

## **GIDALARDA HİLE AMACIYLA KULLANILAN BAZI BİTKİ KAYNAKLI BİLEŞENLERİN GERÇEK ZAMANLI PZR İLE TESPİTİ**

**Zülal Kesmen<sup>1\*</sup>, Mine E. Büyükkiraz<sup>1</sup>, Neslihan Kahraman<sup>2</sup>, Hasan Yetim<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kayseri/ Türkiye

<sup>2</sup>Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Kayseri Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü, Kayseri/ Türkiye

Geliş / Received: 20.12.2016; Kabul / Accepted: 10.02.2017; Online baskı / Published online: 16.03.2017

Kesmen, Z., Büyükkiraz, M.E., Kahraman, N., Yetim, H. (2017). Gıdalarda hile amacıyla kullanılan bazı bitkisel kaynaklı bileşenlerin gerçek zamanlı PZR ile tespiti. GIDA (2017) 42 (3): 305-314 doi: 10.15237/gida.GD16110

### **Öz**

Piyasa araştırmaları Ülkemizde ekonomik değeri yüksek bitki kaynaklı bazı gıda bileşenlerinin yerine, hile amacıyla daha ucuz bitkisel ürünlerin kullanılabilirdiğini ortaya koymuştur. Bu şekilde yapılan üretimlerde, Antep fıstığı, kestane ve bademe yönelik tağşişli uygulamalar öne çıkmaktadır. Tüketicilerin korunması ve haksız rekabetin önlenmesi için bu tür hileli üretimlerin hassas ve güvenilir metotlar ile tespit edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle bu çalışmada çeşitli gıda ürünlerinde Antep fıstığı yerine bezelye, kestane yerine fasulye ve badem yerine kayısı çekirdeğinin hile amaçlı kullanımlarını belirlemek için gerçek zamanlı PZR TaqMan probe tekniğine dayalı yöntemler geliştirilmiştir. Bu amaçla bezelye ve fasulye türleri için kloroplast tRNA-Leu (*trnL*) geni, kayısı için de kromozomal S14 F-box protein geni üzerinde türe spesifik primer-prob setleri dizayn edilmiştir. Dizayn edilen primer-prob setleri kullanılarak gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR reaksiyonlarında, kayısı çekirdeğinin %0.1, bezelyenin %0.01 ve fasulyenin ise %0.001 seviyesine kadar diğer bitki türleri ile çapraz reaksiyon olmaksızın tespit edilebileceği ortaya konulmuştur. Diğer taraftan geliştirilen yöntemlerin, Antep fıstığı-bezelye, kestane-fasulye ve badem-kayısı çekirdeğinden oluşan ikili karışımlarda da başarılı sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, bezelye, fasulye ve kayısı çekirdeğinin hassas ve güvenilir şekilde tespitine yönelik olarak geliştirilen yöntemlerin, bu bitki türlerinin hile amaçlı kullanımlarının belirlenmesi için yapılan rutin kontrollerde başarılı bir şekilde kullanılabilirdiği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Gıda, tağşiş, bitki türleri, gerçek zamanlı PZR

## **DETECTION OF FRAUDULENT PRACTICES INVOLVING SOME PLANT DERIVED COMPOUNDS IN FOODS USING REAL-TIME PCR**

### **Abstract**

In this country, market research have revealed that there has been adulteration in food products in which some plant species have been replaced with plant ingredients that have a lower economic value. Fraudulent practices involving pistachios, chestnuts and almonds are prominent among these activities. For the protection of consumers and to prevent unfair competition in the market, the detection of fraudulent practices is required with precise and reliable methods. In this study, a new method based on the real-time PCR TaqMan probe technique was developed to determine the fraudulent use of pea instead of pistachio, apricot kernel instead of almond and common bean instead of chestnut in some food products. For this purpose, species-specific primer and probe sets were designed on the chloroplast tRNA-Leu (*trnL*) gene for pea and bean and also on the nuclear S14 F-box protein gene for apricot. In the real-time PCR reactions performed with the designed species specific primer and probe sets, apricot could be detected at the level of 0.1%, pea at the level of 0.01% and bean at the level of 0.001%, quantitatively, without any cross-reactivity with other plant species examined. Additionally, the developed method also provided successful detection in binary mixtures of the plants: pistachio-pea, chestnut-bean and apricot kernel-almond. As a result, it was concluded that the method provided a sensitive and reliable detection method for pea, bean and apricot kernel residues in foods, and it can successfully be used in the routine control of fraudulent practices involving these plant species in food products.

**Keywords:** Food, adulteration, plant species, real-time PCR

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ zkesmen@erciyes.edu.tr, © (+90) 352 207 6666/ 32729, ☎ (+90) 352 937 5784

## GİRİŞ

Piyasa araştırmaları, Ülkemizde ekonomik değeri yüksek bitki kaynaklı bazı gıda bileşenlerinin yerine, hile amacıyla daha ucuz ürünlerin kullanılabilirdiğini ortaya koymuştur. Bu şekilde yapılan üretimlerde, birim fiyatının yüksek olması ve katıldıkları ürünlerde maliyeti artırıcı başlıca unsur olmaları nedeniyle, Antep fıstığı, kestane ve bademe yönelik tağşışlı uygulamalar dikkat çekici düzeylerde (1, 2).

Antep fıstığı, başta geleneksel ürünlerimiz baklava olmak üzere, tatlı ve şekerleme sektöründe üretilen pek çok üründe yaygın kullanımı olan önemli bir maliyet unsurudur. Bu nedenle bu tür ürünlerde Antep fıstığı yerine bezelye kullanımı son yıllarda oldukça yaygın bir uygulama haline gelmiştir. Özellikle tüketimin yoğun olduğu dini bayramlar öncesinde bu tip hilelerin daha da arttığı öne sürülmektedir. Ayrıca pasta, şekerleme ve benzeri ürünlerde badem yerine kayısı çekirdeği ya da kestane içeren ürünlerde kestane yerine püre haline getirilmiş kuru fasulye kullanımı, ülkemizde bitki kaynaklı gıda katkısı veya bileşenlerinin tağşışına yönelik diğer güncel uygulamalar arasındadır (1-3).

