



تشخیص هیستولوژیکی سویا در همبرگرهای خام منجمد ایران

• غلامرضا جاهد خانیکی، بخش بهداشت مواد غذایی، گروه مهندسی بهداشت محیط دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت: آذر ماه ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۱۳۸۲

چکیده

پروتئین سویا یکی از مهمترین و غالب ترین پروتئین‌های گیاهی است که در فرآورده های گوشتی مانند کالباس، سوسیس و همبرگر ایران استفاده می شود. جهت شناخت ترکیبات همبرگر و بهبود کیفیت آن استفاده از روش‌های میکروسکوپی دارای اهمیت بوده و روش‌های رنگ آمیزی بافتی در تباین اجزاء تشکیل دهنده نقش مهمی دارند. یکی از رنگ آمیزی‌هایی که در آزمایشگاه‌های بافت شناسی معمول می باشد رنگ آمیزی همتوکسیلین و اتوزین است. در این ارتباط ۸۰ نمونه از همبرگرهای خام منجمد از فروشگاه‌های مواد غذایی خریداری شد. نمونه ها در شرایط مناسب به آزمایشگاه بافت شناسی ارسال شد. سپس نمونه برداری و آزمایش بافت شناسی با رنگ آمیزی همتوکسیلین و اتوزین انجام گرفت. در میکروگراف های تهیه شده، بافت سویا با رنگ قرمز مشاهده شد ولی سلولهای لایه پالیسادینگ با رنگ روشن و دارای تالووی خاصی دیده شدند. مواد پروتئینی داخل سلولهای کوتیلدون سویا به رنگ قرمز و جدار کربوهیدراته سلول به رنگ آبی مشاهده شدند. بافت اکستروdat سیلندری که در واقع همان سلولهای کوتیلدونی دنا توره شده می باشند رنگ قرمز تیره به خود گرفته است و با توجه به ساختمان بافتی که دارد به خوبی از بافت عضلانی متمایز می گردد. در تمام نمونه های آزمایش شده بافت سویا مشاهده شد. لذا با توسل به روش های هیستولوژیکی، تشخیص سویا در همبرگر و تفکیک آن از بافت عضلانی امکان پذیر است.

واژه های کلیدی: سویا، همبرگر، روشهای هیستولوژیکی، همتوکسیلین و اتوزین

Pajouhesh & Sazandegi No:62 pp:71-75

Histological detection of soya in freezing raw hamburger of Iran

By: Jاهد Khaniki, Gh.R, Department of Environmental Health Engineering, Public Health School, Tehran university of Medical Sciences, Tehran, Iran., and Rokni, N., Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran- Iran.

Soya protein is an important and the most plant protein which is used in hamburger and Sausage in Iran. The Using of microscopic methods is significant in recognition of hamburger ingredients and its quality improvement. Tissue staining plays an important role in the counter stain of hamburger ingredients. Haematoxyline & Eosin staining is a common method in histology laboratory. For detection soya in hamburger, 80 freezing raw hamburger samples were bought from food stores. Samples were carried in suitable condition to histology laboratory. Then, sampling was done and pieces were stained by Haematoxyline & Eosin. The stained samples were examined under a light microscope. Soya tissue has a red color in micrographs. Palisading layer cells have a light color and a special radiant. The protein materials in cotyledon cells and cell carbohydrate wall were observed red and blue, respectively. Cylindrical extrudate tissue is denatured cotyledon cells and they observed dark red color and they are distinguished from muscular tissue. Also, it the results showed that Soya has been used in all samples. It was concluded that soya is detectable by histological methods in hamburger and it can differentiate than muscular tissues.

Key Words: Soya, Hamburger, Histological methods, Haematoxyline & Eosin.

