۰ درصد است. Tm یک محصول PCR یک متریک مناسب است، اما تنها یک نقطه در منحنی ذوب است. اطلاعات بیشتر در منحنی ذوب کامل نسبت به Tm موجود است (۲۱). Tm الیگونوکلئوتید به چند فاکتور بستگی دارد که اساساً شامل غلظت الیگونوکلئوتید، غلظت نمک، توالی بازی الیگونوکلئوتید، طول رشته الیگونوکلئوتید و عدم وجود تکثیرهای غیر اختصاصی است (۱۸). دمای ذوب به عوامل مختلفی از جمله طول DNA (تکه‌های کوتاه‌تر تمایل دارند راحت‌تر ذوب شوند)، ترکیب توالی نوکلئوتیدی، غلظت نمک (قدرت یونی نمک اضافه شده) وابسته است و به طور کلی دمای ذوب بین ۵۰ درجه سانتیگراد و ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار دارد. DNA را نه تنها با حرارت دادن، بلکه با روش‌های دیگر می‌توان دناتوره کرد، به عنوان

برخی از رنگ‌ها در حضور DNA دو رشته‌ای به شدت فلورسان می‌کنند. آشنا ترین آن‌ها اتیديوم بروماید است که نوارهای قرمز رنگی را که اغلب در ژل‌های الکتروفورز مشاهده می‌شود، ایجاد می‌کند. رنگ‌های سیانین متریک نامتقارن مانند SYBR Green I و LCGreen، حتی روشن‌تر هستند و رنگ‌های انتخابی در آنالیز ذوب فلورسانس و PCR زمان واقعی هستند. به منظور ایجاد منحنی ذوب در حالی که فلورسانس

منحنی ذوب، بازتابی از توالی نوکلئوتیدی آمپلیکون می باشد. بنابراین، میزان همپوشانی بین منحنی ذوب DNA حاصل از PCR با منحنی ذوب نمونه کنترل و یا میزان تفاوت با آن، غیراختصاصی بودن آمپلیکون را تعیین خواهد نمود. از آن جایی که هر ژن دارای منحنی ذوب خاص خود می باشد بنابراین منحنی های یک ژن در تمام نمونه ها باید با هم منطبق باشند و همچنین باید تمام منحنی ها تک قله باشند. تشکیل یک قله به این معنی است که در PCR زمان واقعی یک محصول به وجود آمده است. اگر دو قله ایجاد شود، یعنی دو قطعه DNA با ترکیب نوکلئوتید متفاوت وجود داشته است و محل این دو قله در نمودار منحنی ذوب قابل تشخیص است. در مطالعه حاضر دمای ذوب برابر با ۸۳/۴ درجه سانتی گراد تعیین شد و یک قله در منحنی ذوب ایجاد شد که نشان دهنده وجود یک قطعه DNA (مربوط به روغن پالم) بود. اما قطعه DNA با ترکیب نوکلئوتید متفاوت از روغن پالم در DNA استخراج شده از نمونه وجود نداشت و یا در مراحل آزمون آمپلیکون غیراختصاصی بوجود نیامد که نشان دهنده بالا بودن کارایی روش مطالعه حاضر بود (شکل ۷).

مثال استفاده از حلال های آلی مانند فرمامیدو دی متیل سولفوکسید، لیگاند ها، افزایش PH محلول، کاهش غلظت نمک و غیره (۱۶). در دستگاه PCR زمان واقعی برای رسم منحنی ذوب بعد از اینکه ۵۰ سیکل از PCR به پایان برسد، دما به تدریج افزایش می یابد. DNA اساساً در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد (دمای پائین)، دو رشته ای است. به تدریج که دما بالا می رود، به نقطه ای می رسد که بوسیله جنبش مولکولی، پیوند هیدروژنی DNA شکسته می شود و DNA دو رشته ای تبدیل به تک رشته ای می گردد. تمام مولکول های سایبرگرین آزاد می شوند و شدت سیگنال هایی که به دستگاه می رسد، به شدت کاهش می یابد. نرم افزار از این تغییر ناگهانی مشتق می گیرد و در نمودار مشتق شده این تغییر به یک قله تبدیل می شود (شکل ۵). امروزه ترموسایکلرهای شیب دمایی به ابزاری مفید در تشخیص سریع بهترین دمای اتصال رشته ها جهت تکثیر ژن هدف تبدیل شده اند، ضمن این که از ایجاد پرایمر دو رشته ای نیز جلوگیری می نمایند. می توان آمپلیکون های غیراختصاصی را از یک نمونه مثبت واقعی بر اساس منحنی های ویژه ذوب DNA آنها تشخیص داد.