Gıda sanayisinde karşılaşılan hileli üretimler, tüketicilerin aldatılması ve ekonomik kayıplara uğramasına, üreticilerin ise haksız rekabet sebebiyle zarar görmesine neden olmaktadır. Tüm bu sakıncalarının yanı sıra bu tip hileler, toplumsal etik açısından da rahatsızlık oluşturmakta ve gıda sektörüne duyulan güveni azaltmaktadır. Gıdalarda hile amaçlı uygulamalara yönelik yasal süreçlerin başlatılması ve itiraza yol açmayacak şekilde tamamlanabilmesi için, bu tür uygulamalara ilişkin kanıtların açık bir şekilde ortaya konulması gerekmektedir. Gıdaların kendine özgü karmaşık bileşimi ve üretiminde uygulanan teknolojik işlemler yapısında bulunan bileşenlerin, duyuşsal olarak veya basit analiz teknikleri ile tespitini zorlaştırmaktadır. Bu amaçla diagnostik alanındaki gelişmelerin yakından takip edilerek yeni analiz metotlarının geliştirilmesi ve hile tekniklerindeki gelişmelere paralel olarak da mevcut analiz metotlarının güncellenmesi gerekmektedir (4). Moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler başta polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tekniği olmak üzere nükleik asitlerin analizine dayalı bir çok yeni tekniğin gıda analizlerinde kullanımına imkân vermiştir (5). Son yıllarda, klasik PZR'ye kıyasla

hassasiyeti ve spesifitesi daha yüksek olan ve kantitatif analize de imkan veren gerçek zamanlı PZR tekniği, gıda kalite kontrolünde karşılaşılan pek çok soruna çözüm olabilecek potansiyel bir teknik olarak öne çıkmaktadır (6, 7). Gerçek zamanlı PZR tekniğine dayalı pek çok yöntem mevcut olmakla birlikte "TaqMan probe" yöntemi tür tayini amacıyla yapılan çalışmalarda daha fazla tercih edilmektedir. TaqMan probe yönteminde, çoğaltılmak istenilen hedef DNA dizisine tamamlayıcı, PZR sırasında serbest hale geçerek sinyal oluşturan, floresan boya ile işaretleymiş bir prob kullanılmaktadır (8).

Gerçek zamanlı PZR "TaqMan probe" yönteminin gıdaların yapısında bulunan bitki kaynaklı bileşenleri belirlemede başarıyla kullanılabilirdiği bildirilmiştir. Arlorio ve ark. (9) ticari gıda ürünlerinde bulunan fındık kalıntısını TaqMan prob tekniği ile 0.1 ng seviyesine kadar tespit edebilmişlerdir. TaqMan prob tekniğinin kullanıldığı başka bir çalışmada Demmel ve ark. (10), acı bakla bitkisinin pişmiş pizzalardaki deteksiyon limitini 1 mg/kg olarak belirlemişlerdir. Lopez (11) tarafından, *Betaine aldehyde dehydrogenase 2 (BAD2)* geni üzerinde dizayn edilen primerler ve TaqMan prob kullanılarak basmati pirinçlerine basmati olmayan pirinçlerin eklenip eklenmediğini % 1 seviyesine kadar tespit edilmiştir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar gerçek zamanlı PZR TaqMan prob yönteminin, gıdaların yapısında bulunan bitki kaynaklı bileşenlerin tespitinde kullanılabilirdiği yüksek hassasiyete sahip spesifik bir yöntem olduğunu göstermiştir. Bu nedenle bu çalışmada da ekonomik değeri yüksek bitki kaynaklı bazı gıda bileşenlerinin yerine (Antep fıstığı, kestane ve badem) hile amacıyla kullanılan, daha ucuz bitkisel ürünlerin (bezelye, fasulye ve kayısı çekirdeği) tespiti için gerçek zamanlı PZR TaqMan probe tekniğine dayalı yöntemlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada bezelye, fasulye, kayısı (kayısı çekirdeği) türlerinin tespiti için gerçek zamanlı PZR'ye dayalı yöntemler geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemler, bezelye-Antep fıstığı, fasulye-kestane, kayısı çekirdeği-badem ile hazırlanan ikili karışımlarda test edilerek hile amaçlı uygulamalarda kullanılabilirliği belirlenmiştir.

### Örneklerin analize hazırlanması

Çalışmada hedef alınan bitki türlerinden bezelye (*Pisum sativum* L.) ve fasulyenin (*Phaseolus vulgaris* L.) kuru taneleri, kayısının (*Prunus armeniaca* L.) ise çekirdek içi kullanılmıştır. İkili karışımların hazırlanmasında kullanılan, Antep fıstığı, badem ve kestane örnekleri taze meyve olarak temin edilmiştir. Bunların dışında ayrıca hedef bitki türleri ile akraba olan veya gıda maddelerinin üretiminde yaygın olarak kullanılan 25 adet farklı bitki türü de spesifite testleri için kullanılmıştır (Çizelge 1). Her bir bitki türü için Kayseri'deki farklı satış noktalarından en az 3 adet örnek toplanmıştır.

Çalışma kapsamında kullanılan tüm bitki türlerine ait örnekler etüvde kurutulularak suyu uzaklaştırılmıştır. Ayrıca Antep fıstığı, badem, kayısı çekirdeği, fındık, yer fıstığı, ceviz gibi yağ oranı yüksek bitki türleri blendırda öğütüldükten sonra 1:3 hacim hekzanla 30°C'de 30 dakika muamele edilmiş ve bu işlem 3 kez tekrarlanarak yağları uzaklaştırılmıştır. DNA izolasyonundan önce kurutulan ve yağı alınan örnekler sıvı azot ile doku parçalayıcıda (Retsch/MM 400/Germany) öğütülerek boyutları yaklaşık 10 µm'ye kadar küçültülmüştür.