مقدمه

دانه سویا از مواد پروتئینی، چربی و کربوهیدرات تشکیل شده است. روغن و پروتئین، ۶۰ درصد سویا را تشکیل می‌دهد. به طور کلی دانه کامل سویا حاوی ۴۰ درصد پروتئین، ۲۱ درصد چربی، ۳۴ درصد مواد کربوهیدرات و ۴/۹ درصد خاکستر می‌باشد (۱۸). پروتئین سویا یکی از مهمترین و غالب ترین پروتئین گیاهی است که به فرآورده های گوشتی مانند کالباس، سوسیس و همبرگر افزوده می‌شود (۵،۴). از آنجائی که مصرف پروتئین حیوانی به تنهایی برای برطرف کردن نیاز غذایی انسان کافی نمی‌باشند و از طرفی دیگر تولید اینگونه مواد پروتئینی نیز گران تمام می‌شود. از پروتئین های ارزان قیمت و قابل دسترس از جمله پروتئین های گیاهی مانند سویا می‌تواند این نیاز را برطرف سازد و در میان پروتئین های غیر گوشتی، پروتئین گیاهی سویا از همه بیشتر در تولید فرآورده های گوشتی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۴). در بسیاری از کشورها افزودن پروتئین سویا به فرآورده های گوشتی ممنوع و تقلب محسوب می‌شود ولی در کشور ما از آن استفاده می‌شود که نبایستی بیش از حد توصیه شده در ترکیب فرآورده های گوشتی باشد (۵،۴). در ایران معمولاً پروتئین سویا بصورت آرد مورد استفاده قرار می‌گیرد. سویا طعم خاصی است که در صورت استفاده زیاد این طعم در دهان به صورت نامطلوبی مشخص می‌باشد (۱۸). براساس قوانین ایالات متحده افزودن بیش از ۳/۵ درصد آرد یا کنسانتره به فرآورده های گوشتی (۱۳) و در ایران حداکثر بیش از ۵ درصد مجاز نمی‌باشد (۱). بکارگیری روش های شیمی‌بافت (Histochemical)، می‌تواند مقدار سوپای موجود در فرآورده گوشتی را براساس مقدار مواد کربوهیدرات موجود تخمین بزند که با اندازه گیری برخی از فلزات از جمله منگنز (Mn) این کار را می‌توان انجام داد ولی ترکیبات دیگر مانند ادویه در این کار دخالت می‌کند (۶). با توجه به استفاده روزافزون سویا در فرآورده های گوشتی می‌توان از روش های میکروسکوپی برای تعیین ترکیبات سویا به عنوان یک روش کیفی استفاده

کرد (۸). استفاده از معیارهای شیمی‌بافت و مورفولوژیکی برای تشخیص پروتئین های گیاهی از جمله سویا در فرآورده های گوشتی حائز اهمیت دارد (۹). از روش بافت شناسی و رنگ آمیزی براساس ساختمان بافتی به عنوان وسیله ای برای تشخیص سویا در همبرگر می‌توان بهره گرفت. تشخیص و تعیین پروتئین های غیر مرسوم (Novel proteins) مانند سویا که به طور خواسته یا ناخواسته به فرآورده گوشتی اضافه می‌گردد ضرورت دارد. در این مورد نه تنها برای کنترل پروتئین سوپای اضافی که بعنوان جانشین شونده برای پروتئین عضلات اسکلتنی مطرح می‌شود بلکه برای کمک به تکمیل قوانین در ارتباط با فرآورده های گوشتی از جمله همبرگر این مسئله لازم است که از روش های میکروسکوپی بهره گرفته شود. علاوه بر روش های بافت شناسی از روش های ایمونوشیمیایی، ایمونودیفرنسیاسیون، Dot-blotting آزمایش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (Indirect Immunofluorescence) (IIFT) و ژل الکتروفورز و همینطور روش های HPLC، Density gradient centrifuge و HPLC Isoelectric focusing می‌توان در تشخیص و اندازه گیری پروتئین سویا در فرآورده گوشتی بهره جست (۱۲،۶). این روشها نسبتاً ساده هستند و کاربرد آنها در مورد فرآورده های خام امکان پذیر است ولی در مورد موادی که پخته شده‌اند یا حرارت دیده اند نمی‌توانند به خوبی کاربرد داشته باشند و با توجه به نتایجی که توسط Medina در سال ۱۹۸۸ در مورد استخراج و اندازه گیری پروتئین در سوسیس ها توسط روش الیزا (ELISA) به دست آمده است می‌تواند مفید باشد (۱۵). با توجه به اهمیت کیفیت همبرگر و نوع ترکیبات تشکیل دهنده، شناخت خواص هیستولوژیکی پروتئین سویا و تفکیک آن از سایر بافتها بسیار مهم به نظر می‌رسد. به کارگیری روش رنگ آمیزی در شناسایی ساختمان ذرات سویا در همبرگر می‌تواند کمک فراوانی نماید. نظر به استفاده معمول از روش رنگ آمیزی همتوکسیلین و اتوزین در آزمایشگاههای بافت شناسی، از این روش در این تحقیق استفاده شده است.



