

การตรวจสอบการปลอมปนพืชในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปด้วยเทคนิคพีซีอาร์

Plants Adulteration in Processed Food Products by PCR Technique

นิจรดา ยะหมื่น และ ชูตา บุญภักดี*

Nitrada Yameun and Chuta Boonphakdee*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Biology Department, Faculty of Science, Burapha University

Received : 11 June 2017

Accepted : 14 July 2017

Published online : 25 July 2017

บทคัดย่อ

ตรวจสอบการปลอมปนพืชหรือผลิตภัณฑ์จากพืชในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน *psaA* (Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1) ขนาดประมาณ 190 คู่เบส ทดสอบกับพืชจำนวน 7 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์จากพืชประเภทแป้ง 4 ตัวอย่าง เนื้อของสัตว์ 3 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป 5 ตัวอย่าง และน้ำมันจำนวน 3 ตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้ผลบวกอย่างจำเพาะกับกลุ่มตัวอย่างของพืช แป้ง ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป และน้ำมันทั้งหมด แต่ให้ผลลบที่ไม่เกิดผลผลิตพีซีอาร์กับตัวอย่างเนื้อสัตว์ทั้งหมด แสดงว่าปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณยีน *psaA* นั้นมีความจำเพาะกับกลุ่มของพืช และตรวจพบการปนพืชหรือผลิตภัณฑ์จากพืชในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปและน้ำมัน ปฏิกิริยาพีซีอาร์มีความไวที่ทดสอบได้กับดีเอ็นเอของถั่วเหลืองในปริมาณต่ำสุด คือ 5×10^{-4} นาโนกรัม ดังนั้น เทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *psaA* นี้สามารถนำมาใช้ตรวจสอบพืชและผลิตภัณฑ์ของพืชในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ : เทคนิคพีซีอาร์ ผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูป ยีน *psaA*

Abstract

The adulteration of plants or plant products in processed food products using polymerase chain reaction (PCR) of *psaA* (Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1) gene approximately 190 bp in size was examined. 7 plant samples, 4 plant starch samples, 3 meat samples, 5 processed meat samples and 3 milk samples were investigated. The PCR results of all plant, plant starch, and processed meat samples were positive, but only the meat samples were negative, indicating that plants or plant products adulteration existed in processed meat and milk products. The minimum amount of soybean DNA detectable by this PCR technique is 5×10^{-4} nanograms, making the developed PCR assay based on *psaA* gene available and efficient option for detecting plants and plant products adulteration in processed food products.

Keywords : PCR technique, processed food, *psaA*

*Corresponding author. E-mail : chuta@buu.ac.th

บทนำ

ปัจจุบันอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารถูกพัฒนาคุณภาพและรูปแบบเพื่อจูงใจและดึงดูดให้ผู้บริโภคได้เลือกซื้อสินค้ามากขึ้นจึงส่งผลให้มีการผลิตของปลอมเลียนแบบของแท้ เพื่อขายในราคาที่เทียบเท่าหรือถูกกว่าของแท้ และมีการปลอมปนผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อความสะดวกในการแข่งขัน และเพิ่มพูนกำไรจากการขายในราคาสินค้าของแท้ ลักษณะรูปแบบของอาหารปลอมนั้นเป็นไปได้หลายรูปแบบ อาทิ การปลอมปน การทำเลียนแบบ การผลิตสินค้าที่ไม่ได้มาตรฐาน และการติดฉลากลวง เป็นต้น (Boonshu *et al.*, 2014) โดยเฉพาะส่วนประกอบของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิต เช่น ในผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์แปรรูป เช่น ไส้กรอก และลูกชิ้น มักจะมีการใช้แป้งซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากพืชเป็นส่วนประกอบในการผลิต รวมไปถึงผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจำพวกนมจากสัตว์ที่อาจมีการปลอมปนหรือปกปิดวัตถุดิบจากพืชที่ผิดกฎระเบียบเกี่ยวกับฉลากผลิตภัณฑ์โดยต้องระบุส่วนผสมไว้บนฉลากของผลิตภัณฑ์