Çizelge 1. Spesifite testinde kullanılan bitki türleri  
Table 1. Plant species used for specificity test

Örnek No Sample No	Örnek Adı Sample Name	Örnek Kodu Sample Code	Latince isim Scientific name	Örnek sayısı Number of Sample
1	Antep fıstığı <i>Pistachio</i> (Antep)	AF	<i>Pistacia vera</i>	6
2	At kestanesi <i>Horse chestnut</i>	AK	<i>Aesculus hippocastanum</i>	10
3	Badem <i>Almond</i>	BD	<i>Prunus dulcis</i>	10
4	Bakla <i>Broad bean</i>	BK	<i>Vicia faba</i>	3
5	Barbunya <i>Cranberry bean</i>	BR	<i>Phaseolus vulgaris</i>	6
6	Bezelye <i>Pea</i>	BZ	<i>Pisum sativum</i>	4
7	Buğday <i>Wheat</i>	BG	<i>Triticum aestivum</i>	3
8	Ceviz <i>Walnut</i>	CV	<i>Juglans regia</i>	3
9	Erik <i>Plum</i>	ER	<i>Prunus domestica</i>	3
10	Fasulye <i>Bean</i>	FS	<i>Phaseolus vulgaris</i>	10
11	Fındık <i>Hazelnut</i>	FN	<i>Corylus colurna</i>	3
12	Kakao <i>Cacao</i>	KK	<i>Theobroma cacao</i>	3
13	Kayısı <i>Apricot</i>	KY	<i>Prunus armeniaca</i>	3
14	Kestane <i>Chestnut</i>	KS	<i>Castanea sativa</i>	10
15	Kırmızı mercimek <i>Red lentil</i>	KM	<i>Lens culinaris</i>	3
16	Kiraz <i>Sweet cherry</i>	KR	<i>Prunus avium</i>	3
17	Menengiç <i>Terebinth</i>	MN	<i>Pistacia terebinthus</i>	3
18	Mısır <i>Maize</i>	MS	<i>Zea mays</i>	3
19	Nohut <i>Chickpea</i>	NH	<i>Cicer arietinum</i>	3
20	Siirt fıstığı <i>Pistachio</i> (Siirt)	SF	<i>Pistacia vera, pistachio</i>	4
21	Şeftali <i>Peach</i>	ŞF	<i>Prunus persica</i>	3
22	Vişne <i>Sour cherry</i>	VŞ	<i>Prunus cerasus</i>	3
23	Yer fıstığı <i>Peanut</i>	YF	<i>Arachis hypogaea</i>	3
24	Yeşil mercimek <i>Green lentil</i>	YM	<i>Lens culinaris</i>	3
25	Yonca <i>Clover</i>	YN	<i>Medicago sativa</i>	3

### İkili Karışımların Hazırlanması

Homojen karışımlar hazırlamak amacıyla çok aşamalı bir karıştırma işlemi uygulanmıştır. Bunun için başlangıçta 20:20 (g:g) oranında Antep fıstığı:bezelye, kestane:fasulye ve badem:kayısı çekirdeği karıştırılarak %50'lik ilk karışımlar hazırlanmış daha sonra Antep fıstığı, kestane veya badem (A grubu) her defasında karışım ağırlığının %40 veya %50'si oranında bir önceki karışıma, ilave edilmiştir. Böylece karışım içerisindeki bezelye, fasulye veya kayısı çekirdeğinin (B grubu) oranı %0.001'e kadar düşürülmüştür (Çizelge 2). İkili karışımların 10 farklı seviyesinden DNA izolasyonu yapılmış ve türe spesifik primer-prob setleri kullanılarak gerçek zamanlı PZR TaqMan prob yöntemi ile analiz edilmiştir.

### DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için Doyle (12) tarafından bildirilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Ön işlemlerden geçirilerek hazırlanan saf bitki türleri ve ikili karışımlardan yaklaşık 100 mg örnek alınıp, üzerine 600 µl %1 β-merkaptan etanol içeren liziz (%2 CTAB, 1.4M NaCl, 100mM Tris, 20mM EDTA) buffer eklendikten sonra 65°C'de

Çizelge 2. Bitki türleri ile hazırlanan ikili karışımlar  
Table 2. Binary mixtures prepared with plant species

Karışım No Mixture No	İkili karışımları hazırlamada kullanılan bitki örneğinin miktarı (g) Amount of plant sample used to prepare binary mixtures (g)			Karışım içerisindeki B grubu bitki örneğinin** oranı The proportion of group B plant sample** in mixture
	A grubu bitki örneğinin* miktarı The amount of plant sample in group A*	B grubu bitki örneğinin** miktarı The amount of plant sample in group B**	A grubu bitkilerin* ilave edildiği karışım no Mixture number in which group A* plants are added	
1	20	20		%50
2	20	-	1	%25
3***	30	-	2	%10
4***	20	-	3	%5
5	30	-	4	%2
6***	20	-	5	%1
7***	20	-	6	%0.5
8	30	-	7	%0.2
9***	20	-	8	%0.10
10***	20	-	9	%0.05
11	30	-	10	%0.02
12***	20	-	11	%0.010
13***	20	-	12	%0.005
14	30	-	13	%0.002
15***	20	-	14	%0.0010

\*A grubu bitkiler: Antep fıstığı, kestane ya da badem \* Group A plants: pistachio, chestnut or almond

\*\*B grubu bitkiler: Bezelye, fasulye ya da kayısı çekirdeği \*\* Group B plants: pea, bean or apricot

\*\*\* Analiz edilen ikili karışımlar \*\*\* Analyzed binary mixtures

(Bioer-Thermo Cell-HB-202, China) bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra üzerine 250 µl sodyum asetat eklenip -80 °C'de 10 dakika bekletilmiştir. Kısa bir süre oda sıcaklığında bekletilip çözündürüldükten sonra 16000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir tüpe alınarak önce fenol; kloroform; izoamilalkol (25:2:1) daha sonra aynı miktarda kloroform; izoamilalkol (24:1) ile yıkama işlemi yapılmıştır. Her yıkamadan sonra tüpler 20000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz yeni tüpe alınmıştır. Soğuk izopropanol eklenip 20000 g'de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürülen DNA'lar üst faz uzaklaştırıldıktan sonra kurumaya bırakılmıştır. DNA'lar 100 µl TE (10mM Tris, 1mM EDTA) buffer içerisinde çözündürülmüş ve 4 µl RNAaz eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. DNA konsantrasyonu nanodrop (ACTGene, UVS-99) ile ölçülüp TE buffer ile 100 ng/µl'ye ayarlanmıştır.

#### Türe spesifik primer ve prob setlerinin dizaynı

Çalışmada bezelye, kayısı ve fasulye türlerine spesifik primer ve prob setlerinin dizaynı için kloroplast genomun tRNA-Leu (*trnL*) geni üzerinde türe spesifik dizileri hedef alınmıştır.

Kayısı türüne spesifik primer-prob seti ise, kromozomal S14 F-box protein geni hedef alınarak dizayn edilmiştir (Çizelge 3). Ayrıca yanlış negatif sonuçların önlenmesi için de universal bir bitki primer-prob seti kullanılmıştır (13).