مواد و روش کار

به منظور تشخیص پروتئین گیاهی سویا با استفاده از روش هیستولوژیکی تعداد ۸۰ نمونه همبرگر خام از فروشگاههای مواد غذایی انتخاب و مورد رنگ آمیزی همتوکسیلین - اتوزین قرار گرفت. نمونه ها به آزمایشگاه بافت شناسی منتقل و از قسمت های مختلف هر قطعه همبرگر نمونه هایی به ابعاد $1 \times 1 \times 1$ سانتی متر برداشت شد. پس از نمونه برداری، نمونه ها را با توجه به اینکه فاقد بافت کاملاً به هم چسبیده هستند و امکان جدا شدن ذرات وجود دارد در داخل لفافه ای توری مانند جای داده و برای مدت یک هفته در فرمالین ۱۰ درصد حاوی بافر داخل شد. به منظور پایداری کامل، فرمالین ظروف هرروز تعویض گردید. (حجم فرمالین مصرفی در هر ظرف حدوداً ۴۰ برابر حجم نمونه می باشد). نمونه ها پس از تثبیت کامل، جهت آگیری، شفافیت و آغستگی با پارافین در دستگاه اتونکنیون (Automatic Processor) یا هیستوکینت (Histokinette) قرار گرفت. سپس بلوکهای پارافین تهیه گردید و برای برش با دستگاه میکروتوم به اندازه استاندارد آماده گردید و برش نمونه های

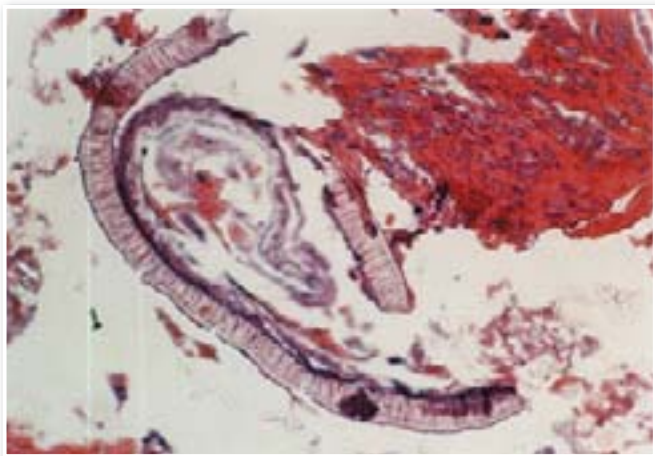
بافت به ضخامت ۶ میکرون آماده شد و رنگ آمیزی همتوکسیلین و اتوزین بر روی آنها انجام شد و سرانجام برش ها بر روی لام قرار داده شدند و قطره ای چسب کانادا بالزام (Canada balsam) روی آن قرار داده و سپس با لامل پوشانده شد. لامهای آماده شده با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد مشاهده قرار گرفتند (۳،۲).

مشاهدات و نتایج

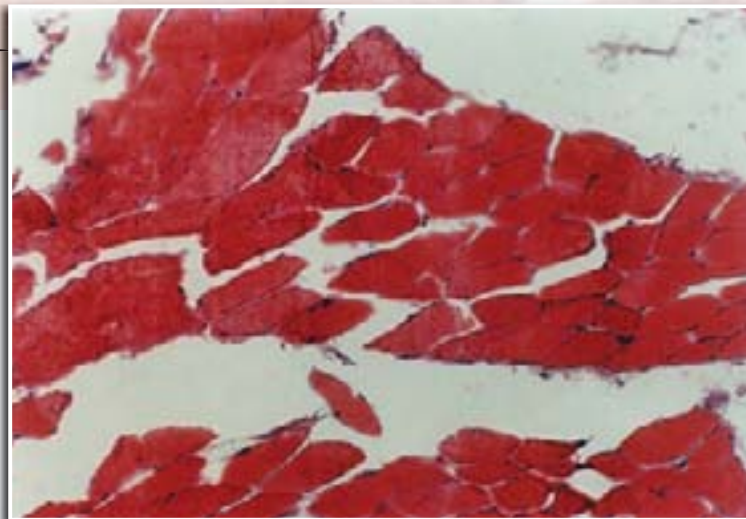
پس از تهیه برش و رنگ آمیزی، نمونه ها مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند و فتومیکروگرافهای لازم تهیه گردید. در فتومیکروگرافهای تهیه شده، بافت عضلانی (تصویر ۱) و بافت گیاهی سویا (تصاویر ۲، ۳ و ۴) مشاهده شدند. رشته های عضلانی رنگ قرمز روشن و هسته سلول عضلانی، رنگ آبی را بخود گرفته است. پروتئین بافتی سویا در رنگ آمیزی همتوکسیلین - اتوزین رنگ قرمز تیره به خود گرفته و فضاهای خالی نیز در لابلای پروتئین بافتی سویا دیده شد. وجود سلولهای لایه پالیسادیگ (Palisading layer) دلیل قاطعی مبنی بر استفاده از سویا در تولید