ในการตรวจสอบพืชที่ปนอยู่ในอาหารแปรรูปต่างๆ นั้นไม่สามารถที่จะใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาได้ จำเป็นต้องใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมบนสายดีเอ็นเอ ในงานวิจัยนี้ศึกษาบริเวณยีน *psaA* (Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสงที่ 1 (Photosystem I; PS I) อยู่ในคลอโรพลาสต์จีโนมและเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีลักษณะเหมือนกันมากในกลุ่มพืช (Santabarbara *et al.*, 2005; Caffarri *et al.*, 2014) ร่วมกับเทคนิคพีซีอาร์ตรวจสอบพืชและผลิตภัณฑ์พืชปลอมปนในอาหารแปรรูปที่ทำมาจากเนื้อสัตว์ เนื่องจากเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย มีความจำเพาะ และมีความไวมากกว่าเทคนิคพื้นฐานอื่นๆ (Chikuni *et al.*, 1994a, 1994b; Zhang *et al.*, 1999) และสามารถที่จะวิเคราะห์กับผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปได้แม้ดีเอ็นเอจะมีการเสียหายไปแล้วก็ตาม

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การทดสอบความจำเพาะของเทคนิคพีซีอาร์

ทำการศึกษาตัวอย่างพืช 7 ชนิด คือ ข้าวโพด (*Zea mays* L.) มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) ถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) ถั่วเขียว (*Vigna radiate* L.) ข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) คะน้า (*Brassica alboglabra* L.) และต้นหอม (*Allium cepa* L.) แป้งจำนวน 4 ชนิด คือ แป้งถั่วเหลือง (soy flour) แป้งมันฝรั่ง (potato starch) แป้งข้าวเจ้า (rice flour) และแป้งข้าวเหนียว (sticky rice flour) ตัวอย่างเนื้อของสัตว์ 3 ชนิด คือ หมู (*Sus scrofa domestica* L.) โค (*Bos taurus* L.) และไก่ (*Gallus gallus* L.) ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป 5 ชนิด คือ ลูกชิ้น แฮม หมูยอ ไส้กรอก และกุนเชียง และตัวอย่างน้ำมัน 3 ตัวอย่าง คือ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าว และน้ำมันโค

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากพืชโดยใช้ไบอ้อนด้วยชุดสกัดสำเร็จสำหรับพืช SP Plant DNA Kit (Omega bio-tek, USA) การสกัดดีเอ็นเอจากแป้งและตัวอย่างน้ำมันใช้ชุดสกัดสำเร็จ E.Z.N.A.® Stool DNA Kit (Omega bio-tek, USA) และการสกัดดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป GMO food DNA extraction kit (TIANGEN, China) โดยทำตามคำแนะนำของบริษัท ส่วนเนื้อเยื่อของสัตว์ทำการสกัดโดยดัดแปลงขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากรายงานวิจัยของ Hoss and Paabo (1993) โดยใช้เนื้อสัตว์ 30 มิลลิกรัม ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วเติมสารละลาย cell lysis (100 mM NaCl, 100 mM Tris-Cl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0 และ 0.5% SDS) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และสารละลาย Proteinase K (20 mg/ml) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่ 55°C ซ้ำมคืน จากนั้นเติม RNase A (4 mg/ml) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม Protein precipitation solution (4 M Guanidine Thiocyanate, 0.1 M Tris-Cl, pH 7.5) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดทดลองใหม่แล้วเติม 100% isopropanol ปริมาตร 300

ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วเติม 70% ethanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยวิธี air-dried แล้วละลายด้วย nuclease free water ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอของทุกตัวอย่างด้วยเครื่อง NanoDrop spectrophotometer ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน *psaA* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 50 นาโนกรัมเท่ากันทุกตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ *psaA-L* 5' AGGCTGAGTAGCAGGAGCAA 3' และ *psaA-R* 5' GCACAGGCATC CCAAGTAAT 3' ซึ่งออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *psaA* ของข้าวโพด (*Zea mays*) GenBank accession no. X86563 ด้วยโปรแกรม Primer3 (<http://primer3.ut.ee>) ปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วยขั้นตอน pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C 3 นาที, denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C 30 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 58°C 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72°C 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ final extension 72°C 5 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 60 นาที เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder แล้วทำผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จ GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid Biotech, Taiwan) ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรง และพร้อมกันนี้ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของทุกตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอเท่ากับ 50 นาโนกรัม ด้วยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณยีน 18S *rRNA* ที่ออกแบบและใช้ในห้องปฏิบัติการที่ให้ผลผลิตได้ทั้งพืชและสัตว์มีขนาด 157 คู่เบส เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) โดยมีขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์เช่นเดียวกับยีน *psaA* ดังกล่าวข้างต้น