Dizayn edilen primer ve prob setlerinin spesifite testlerinde Çizelge 1'de verilen bitki türlerinin 100 ng/µl konsantrasyondaki DNA'ları kullanılarak bu DNA'lar ile reaksiyon verip vermediği tespit edilmiştir.

Hassasiyet testi için, bezelye, fasulye ve kayısının 100 ng/µl'lik DNA konsantrasyonu %100 seviyesi kabul edilmiş ve %0.001 seviyesine (0.0001 ng DNA/µl) kadar 7 farklı konsantrasyonda dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bu seri dilüsyonlar kullanılarak herbir primer ve prob seti için deteksiyon limiti belirlenmiştir. Ayrıca her bir dilüsyona ait DNA konsantrasyonlarının logaritmik değerine karşı tespit edilen Ct değerleri kullanılarak standart kurve oluşturulmuştur.

#### Gerçek Zamanlı PZR analizi

Gerçek zamanlı PZR işlemi ticari master mix (DNA probe master, Roche, ABD), 50-100 ng template DNA (2 µl), 0.4 µM forward ve reverse primerlerden

Çizelge 3. Bitki türlerine spesifik olarak dizayn edilen primer-prob setleri  
Table 3. Primer-probe sets designed specifically for plant species

Türler Species	Oligonükleotid Oligonucleotide	Oligonükleotid dizisi (5'→3') Sequence of oligonucleotide (5'→3')	Amplikon uzunluğu (bç) Length of amplicon (bp)	Hedef gen ve (Genbank erişim no) Target gene and (Accession no)	Kaynak Reference
Bezelye Pea	BF (ileri) BF (Forward)	CAATTGATTAATGAAGATTTCTAACTTCT	117	trnL (JN617165.1)	Bu çalışma This study
	BR (geri) BR (Reverse)	TTTGAGCAATGAATATTCAGTCA			
	BP (prob) BP (probe)	TGGAACATTAGAATCAATTACAACCTGGA			
Fasulye Bean	FF (ileri) FF (Forward)	TGAAGAAAAGATGGAATATTTCTTGAT	93	trnL (JN617174.1)	Bu çalışma This study
	FR (geri) FR (Reverse)	TTTATTCTCATCTGATTGATCAGTTCT			
	FP (prob) FP (probe)	TCACCTTATCATAATCGGATAAAACCCCTTGA			
Kayısı Apricot	KF (ileri) KF (Forward)	CAACAGGGATTAGTATGGATAACA	120	S14 F-box protein (DQ897929.1)	Bu çalışma This study
	KR (geri) KR (Reverse)	GGATTTCGTAATCACATAAATCCAG			
	KP (prob) KP (probe)	ATGCTAAGAGTAGATGACATTAGAGGCATAAGA			
Bitki (genel) Plant (common)	Plant nes-2-f (ileri) Plant nes-2-f (Forward)	ATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTA	90	trnL	(13)
	Plant nes-2-r (geri) Plant nes-2-r (Reverse)	GGATTTGGCTCAGGATTGCC			
	Plant nes-2-prob Plant nes-2- (probe)	TTAATTCCAGGGTTTCTCTGAATTTGAAAGTT			

bç: baz çifti bp: base pair

her biri ve 0.1 µM TaqMan probe kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm reaksiyonlarda 5' ucundan FAM ve 3' ucunda ise TAMRA bulunan çift işaretlenmiş proplar kullanılmıştır. Gerçek zamanlı PZR için termal döngü parametreleri; 94 °C'de ilk denatürasyonun ardından, 35 döngü süresince 94 °C'de denatürasyon ve 55 °C'de yapışma/uzama olarak uygulanmıştır. PZR ürünleri % 1.5'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Türe spesifik primer ve prob setlerinin spesifite ve hassasiyet testi sonuçları

Spesifite testleri için 25 bitki türüne ait toplam 111 örneğin 100 ng/µl konsantrasyondaki DNA'ları kullanılmıştır. Çalışma kapsamında dizayn edilen fasulye ve kayısı türlerine spesifik primer-prob setlerinin diğer bitki türleri ile reaksiyon vermediği yalnızca spesifik oldukları türler ile reaksiyona girdiği tespit edilmiştir

(Çizelge 4). Bezelye türüne spesifik primer-prob setinin ise, yeşil mercimek ile oldukça zayıf bir çapraz reaksiyon verdiği belirlenmiştir. Öyle ki bu primer-prob setinin, %100 mercimek DNA'sı (100 ng DNA/µl) ile verdiği Ct değeri, %0.01 bezelye DNA'sı (0.01 ng DNA/µl) için belirlenen Ct değerinden bile daha düşük bulunmuştur. Çalışmada kullanılan universal bitki primer-prob seti ile tüm bitki örneklerine ait DNA'ların (15.54-22.41) arasında değişen Ct değerleri verdiği belirlenmiş ve böylece yanlış negatif sonuçların kontrolü yapılmıştır.

Bu çalışmada, baklagiller (*Fabaceae*) familyasından bezelye ve fasulye türlerine spesifik primer-prob setlerinin dizaynı için kloroplast genomda bulunan *trnL* geni üzerinde sırasıyla 117 ve 93 baz çifti uzunluğundaki bölgeler hedef alınmıştır. Kloroplast genomda bulunan *trnL* geni, bitki türleri arasındaki heterojenliğinin ve kopya sayısının yüksek olmasından dolayı filogenetik çalışmalar için avantaj sağlamaktadır (14).

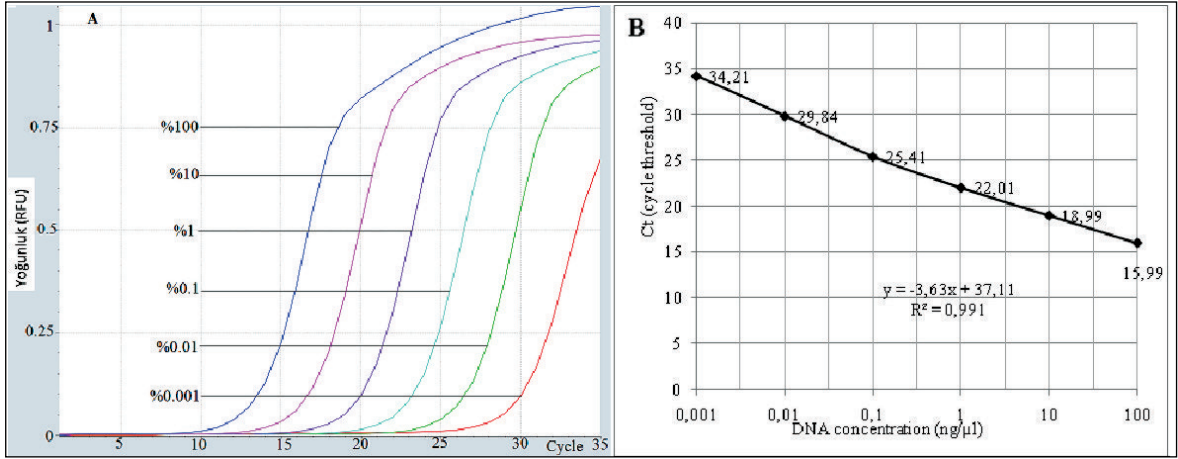
Çizelge 4. Dizayn edilen primer ve prob setlerinin spesifite ve hassasiyet testi sonuçları.  
Table 4. The specificity and sensitivity test results of designed primer and probe sets.