حالت به صورت اتفاقی دیده می شود و در تمام موارد نمی تواند با استفاده از روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین مشاهده شود. در این ارتباط نحوه قرار گرفتن کریستالها در برش فیلد میکروسکوپی و نیز انکسار نور می تواند بسیار مهم باشد. آنالیز نمودن مخلوطی از پروتئین های حیوانی و گیاهی در فرآورده های گوشتی مانند همبرگر می تواند مسئله ای بسیار پیچیده باشد مخصوصاً هنگامی که پروتئین ها در سلول روند تولید حرارت ببینند. انجام یک آزمایش ابتدایی میکروسکوپی در مورد کیفیت عمومی فرآورده خصوصاً در مورد کریستالهای اکسالات و ترکیبات سلولهای گیاهی همچون سویا و رنگ آمیزی دیواره پلی ساکاریدی آنها بسیار مفید است و استفاده از آزمایشهای بافت شناسی برای تشخیص پروتئین سویای اضافه شده به فرآورده گوشتی بسیار مناسب می باشند (۱۴،۱۰) در همین راستا Parisi (۱۶) و Cortesi (۱۰) با به کارگیری روش رنگ آمیزی Baner-Calleja و روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین حضور واقعی ذرات پروتئین سویا اضافه شده را نشان داده است. همچنین Bergeron (۷) تشخیص بافت شناسی اشکال مختلف سویا را در فرآورده های گوشتی مورد بحث قرار داده است (۷).

در سال ۱۹۸۷، Reusse و Schulze بر روی تشخیص بافت شناسی ذرات سویا در فرآورده های گوشتی با استفاده از رنگ آمیزی هم - آلوم - ائوزین و مقایسه آن با روش ایمونودیفوزیون کار کردند و نتیجه گرفتند که با استفاده از روش بافت شناسی می توان عناصر گیاهی سویا را در فرآورده گوشتی حرارت دیده تشخیص داد در حالیکه روش ایمونودیفوزیون اغلب ناتوان است. همینطور نتیجه گرفتند که روش بافت شناسی نمی تواند اشکال ایزولاست یا کنسانتره را از یکدیگر تشخیص دهد (۱۷). ضروری است که برای برطرف کردن این نقیصه خصوصیات پروتئین در مخلوط نیز مورد آنالیز قرار گیرد (۹).



تصویر ۲ - مقطع عرضی اکستروdat سیلندر یکال به همراه سلولهای پالیسادی سویا (۸۰×، H&E)



تصویر ۱ - مقطع عرضی بافت عضله مخطط (۸۰×، H&E).

همبرگر می باشد و می تواند به عنوان کلید تشخیص برای آنها استفاده شود (تصویر شماره ۲).