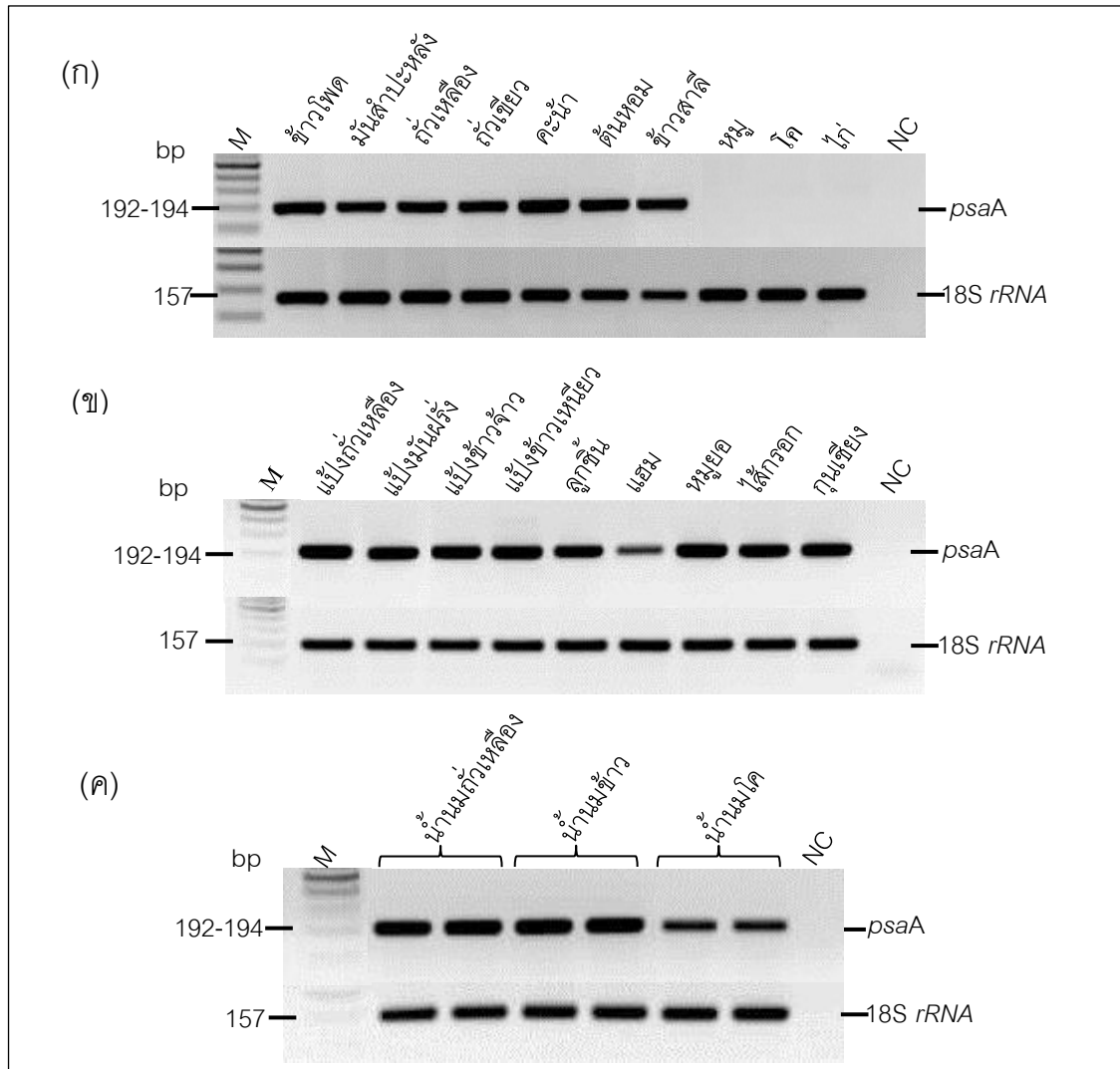
2. การทดสอบความไวของเทคนิคพีซีอาร์

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ในบริเวณยีน *psaA* ทำเช่นเดียวกับข้อที่ 2.1 แต่ใช้ปริมาณดีเอ็นเอของถั่วเหลืองความเข้มข้นเท่ากับ 5×10^1 , 5×10^0 , 5×10^{-1} , 5×10^{-2} , 5×10^{-3} , 5×10^{-4} และ 5×10^{-5} นาโนกรัม และวิเคราะห์ผลผลิตด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน *psaA* ที่จำเพาะกับพืชหรือผลิตภัณฑ์จากพืชด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะ โดยให้ผลบวกกับตัวอย่างพืช คือ ข้าวโพด มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และข้าวสาลี ซึ่งนิยมนำไปแปรรูปเป็นแป้งและใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปต่างๆ รวมถึงคะน้า และต้นหอม ซึ่งใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารสำเร็จรูป ได้ผลผลิตขนาดประมาณ 190 คู่เบส และไม่ให้ผลผลิตพีซีอาร์กับเนื้อของสัตว์ทั้งหมด โค และไก่ (ภาพที่ 1ก) ในขณะที่ผลการทดสอบในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป (ภาพที่ 1ข) และน้ำมัน (ภาพที่ 1ค) ปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน *psaA* ให้ผลบวก เช่นเดียวกับตัวอย่างพืช และแป้ง แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์อาหารเนื้อสัตว์แปรรูปที่นำมาทดสอบนี้ มีพืชหรือผลิตภัณฑ์จากพืชที่อาจเป็นแป้ง หรือประเภทอื่น เช่น เครื่องเทศเครื่องปรุงรส เป็นต้น ที่นำมาใช้เป็นส่วนผสม ซึ่งในการทดลองนี้ไม่สามารถระบุประเภทของพืชหรือผลิตภัณฑ์พืชที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ให้ผลบวก ส่วนในน้ำมันโคที่ปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้ผลบวกเช่นเดียวกันคาดว่ามีการปลอมปนพืชหรือผลิตภัณฑ์จากพืช