Türler <i>Species</i>	DNA Konsantrasyonu (%) <i>DNA Concentration (%)</i>	Bezelye <i>Pea</i>	Fasulye <i>Bean</i>	Kayısı çekirdeği <i>Apricot kernel</i>
Hedef Türler <i>Target Species</i>	0.0001	>35	>35	>35
	0.001	34.21	32.11	>35
	0.01	29.84	28.41	>35
	0.1	25.41	25.72	30.71
	1	22.01	22.12	27.37
	10	18.2	18.75	23.12
	100	15.99	16.38	19.45
Antep fıstığı <i>Pistachio (Antep)</i>	100	>35	>35	>35
At kestanesi <i>Horse chestnut</i>	100	>35	>35	>35
Badem <i>Almond</i>	100	>35	>35	>35
Bakla <i>Broad bean</i>	100	>35	>35	>35
Barbunya <i>Cranberry bean</i>	100	>35	>35	>35
Bezelye <i>Pea</i>	100	15.99	>35	>35
Buğday <i>Wheat</i>	100	>35	>35	>35
Ceviz <i>Walnut</i>	100	>35	>35	>35
Erik <i>Plum</i>	100	>35	>35	>35
Fasulye <i>Bean</i>	100	>35	16.38	>35
Fındık <i>Hazelnut</i>	100	>35	>35	>35
Kakao <i>Cacao</i>	100	>35	>35	>35
Kayısı çekirdeği <i>Apricot kernel</i>	100	>35	>35	19.45
Kestane <i>Chestnut</i>	100	>35	>35	>35
Kırmızı mercimek <i>Red lentil</i>	100	>35	>35	>35
Kiraz <i>Sweet cherry</i>	100	>35	>35	>35
Menengiç <i>Terebinth</i>	100	>35	>35	>35
Mısır <i>Maize</i>	100	>35	>35	>35
Nohut <i>Chickpea</i>	100	>35	>35	>35
Siirt fıstığı <i>Pistachio (Siirt)</i>	100	>35	>35	>35
Şeftali <i>Peach</i>	100	>35	>35	>35
Vişne <i>Sour cherry</i>	100	>35	>35	>35
Yer fıstığı <i>Peanut</i>	100	>35	>35	>35
Yeşil mercimek <i>Green lentil</i>	100	31.53	>35	>35
Yonca <i>Clover</i>	100	>35	>35	>35

>35: ct değeri tespit edilmedi. >35: ct value was not detected.

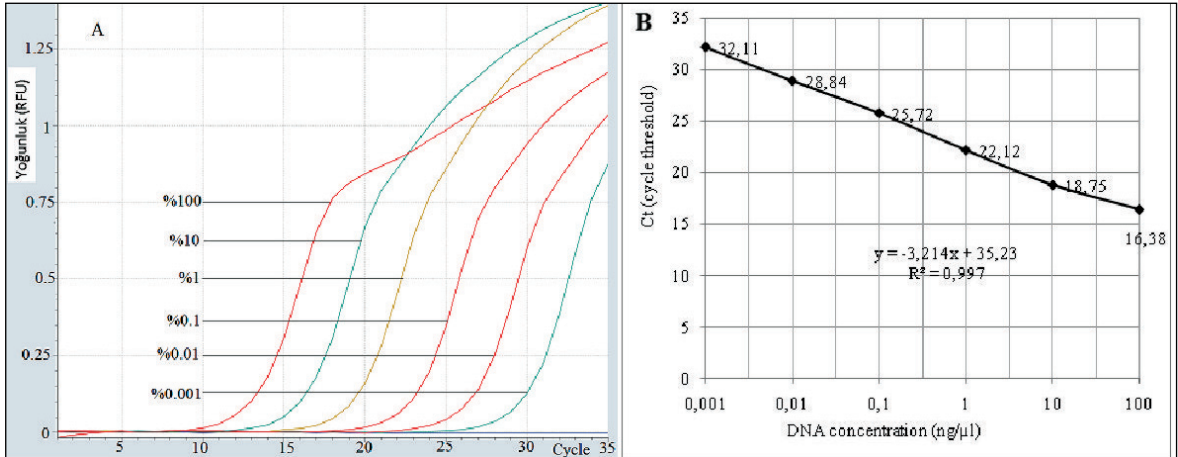
Kayısı türüne spesifik primer ve prob dizaynı için kromozomal S14 F-box protein geni kullanılmıştır. Kromozomal genomda bulunan genlerin kopya sayısı kloroplast genlerden çok daha düşük olduğu için kayısı için deteksiyon limiti diğer iki türden çok daha düşük bulunmuştur. Bununla birlikte *Prunus* cinsi içerisinde yakın ilişkili iki tür olan kayısı (*Prunus armeniaca*) ve badem (*P. dulcis*) birbirinden başarılı bir şekilde ayırt edilmiştir. Ayrıca kayısı türü için tasarlanan primer-prob setinin aynı cinsde ait kiraz (*P. avium*), şeftali (*P. persica*), vişne (*P. cerasus*) ve erik (*P. domestica*) gibi diğer sert çekirdekli meyvelerle reaksiyon vermediği tespit edilmiştir.

Diğer taraftan hassasiyet testi için bezelye, fasulye ve kayısı türlerine ait DNA'ların %0.001'den %100'e kadar değişen konsantrasyonlarındaki dilüsyonları kullanılmış ve gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR reaksiyonları sonucunda bezelye ve fasulye için deteksiyon limiti %0.001, kayısı için ise %0.1 olarak belirlenmiştir (Şekil 1-3). Her bir primerin spesifite ve hassasiyet testi için gerçekleştirilen reaksiyonlarda elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri, gerçek zamanlı PZR sonuçlarını doğrulamıştır (Şekil 4-6).