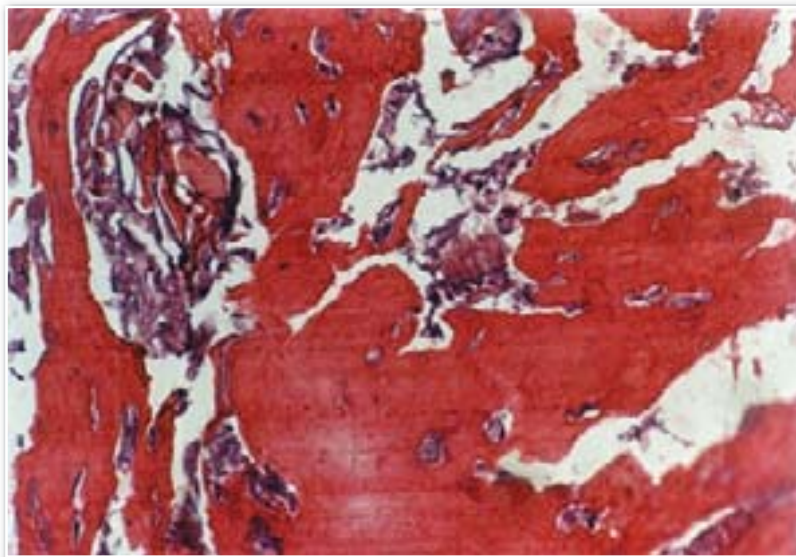
نتایج نشان داد که بافت سویا در فیلدهای میکروسکوپی بخوبی مشاهده شده و در تمام نمونه های آزمایش شده از سویا استفاده شده است و بوضوح از بافت عضلانی قابل تفکیک است.

بحث

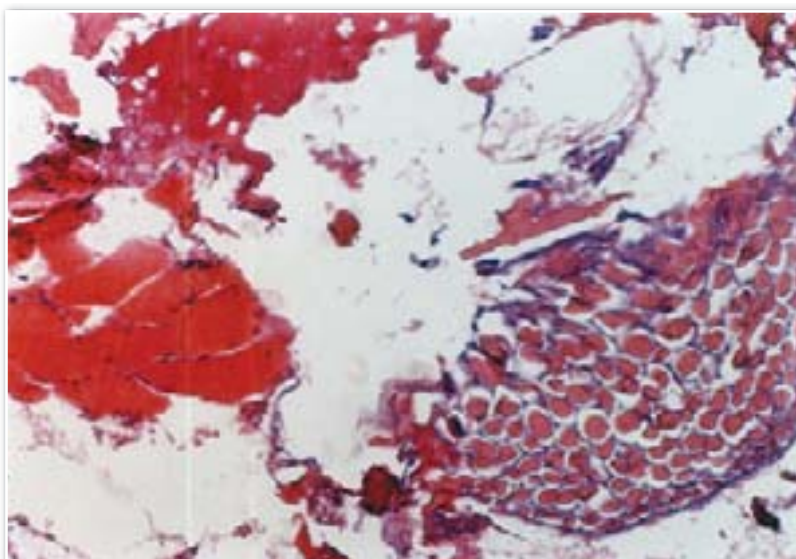
شناخت چگونگی آنالیز و اجزاء تشکیل دهنده هر گونه فرآورده گوشتی خرد شده از نظر کیفی لازم است و استفاده از آن در تکمیل قوانین و نیز تکنولوژی گوشت و فرآورده های گوشتی اهمیت ویژه ای دارد. در این باره به کارگیری روشهای میکروسکوپی و هیستولوژیکی زمینه را بسیار فراهم کرده است. تهیه فتومیکروگراف نگاه میکروسکوپی را بصورت ماکروسکوپی مشخص خواهد کرد و به کمیت و کیفیت ماده در محصول گوشتی کمک خواهد نمود. در برخی از کشورها وجود یا عدم وجود سویا در فرآورده های گوشتی حائز اهمیت است و در برخی دیگر مانند ایران اندازه گیری میزان سویای اضافه شده به سوسیس و کالباس و همبرگر مهم می باشد. برخی از محققین به این باورند که میکروسکوپ نوری به تنهایی نمی تواند پروتئین سویا را در فرآورده های گوشتی تشخیص دهد بلکه استفاده از میکروسکوپ پلاریزه را پیشنهاد می کنند به طوریکه در این روش خصوصیات سلولهای پالیسادی (Palisade) سویا در باقیمانده ای که بعد از استخراج با هیدروکسید پتاسیم وجود دارد بررسی می گردد. تعیین حضور کریستالهای اکسالات کلسیم در سلولهای کوتیلدون سویا می تواند به عنوان تست کیفی برای تشخیص آرد سویا و ترکیب آرد سویا در فرآورده های گوشتی باشد (۱۱). در نمونه ای از همبرگر که تهیه شده است در داخل سلولهای کوتیلدون، کریستالهایی دیده می شود که به احتمال قوی همان کریستالهای اکسالات کلسیم می باشد و با میکروسکوپ نوری نیز دیده می شود. این