شکل ۷- منحنی ذوب ژن MT3-B نمونه های مورد بررسی

نمونه روغن پالم ۳ درصد بود. کمترین و بیشترین میزان جذب (10mm) بین نمونه های مورد بررسی به ترتیب مربوط به نمونه روغن کنترل و روغن پالم ۱۰۰ درصد تعیین گردید. دامنه مورد نظر برای تشخیص تقلب روغن پالم، از ۰/۰۵ تا ۱۰۰ درصد روغن پالم بود. LOD و LOQ به ترتیب برابر با ۰/۱ درصد و ۰/۰۵ درصد روغن پالم بود و میزان DNA که

۴- نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، DNA بار کد گذاری با PCR زمان واقعی به عنوان یک روش قابل اعتماد جهت ردیابی تقلب روغن پالم با سطوح ۲، ۳، ۴، ۵، ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۱۰۰ درصد و نمونه کنترل مثبت و منفی در ماست استفاده گردید. نتایج نشان داد که بیشترین غلظت DNA استخراج شده متعلق به

- American Oil Chemists' Society*, 74: 131-135.
6. Aparico, R. and Aparico-ruiz, R. 2000. Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, 881: 93-104.
 7. Aziznia, S., Khosrowshahi, A., Madadlou, A. and Rahimi, J. 2008. Whey Protein Concentrate and Gum Tragacanth as Fat Replacers in Nonfat Yogurt: Chemical, Physical, and Microstructural Properties. *Journal of Dairy Science*, 91: 2545-2552.
 8. Breck, G. S. and Bhatia, S. C. 2008. *Hand book of industrial oil and fat products*, CBS publisher and distributors.
 9. Casiraghi, M., Labra, M., Ferri, E., Galimberti, A. and De Mattia, F. 2010. DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method. *Briefings in bioinformatics*, 11: 440-453.
 10. Derewiaka, D., Sosinska, E., Obiedzinski, M., Krogulec, A. and Czaplicki, S. 2011. Determination of the adulteration of butter. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113: 1005-1011.
 11. Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L. and Kubista, M. 2017. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification*, 12:1-6.
 12. Horwitz, W. 1975. *Official methods of analysis*, Washington, DC, Association of Official Analytical Chemists.
 13. Joseph A, O. D. 1989. Milk Fat Technologies and Markets: A Summary of the Wisconsin Milk Marketing Board 1988 Milk Fat Roundtable. *J Dairy Sci*, 72: 3109-3115.
 14. Kamm, W., Dionisi, F., Hischenhuber, C., Schmarr, H.-G. and Engel, K.-H. 2002. Rapid detection of vegetable oils in milk fat by on-line LC-GC analysis of β -sitosterol as marker. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104:756-761.
 15. Karoui, R. and Debaerdemaeker, J. 2007. A review of the analytical
- وارد واکنش شد به ترتیب برابر با ۰/۰۲ و ۰/۰۱ نانو گرم تعیین گردید. کمترین میزان DNA که می تواند به وسیله PCR زمان واقعی شناسایی گردد، ۰/۲۵ نانو گرم است. آنالیز نمونه ها به منظور تعیین میزان روغن پالم در نمونه های ماست با استفاده از DNA بارکد گذاری به وسیله PCR زمان واقعی نشان داد که وجود روغن پالم را می توان با استفاده از این تکنیک با کیفیت و کمیت بهتری در مقایسه با بسیاری از روش های آنالیز تشخیص داد و نیز می توان از روش های مبتنی بر DNA به منظور کشف تقلبات در مواد غذایی به نحوی شایسته و با راندمان بالا استفاده نمود؛ اگرچه در این زمینه اطلاعات کامل و گسترده ای وجود ندارد و نیازمند انجام پژوهش های بیشتر و گذر زمان است.
- ### ۵- منابع
۱. آزمایشگاه جامع تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، ۱۳۹۷. دستورالعمل آنالیز و تفسیر Real-time PCR. روش عملیاتی استاندارد، کد SOP-A-005، چاپ اول.
 ۲. پیرانی، ن.، الیاسی زربین قبایی، ق. ۱۳۸۸. استفاده از ژن سیتوکروم b میتوکندری برای تشخیص همزمان گوشت گاو، گاو میش، گوسفند و بز به روش Multiplex-PCR. مجله پژوهش های علوم دامی، جلد ۱۹، شماره ۱، ۴۱-۴۹.
 ۳. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۷. ماست - ویژگی و روش های آزمون. استاندارد ملی ایران، شماره ۶۹۵، تجدیدنظر پنجم.
 ۴. هاشم زادگان، م.، حسینی، س.، تفویضی، ف.، بیات، م. ۱۳۹۷. سنجش مولکولی تقلب گوشت مرغ در همبرگر ممتاز به روش Simplex PCR و Duplex PCR. بهداشت مواد غذایی، دوره ۸، شماره ۲، پیاپی ۳۰، ۱-۱۲.
 5. Alonso, L., Fontecha, J., Lozada, L. and Juarez, M. 1997. Determination of mixtures in vegetable oils and milk fat by analysis of sterol fraction by gas chromatography. *Journal of the*