ทั้งที่ฉลากของผลิตภัณฑ์น้ำมันนั้นระบุว่าป็นนมโคแท้ 100% ทั้งนี้ทุกปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ทดสอบให้ผลบวกกับยีน 18S *rRNA* ตัวควบคุมภายใน แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ บริเวณยีน *psaA* ที่ออกแบบขึ้นมาเพื่อใช้ในเทคนิคพีซีอาร์นี้ สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะกับกลุ่มของพืชและผลิตภัณฑ์จากพืช

เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *psaA* ของกลุ่มพืช ที่ทำการศึกษานี้ มีความแตกต่างกัน 21 ตำแหน่ง จากที่ทำการวิเคราะห์จำนวน 192-194 คู่เบส (ภาพที่ 3) โดยในกลุ่มของพืชที่ผลิตแป้ง (ข้าวโพด มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง และถั่วเขียว) มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมต่ำสุดเท่ากับ 0.005 (เปรียบเทียบระหว่างถั่วเหลืองกับถั่วเขียวซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Fabaceae) และสูงสุดเท่ากับ 0.072 (เป็นพืชต่างวงศ์กันระหว่างถั่วเขียว (วงศ์ Fabaceae) กับข้าวโพด (วงศ์ Poaceae)) (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่าบริเวณยีน *psaA* นั้นลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแปรปรวนต่ำจึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจสอบกับกลุ่มของพืชและผลิตภัณฑ์จากพืช



ภาพที่ 1 ผลผลิตพีซีอาร์บริเวณยีน *psaA* ของตัวอย่างที่ทำการศึกษาเมื่อตรวจสอบด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis หมายถึง M = 100 bp DNA ladder, NC = negative control
 (ก) ตัวอย่างพืช 7 ชนิด และตัวอย่างสัตว์ 3 ชนิด; (ข) ตัวอย่างแป้ง 4 ชนิด และตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารเนื้อสัตว์แปรรูป 5 ชนิด; (ค) ตัวอย่างน้ำนม 3 ชนิด (ทำ 2 ซ้ำ)