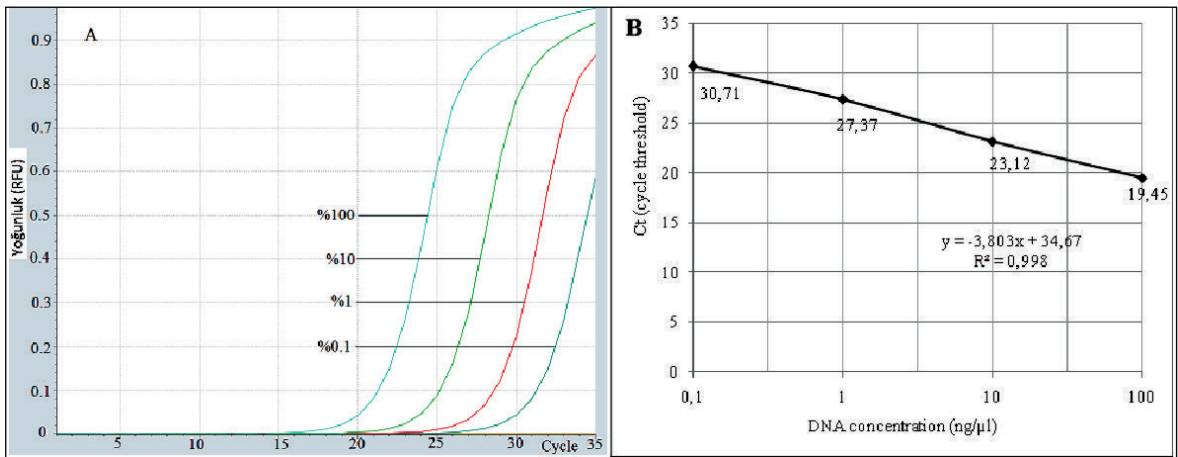
Şekil 1. Bezelye DNA'sının farklı konsantrasyonlarına karşılık belirlenen Ct değerleri (A) ve Ct değerleri kullanılarak çizilen standart eğri (B)

Figure 1. Ct values determined using different concentrations of pea DNA (A) and the standard curve plotted for Ct values (B)



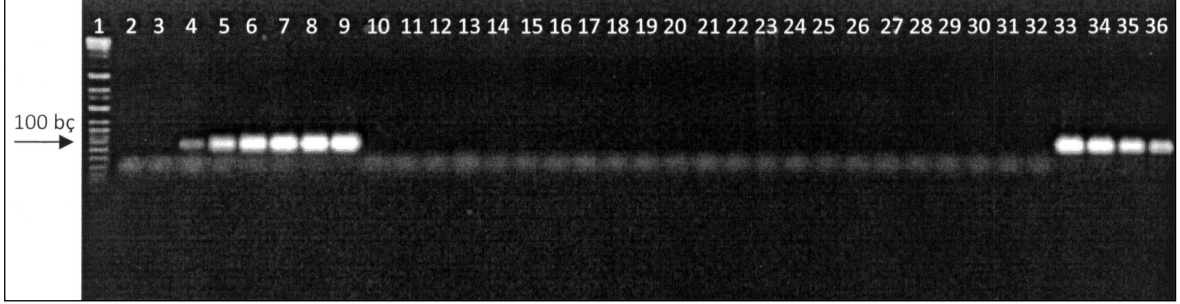
Şekil 2. Fasulye DNA'sının farklı konsantrasyonlarına karşılık belirlenen Ct değerleri (A) ve Ct değerleri kullanılarak çizilen standart eğri (B)

Figure 2. Ct values determined using different concentrations of bean DNA (A) and the standard curve plotted for Ct values (B)



Şekil 3. Kayısı DNA'sının farklı konsantrasyonlarına karşılık belirlenen Ct değerleri (A) ve Ct değerleri kullanılarak çizilen standart eğri (B)

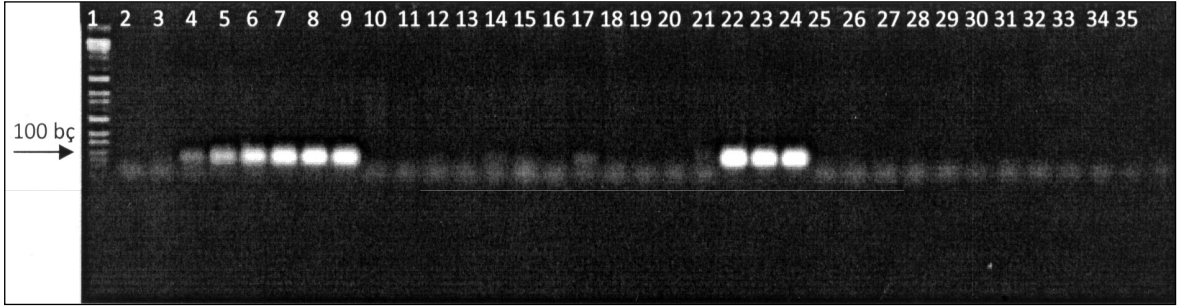
Figure 3. Ct values determined using different concentrations of apricot DNA (A) and the standard curve plotted for Ct values (B)



Şekil 4. Bezelye türüne spesifik primerlerin hassasiyet ve spesifite testine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Figure 4. Agarose gel electrophoresis image of sensitivity and specificity test for pea specific primers.

1:Marker, 2: Negatif Kontrol, 3: % 0,0001'lik BZ, 4: % 0,001'lik BZ, 5: % 0,01'lik BZ, 6: % 0,1'lik BZ, 7: % 1'lik BZ, 8: % 10'luk BZ, 9: % 100'lük BZ, 10: AF, 11: BD, 12: BK, 13: BR, 14: BG, 15: CV, 16: ER, 17: FS, 18: FN, 19: KK, 20: KY, 21: KS, 22: KM, 23: KR, 24: MN, 25: MS, 26: NH, 27: SF, 28: ŞF, 29: VŞ, 30: YF, 31: YM, 32: YN, 33: BZ1, 34: BZ2, 35: BZ3, 36: BZ4



Şekil 5. Fasulye türüne spesifik primerlerin hassasiyet ve spesifite testine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Figure 5. Agarose gel electrophoresis image of sensitivity and specificity test for bean specific primers.