(CHOH-CHOH) می باشد که به طور انتخابی با اسیدی مانند اسید پرپودیک محلول اکسید شود و به دی آلدئید (CHO-CHO) تبدیل گردد. اسید پرپودیک آلدئیدهای بعدی را اکسید نمی کند بنابراین کربوهیدرات های نامحلول باقی می ماند و حضورشان با استفاده از معرف شیف نشان داده شود. در رنگ آمیزی پرپودیک اسید شیف (Periodic Acid Schiff) مواد کربوهیدرات به صورت magenta رنگ می گیرند در حالیکه مواد پروتئین به رنگ آبی یا سبز در می آیند. در رنگ آمیزی هماتوکسیلین آئوزین مواد پلی ساکاریدی جدار سلولهای سویا به رنگ آبی روشن دیده می شود و مواد پروتئین داخل سلولهای سویا رنگ صورتی روشن با تلالوی درخشان مشاهده می شود. اکستروdat سویا به صورت رنگ قرمز تیره با ساختمان نامنظم و خلل و فرج مشاهده شده است و آن به علت تغییراتی است که در طول پروسس روغن گیری سویا بر روی دانه های سویا صورت گرفته است (۹). ممکن است بخشهایی از دانه سویا که به صورت ناقص عمل آوری شده اند ساختمان مشخصی را نشان دهند و ساختمان سلولی و ردیف های سلولی منظم دیده شود (۹). بطوری که در تصاویر شماره ۴ ساختمان سلولی مشخص از سویا دیده می شود و مواد پروتئینی داخل سلولها به رنگ قرمز و جدار کربوهیدراته سلول به رنگ آبی مشاهده می شود. در تصویر شماره ۳ مقطع عرضی از بافت اکستروdat سیلندری (Extrudate cylindrical) دیده می شود که نشان از استفاده از سویا در نمونه های همبرگر دارد. همچنین در تصویر شماره ۴ مقطعی از بافت اکستروdat سویا حاوی سلولهای کوتیلدونی مشاهده می شود که در داخل آنها مواد پروتئینی وجود دارد. در این تصویر مقطع عرضی بافت عضلانی در پائین و بخشی از بافت اکستروdat تغییر شکل یافته سویا مشاهده می شود و با توجه به تصویر شماره ۱ که بافت عضلانی مخطط است و دارای سلولهای عضلانی در اطراف می باشد به خوبی از بافت اکستروdat سویا از یکدیگر تفکیک می گردد. ساختمان بافت عضلانی بخوبی در مقطع میکروسکوپی فتومیکروگراف تهیه شده مشخص است و رشته های عضلانی به صورت رنگ قرمز روشن سلولهای عضلانی در حاشیه و به رنگ آبی مشاهده می گردد که با توجه به ساختمان منظم آن از اکستروdat بافتی سویا که دارای نقاط روشن توخالی است تفکیک می گردد (۹).

با توجه به اینکه افزودن مقادیر زیادی پروتئین های غیر گوشتی مانند سویا ممکن است اثرات سوء بر روی سلامت و بهداشت عمومی جامعه داشته باشد به همین منظور در برخی از کشورها درمورد افزودن پروتئین سویا فرآورده گوشتی از جمله همبرگر محدودیت قانونی وجود دارد (۱۴).



تصویر ۳- مقطع عرضی اکستروdat بافتی سویا
(H&E, ۲۰۰x)



تصویر ۴- مقطع عرضی عضله مخطط به همراه اکستروdat بافتی سویا و همچنین سلولهای کوتیلدونی حاوی پروتئین سویا (H&E, ۱۶۰x).