ตารางที่ 1 ระยะห่างทางพันธุกรรมในบริเวณยีน *psaA* ของกลุ่มพืชที่ทำการศึกษา

Species	<i>Glycine max</i>	<i>Vigna radiata</i>	<i>Brassica alboglabra</i>	<i>Manihot esculenta</i>	<i>Zea mays</i>	<i>Allium cepa</i>
<i>Glycine max</i>	0.000					
<i>Vigna radiata</i>	0.005	0.000				
<i>Brassica alboglabra</i>	0.032	0.038	0.000			
<i>Manihot esculenta</i>	0.038	0.043	0.038	0.000		
<i>Zea mays</i>	0.066	0.072	0.066	0.060	0.000	
<i>Allium cepa</i>	0.043	0.049	0.055	0.055	0.038	0.000

สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณยีน *psaA* ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นมาอย่างจำเพาะกับกลุ่มของพืชและผลิตภัณฑ์ของพืช ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 190 คู่เบส สามารถนำมาใช้ตรวจสอบพืชและผลิตภัณฑ์จากพืช รวมถึงการปลอมปนในผลิตภัณฑ์อาหารเนื้อสัตว์แปรรูป เช่น ลูกชิ้น แฮม หมูยอ ไส้กรอก และกุนเชียง รวมถึงน้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันข้าวได้อย่างจำเพาะ เมื่อสุ่มทดสอบกับนมโคแท้ 100% บางตัวอย่าง พบว่าปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้ผลบวกซึ่งแสดงว่าตัวอย่างดังกล่าวมีการปลอมปนพืชหรือผลิตภัณฑ์จากพืช เทคนิคพีซีอาร์นี้มีความไวที่สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากพืชได้ต่ำสุดเท่ากับ 5×10^{-4} นาโนกรัม ดังนั้นเทคนิคนี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจสอบการปลอมปนพืชและผลิตภัณฑ์จากพืชในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูป รวมถึงตรวจสอบความถูกต้องบนฉลากของผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปต่างๆ ต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Boonshu, B, Chanacot, N., & Jingan, K. (2014). Be carefull sophistication food. Department of Science service, *Ministry of Science and technology*, 194, 7-9. (in Thai)
- Caffarri, S., Tibiletti, T., Jennings, R.C., & Santabarbara, S. (2014). A comparison between plant photosystem I and Photosystem II Architecture and functioning. *Current Protein & Peptide Science*, 15(4), 296-331.
- Che Man, Y.B., Aida, A., Raha, A., & Som, R. (2007). Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for halal verification. *Food Control*, 18(7), 885-889.
- Chikuni, K., Tabata, T., Kosugiyama, M., Monma, M., & Saito, M. (1994a). Polymerase chain reaction assay for detection of sheep and goat meats. *Meat Science*, 37, 337-345.
- Chikuni, K., Tabata, T., Saito, M., & Monma, M. (1994b). Sequencing of mitochondrial *cytochrome b* genes for the identification of meat species. *Animal Science and Technology (Jpn)*, 65, 571-579.

- Hoss, M., & Paabo, S. (1993). DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Research*, *21*(16), 3913-3914.
- Safdar, M., & Abasiyanik, M.F. (2013). Development of fast multiplex real-time PCR assays based on EvaGreen fluorescence dye for identification of beef and soybean origins in processed sausages *Food Research International*, *54*, 1652-1656.
- Santabarbara, S., Kuprov, L., Fairclough, W.V., Purton, S., Hore, P.J., Heathcote, P., & Evanz, M.C. (2005). Bidirectional electrotransfer in photosystem I: determination of two distances between P700+ and A1- in spin-correlated radical pairs. *Biochemistry*, *44*(6), 2119-2128.
- Zhang, G.H., Zheng, M.G., Zhou, Z.J., Ouyang, H.S., & Lu, Q. (1999). Establishment and application of a polymerase chain reaction for the identification of beef. *Meat Science*, *51*, 233-236.