1:Marker, 2:Negatif Kontrol, 3:% 0,0001'lik FS, 4:% 0,001'lik FS, 5:% 0,01'lik FS, 6:% 0,1'lik FS, 7:% 1'lik FS, 8:% 10'luk FS, 9:% 100'lük FS, 10: AF, 11: BD, 12: BK, 13: BR, 14: BG, 15: CV, 16: ER, 17: FS, 18: FN, 19: KK, 20: KY, 21: KS, 22: FS1, 23: FS2, 24: FS3, 25: KM, 26: KR, 27: MN, 28: MS, 29: NH, 30: SF, 31: ŞF, 32: VŞ, 33: YF, 34: YM, 35: YN



Şekil 6. Kayısı türüne spesifik primerlerin hassasiyet ve spesifite testine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Figure 6. Agarose gel electrophoresis image of sensitivity and specificity test for apricot specific primers.

1:Marker, 2: Negatif Kontrol, 3: % 0,01'lik KY, 4: % 0,1'lik KY, 5: % 1'lik KY, 6: % 10'luk KY, 7: % 100'lük KY, 8: KY1, 9: KY2, 10: AF, 11: BD, 12: BK, 13: BR, 14: BG, 15: CV, 16: ER, 17: FS, 18: FN, 19: KK, 20: KY, 21: KS, 22: KM, 23: KR, 24: MN, 25: MS, 26: NH, 27: SF, 28: ŞF, 29: VŞ, 30: YF, 31: YM, 32: YN

Her bir DNA konsantrasyonuna karşı elde edilen Ct değerleri kullanılarak çizilen standart eğrinin eğimi bezelye, fasulye ve kayısı türleri için sırası ile -3.70, -3.18 ve -3.80 olarak bulunmuştur. Ayrıca tüm primer-prob setleri için, R<sup>2</sup> değerinin  $\geq 0.99$  olduğu tespit edilmiştir.

### İkili Karışımlarda Tür Tayini

Hazırlanan ikili karışımlar, hedef bitki türlerine spesifik primer ve prob seti kullanılarak analiz edilmiştir. Buna göre, Antep fıstığı-bezelye karışımında bezelye, kestane-fasulye karışımında ise fasulye, %0.001 seviyesine kadar tespit edilebilirken, badem-kayısı karışımında kayısının tespit edilebildiği en düşük seviye %0.1 olmuştur (Çizelge 5).



Çizelge 5. İkili karışımların analiz sonuçları  
Table 5. Analysis results of binary mixtures

İkili karışım seviyesi (A grubu bitki türü* içindeki B grubu bitki türünün** oranı) Level of binary mixture (Ratio of B group plant species** in A group plant species*)	Türe spesifik primer ve prob setleri kullanılarak elde edilen Ct değerleri Ct values obtained with species-specific primer and probe sets		
	Bezelye Pea	Fasulye Bean	Kayısı Apricot
%100	17.127	14.345	20.045
%10	19.527	16.925	21.925
%5	22.667	18.027	23.027
%1	23.222	21.614	25.614
%0.5	23.823	22.18	27.189
%0.1	27.804	24.16	28.161
%0.05	29.454	25.183	29.183
%0.01	31.008	27.575	31.575
%0.005	31.057	28.573	>35
%0.001	31.335	30.046	>35
Negatif Kontrol Negative Control	>35	>35	>35

\* A grubu bitkiler: Antep fıstığı, kestane ya da badem \* Group A plants: pistachio, chestnut or almond

\*\*B grubu bitkiler: Bezelye, fasulye ya da kayısı çekirdeği \*\* Group B plants: pea, bean or apricot

Antep fıstığı-bezelye ikili karışımının analizinde kullanılan bezelye türüne spesifik ileri ve geri primerler, Antep fıstığı ile sırasıyla %52.8 ile %50 prob ise %44.7 oranında benzerlik göstermektedir. Benzer şekilde, fasulye türüne spesifik ileri ve geri primeler ile prob kestane ile sırasıyla %44.7, %51.2 ve %61.3 oranında benzerdir. Kayısı primer-prob setinin badem türü ile arasındaki benzerlik oranları ise sırasıyla %79.2, %91.7 ve %81.8'dir. Dolayısıyla hedef diziler arasında yüksek heterojenlik analiz edilen primer-prob setlerinin karışımdaki diğer türlerle reaksiyon vermeksizin yüksek bir hassasiyetle hedef bitki türlerinin tayinine imkân vermiştir. Hile amaçlı karışımlarda (adultration) %1'in altı ekonomik bulunmamakta genellikle bu seviyenin üstünde bir karıştırma yapılmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada ikili karışımlar için tespit edilen deteksiyon limitleri bu tür hileleri tespit edebilecek hassasiyettedir.

Literatürde benzer çalışmalar bulunmakla birlikte bu çalışma kapsamında geliştirilen yöntemler, gerek spesifite ve gerekse hassasiyet bakımından daha başarılı bulunmuştur. Örneğin; Brezná ve ark. (15), gıdalardaki bezelye kalıntılarını tespit etmek amacıyla *trnL* ve *trnF* eksonları arasındaki intron bölgeyi hedef alan bir primer-prob seti tasarlamışlardır. Geliştirdikleri gerçek zamanlı PZR çalışması ile bezelye ilave edilmiş çeşitli tahıl unlarında deteksiyon limitini  $0.11 \pm 0.07$  ng bezelye DNA'sı olarak tespit etmişlerdir. Ancak tasarlanan primer ve prob setlerinin diğer baklagillerle reaksiyon vermemesi için döngü sayısını 29'da tutmuşlardır. Krahulcová ve ark. (16), kestane

püresine hile amacıyla katılan fasulye türünü tespit etmek amacıyla, nükleer genom üzerinde bulunan PvLEA-18 genini kullanmışlardır. Dizayn ettikleri primerlerin diğer bitki türleriyle reaksiyon vermediğini ancak model karışımlarda fasulyenin deteksiyon limitinin %1 (w/w) olduğunu bildirmişlerdir. Brüning ve ark. (17) ise, badem ezmesine (marzipan) karıştırılan kayısı çekirdeği ezmesinin (persipan) kayısı türüne spesifik PZR ile %0.2 seviyesine kadar tespit edilebildiğini göstermişlerdir.