با استفاده از اکسیداسیون تحت کنترل می توان مواد کربوهیدرات موجود در فرآورده های پروتئین گیاهی را تشخیص داد و حضور آلدئید را (-CHO) را بررسی کرد که می تواند به عنوان روش مناسبی برای تشخیص میان مواد کربوهیدراتی در ارتباط با پروتئین های گیاهی از جمله سویا صورت گیرد و به عنوان روش نیمه کیفی مطرح شود. در سویا مواد کربوهیدرات ترکیبی از پلی ساکاریدها و مقدار قابل توجه سلولز و همی سلولز می باشد. این کربوهیدراتها حاوی گروه ۱، ۲ گلیکول

- 9- Coomaraswamy, M., and Olga, F. 1973. The Histochemical detection of Soya " Novel Proteins" in comminuted meat products. *Analyst*, 98 : 542-545.
- 10- Cortesi, M.L. 1977. The possibility of histological identification of extraneous proteins in raw sausages. *Archivio Veterinario Italiano*. 28(3-4):134-136.
- 11- Eldidye, A.C. 1981. Determination of Soya protein in processed foods. *Journal of the American Oil Chemists Society (JAOCS)*. 483-485.
- 12- Heitman, J. 1987. Demonstration of Soya protein in heated meat products with an indirect immuno fluorescence test. *Fleischwirtschaft*. 67(5):621-622.
- 13- Horn, D. 1987. Detection of plant protein preparations in meat products by histological methods. *Fleischwirtschaft*, 67(50):616-618.
- 14- Jousen, F.W., Voortman, G., and DeBaaij, A.J. 1987. Detection of wheat gluten, whey protein, casein, ovalbumin, and soy protein in heated meat products by electrophoresis blotting and immunoperoxidase staining. *J. Agric. Food. Chem* 35(4):563-567.
- 15- Medina, M.B. 1988. Extraction and quantitation of soy protein in sausages by ELISA. *J. Agric. Food. Chem*. 36:766-771.
- 16- Parisi, E., Maranelli, A.M., and Gioordano, A. 1974. Histological detection of soy protein in cooked meat products. *Veterinaria Italiano*, 25(9/10) 384-394.
- 17- Schulze, J.K., and Reusse, J. 1978. Histological detection of soya particles in meat products. *Fleischwirtschaft*, 57(10): 1638, 1640, 1653.
- 18- Wolf, W.J., and Cowman, J.C. 1975. Soybean as a food source. Revised edition, CRC Press, Inc, USA

گرچه استفاده از سویا در ایران به عنوان یک پرکننده و جایگزین بخشی از گوشت در فرآورده می‌باشد با این وجود بایستی میزان آن در همبرگر به کمک برنامه‌ها و نظارت‌های مشخصی تحت کنترل قرار داشته باشد. لذا به کارگیری روش‌های هیستولوژیکی یکی از ابزارهایی است که می‌تواند در کنترل کیفیت همبرگر موثر واقع شود.

منابع مورد استفاده

- ۱ - استاندارد ملی ایران. ۱۳۷۰. ویژگی‌های همبرگر خام منجمد. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. شماره ۲۳۰۴.
- ۲ - بهادری، مسلم. ۱۳۴۶. فن بافت شناسی. انتشارات دانشگاه تهران شماره ۱۱۲.
- ۳ - پوستی، ایرج. ۱۳۷۳. بافت شناسی مقایسه‌ای و هیستوتکنیک. انتشارات دانشگاه تهران. شماره ۱۹۴۴.
- ۴ - رکنی، نوردهر. ۱۳۷۴. علوم و صنایع گوشت. انتشارات دانشگاه تهران. شماره ۲۲۶۶.
- ۵ - شهرابی، حمزه و ناصری، علی. ۱۳۶۴. ارزش غذایی و روش‌های عملی کنترل بهداشتی و شیمیایی بعضی از فرآورده های گوشتی ایران. انتشارات واحد فوق برنامه. بخش فرهنگی دفتر مرکزی جهاد دانشگاهی.
- 6-Bailey, F.J. 1976. A novel approach to the determination of soya products in meat products using peptide analysis. *J. Sci. Fd. Agric.* 27: 827-830.
- 7-Bergeron, M., and Durand, P. 1997. Histological identification of different forms of soya in meat products. *Annales de la nutrition et, L. Alimention*. 31(2):261-270.
- 8- Carey, A.M., Archer, J.N., Peiore, J.R., and Kottula, A.W. 1984. Meat, poultry, and meat and poultry products. Histologic detection of cardiac musculature, soy flour, and partially defatted tissue in ground beef: Inter laboratory study. *Journal of the Association of official Analytical Chemists*. 67(1):16-19.