- on PCR, its types and applications. *Int J Adv Res Biol Sci*,1(7): 65-80.
24. Soha, S., Mortazavian, A., Piravi-vanak, Z., Mohammadifar, M., Sahafar, H. and Nanvazadeh, S. 2015. Adequacy of the Measurement Capability of Fatty Acid Compositions and Sterol Profiles to Determine Authenticity of Milk Fat Through Formulation of Adulterated Butter. *Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture*, 7:134-140.
 25. Tiwari, A. and Wadhwa, V. MeltDNA: A Tool for Prediction of DNA Duplex Hybridization and Melting Thermodynamics. *Bioinformatics India*, 1:35-43.
 26. Valentini, A., Pompanon, F. and Taberlet, P. 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution*, 24:110-117.
 27. Winder, L., Phillips, C., Richards, N., Ochoa-Corona, F., Hardwick, S., Vink, C. J., et al. 2011. Evaluation of DNA melting analysis as a tool for species identification: DNA melt analysis for species identification. *Methods in Ecology and Evolution*, 2:312-320.
 28. Wittwer, C. T. 2009. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Human Mutation*, 30:857-859.
 29. Zhang, L., Wu, G., Wu, Y., Cao, Y., Xiao, L. and Lu, C. 2009. The Gene MT3-B Can Differentiate Palm Oil from Other Oil Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:7227-7232.
 - methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food Chemistry*, 102:621-640.
 16. Khandelwal, G. and Bhyravabhotla, J.2010.A phenomenological model for predicting melting temperatures of DNA sequences. *PloS one*, 5(8): e12433.
 17. Ong, A. S. H. 1994. Nutritional aspects of palm oil: an introductory review. *Asia Pacific J Clin Nutr*, 3:201-206.
 18. Pei, A. Y., Oberdorf, W. E., Nossa, C. W., Agarwal, A., Chokshi, P., Gerz, E. A., et al.2010. Diversity of 16S rRNA Genes within Individual Prokaryotic Genomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:3886-3897.
 19. Poonia, A., Jha, A., Sharma, R., Singh, H. B., Rai, A. K. and Sharma, N. 2017. Detection of adulteration in milk: A review. *International Journal of Dairy Technology*,70:23-42 .
 20. Ramchandran, L. and Shah, N. P. 2008. Effect of Addition of Versagel on Microbial, Chemical, and Physical Properties of Low-Fat Yogurt. *Journal of Food Science*, 73:M360-M367.
 21. Reed, G. H., Kent, J. O. and Wittwer, C. T. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 8:597-608.
 22. Shukla, A., Dixit, A. and Singh, R. 2005. Detection of adulteration in edible oils. *Journal of oleo science*, 54:317-324.
 23. Singh, J., Birbian, N., Sinha, S. and Goswami, A. 2014. A critical review

(Original Research Paper)
**Identification of Palm Oil in the Formulation of Yogurt by
DNA- barcoding Using Real – time PCR**

Mohammad Dowlat Abadi¹, Seyyed Ali Mortazavi^{2*}, Hasan Ravansalar³, Mohammad Reza Saeidi Asl¹, Ahmad Pedram Nia¹

1- Department of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.

2- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3- Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Sabzevar University of Medical Science, Sabzevar, Iran.

Received:10/07/2021

Accepted:02/12/2021

Abstract

One of the common adulterations in milk and dairy products, is the addition of low-priced vegetable oils such as palm oil in order to increase the profitability of products. Therefore, there is an urgent need to develop accurate, fast and reliable identification techniques to protect consumers against this type of adulteration. The aim of the present study was DNA barcoding with real-time PCR as a reliable method for detecting palm oil fraud with levels of 2, 3, 4, 5, 10, 30, 50 and 100 % and positive and negative control samples in yogurt. According to the results, the highest and lowest concentrations of DNA extracted belonged to the palm oil sample of 100 % and 3% , respectively, while among all samples, the concentration of DNA extracted in sesame oil and then in the control oil sample was lower. It was determined from other samples. The lowest and highest adsorption rates (10mm) between the samples were control oil (excluding palm) and 100 % palm oil, respectively. There was no significant difference in absorption rate between 4%, 5% and sesame oil samples. The range for detecting palm oil adulteration was from 0.05% to 100% palm oil. LOQ and LOD were 0.1 % and 0.05 % of palm oil, respectively.

Keywords: Adulteration, Palm Oil, Real – Qtime Polymerase Chain Reaction, Yogurt, DNA – barcoding.

* Corresponding Author: mortazaviali802@gmail.com