## SONUÇ

Gıda sanayisinde kaliteli ve güvenilir ürünlerin üretilmesi, tüketici haklarının korunması ve haksız rekabetin önlenmesi için gıda kontrol ve denetim hizmetlerinin etkin, yaygın ve sürekli olması büyük önem taşımaktadır. Dolayısıyla gerek kalite kontrol hizmetlerinin etkinliği ve gerekse pek çok ülkede gıda etiketleme ile ilgili yapılan yasal düzenlemeler, gıdaların bileşiminde bulunan hayvan ve bitki kaynaklı bileşenlerin tayini için hassas ve güvenilir metotlara duyulan ihtiyacı artırmıştır. İşte bu noktada gerçek zamanlı PZR tekniği, tür tayini ile ilgili bu yöndeki ihtiyaçları karşılayabilecek potansiyel bir teknik olarak öne çıkmaktadır.

Bu çalışmada, Antep fıstığı, kestane ve badem gibi bitki kaynaklı bazı gıda bileşenlerinin yerine hile amacıyla kullanılan bezelye, fasulye ve kayısı çekirdeği gibi daha ucuz bitki türlerinin tespitine yönelik yöntemler geliştirilmiştir. Bu amaçla *trnL*

geni üzerinde dizayn edilen primer-prob setleri, bezelye ve fasulye türlerinin spesifik olarak ve yüksek bir hassasiyetle tespitini sağlamıştır. S14 F-box geni üzerinde dizayn edilen kayısı türüne spesifik primer-prob setinin ise, *Prunus* cinsi içerisindeki yakın ilişkili türlerin ayırımına imkan sağladığı ancak diğer türlere kıyasla hassasiyetinin daha düşük olduğu bulunmuştur. Geliştirilen tüm yöntemlerin, kalite kontrol laboratuvarlarının yöntem konusundaki eksikliğini gidermesinin yanında, rutin kullanımlara uygun ticari test kitlerine dönüştürülme potansiyeli de mevcuttur. Sonuçta hileli karışımlar içerisindeki bezelye, fasulye ve kayısı çekirdeği kalıntılarının hassas ve güvenilir bir şekilde tespiti, bu yolla yapılan hilelerin önlenmesi ve dolayısıyla ve tüketicilerin korunması ve haksız rekabetin önlenmesine katkı sağlayacaktır.

### TEŞEKKÜR

Bu çalışma Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından TAGEM 11/AR-GE/08 No'lu proje ile desteklenmiştir.

### KAYNAKLAR

1. Şenöz, B. (2013). Gıdalarda yapılan taklit/tağşişler ve gıdaların coğrafi kökeninin tespitinde analiz yöntemlerinin yeri. 8. Gıda Mühendisliği Kongresi Sunumları. <http://www.gidamuhendisligikongresi.org/images/onuc/dda6cea62dfe385.pdf> (Erişim tarihi 18 Kasım 2016).
2. Kardelen Kestane Şekeri (2015). Ucuz kestane şekerinin içeriği ortaya çıkacak. <http://www.kardelen.com/detay?q=47> (Erişim tarihi 27 Kasım 2016).
3. Ankara Ticaret Odası (2005). Sahte Türkiye raporu. <http://www.atonet.org.tr/yeni/index.php?p=269&l=1> (Erişim tarihi 14 Kasım 2016).
3. Kalkınma Bakanlığı (2014). Gıda ürünleri ve güvenilirliği. T.C. Kalkınma Bakanlığı, Onuncu Kalkınma Planı (2014-2018), Özel İhtisas Komisyonu Raporu, s. 41. Ankara
5. Özatay Ş. (2012). Moleküler metotların gıda kontrollerindeki uygulama alanları. *Türk Bil. Der. Derg.*, 5: 75-81, ISSN: 1308-0040.
6. Güllüce, A., Kesmen, Z. (2013). Real-time PCR tekniği ve gıda analizlerinde kullanımı. *Gıda Teknolojisi*, 17: 84-88.

7. Ma, H., Shieh, K.J., Chen, G., Qiao, X., Chuang, M.Y. (2006). Application of real time polymerase chain reaction (RT-PCR). *J Am Sci*, 2: 1-15, ISSN 1545-1003
8. Wolf, C., Lüthy, J. (2001). Quantitative competitive (QC) PCR for quantification of porcine DNA. *Meat Sci*, 57: 161-168. doi: 10.1016/S0309-1740(00)00088-7.
9. Arlorio, M., Cereti, E., Co sson, J.D., Travaglia, F., Martelli, A. (2007). Detection of hazelnut (*Corylus* spp.) in processed foods using real-time PCR. *Food Control*, 18: 140-148. doi:10.1016/j.foodcont.2005.09.005.
10. Demmel, A., Hupfer, C., Busch, U., Engel, K.H. (2011). Detection of lupine (*Lupinus* spp.), DNA in processed foods using real-time PCR. *Food Control*, 22: 215-220. doi:10.1016/j.foodcont.2010.07.001.
11. Lopez, S.J. (2008). TaqMan based real-time PCR method for quantitative detection of basmati rice adulteration with non-basmati rice. *Eur Food Res Technol*, 227: 619-622. doi: 10.1007/s00217-007-0763-0.
12. Doyle, J.J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem bull*, 19: 11-15.
13. Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol*, 5: 1105-1109. doi: 10.1007/BF00037152.
14. Tsaia, L.C., Yub, Y.C., Hsiehc, H.M., Wang, J.C., Linacred, A., Lee, J.C. (2006). Species identification using sequences of the *trnL* intron and the *trnL-trnF* IGS of chloroplast genome among popular plants in Taiwan. *Forensic Sci Int*, 164:193-200. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.01.007.
15. Brezná, B., Hudecova, L., Kuchta, T. (2006). Detection of pea in food by real-time polymerase chain reaction (PCR). *Eur Food Res Technol*, 222: 600-603. doi: 10.1007/s00217-005-0168-x.
16. Krahulcová, J., Pangallo, D., Píknová, L., Siekel, P., Kuchta, T. (2003). Polymerase chain reaction for the detection of *Phaseolus vulgaris* beans in chestnut purée. *Eur Food Res Technol*, 217: 80-82. doi: 10.1007/s00217-003-0703-6.
17. Brüning, P., Haase, I., Matissek, R., Fischer, M. (2011). Marzipan: polymerase chain reaction-driven methods for authenticity control. *J Agric Food Chem*, 59: 11910-11917. doi: 10.1021/jf202484a.