

ET KALİTESİNİ BELİRLEMEDE YENİ TEKNİKLER

Ceyda Söbeli*, Semra Kayaardı

Celal Bayar Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Manisa

Geliş tarihi / *Received*: 23.12.2013

Düzeltilerek Geliş tarihi / *Received in revised form*: 20.02.2014

Kabul tarihi / *Accepted*: 05.04.2014

Özet

Ülkemizde kalite kavramı et sanayisi açısından gittikçe önem kazanmaya başlayan bir faktör durumundadır. Et ve et ürünlerinde kalitenin belirlenmesi amacıyla yıllardır birçok teknik kullanılmaktadır. Et kalitesinin belirlenmesinde her ne kadar geleneksel yöntemler önemli bir rol oynasa da son zamanlarda geleneksel kalite belirleme tekniklerine alternatif olarak ultrason gibi mekanik sistemler, nükleer manyetik rezonans (NMR), yakın kızılötesi spektroskopisi (NIR) gibi spektroskopik teknikler ve daha pek çok yeni moleküler biyolojik ve immünolojik teknikler de kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemler etin bileşen özelliklerini doğrudan ölçebilmekle birlikte bir ya da birden çok ölçüm ve et bileşenleri arasındaki çeşitli korelasyonlar kullanılarak dolaylı olarak da ölçüm sağlanabilmektedir. Bu derlemede et kalitesini belirlemede kullanılan yeni teknikler ve kullanım alanları irdelenmeye çalışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Et, kalite, yeni teknikler

NEW TECHNIQUES FOR PREDICTING MEAT QUALITY

Abstract

Quality concept is becoming an important factor for meat industry in our country. Several techniques have been used to determine the quality of meat and meat products for many years. Although traditional methods play an important role for determination of meat quality, mechanical methods such as ultrasound, spectroscopic methods such as nuclear magnetic resonance (NMR) and near-infrared spectroscopy (NIR), and several new molecular biological and immunological techniques have been applied alternatively. These methods can either measure meat component properties directly, or calculate them indirectly by using obvious correlations between one or several measurements and meat component properties. In this article, these new techniques and their applications were reviewed.

Keywords: Meat, quality, new techniques

*Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ ceyda.zengin@cbu.edu.tr,

☎ (+90) 236 201 2270,

☎ (+90) 236 241 2143

GİRİŞ

Kalite, bir ürün veya hizmetin beklenen veya olabilecek ihtiyaçları karşılama eşdeğerliliğine dayanan özelliklerin toplamıdır. Bir üründe ne kadar çok özellik ölçülebilirse, o ürünün kalitesi hakkında o kadar çok bilgi edinilmiş olur (1). Tüketilecek etlerin kalitesi ise, duyuşsal özellikler yanı sıra, fiziksel, kimyasal ve hijyenik özellikleri de kapsamaktadır (2). Et kalitesi lezzetliliğinden teknolojik yönüne güvenliğine kadar çeşitli yollarla tanımlanabilir. Et kalitesinin tanımı genel olarak "ette tüketici tarafından değerlendirilen ve aranılan özelliklerin ölçümüdür" şeklinde yapılabilir. Hoffman (1990) et kalitesini, "etin duyuşsal, besleyici, hijyenik ve teknolojik özellikleri gibi tüm faktörlerin toplamı" olarak tanımlamıştır (3). Geleneksel olarak, "et kalitesi" terimi etin yeme, ileri işleme ve perakende satışını da içerecek şekilde depolamaya uygunluğu için gerekli olan yapısal özelliklerini kapsamaktadır. İlgili ana nitelikler güvenilirlik, besleyici değer, lezzet, tekstür, su tutma kapasitesi, renk, yağ içeriği, yağ kompozisyonu, oksidatif stabilite ve tekdüzeliktir (4). Son yıllarda, özellikle tıp alanında geliştirilmiş çeşitli yeni teknikler et kalitesini belirlemek amacıyla da kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknolojilerden bazıları aşağıda ayrıntılı şekilde açıklanmaktadır.

ULTRASON

İnsan kulağının işitebileceğinin üstündeki ses dalgalarına ultrason denmektedir. İnsanın işitme sınırı 15-20 Khz olup, ultrasonun frekansı 50 Khz'in üzerindedir. Ultrason cihazları yüksek frekanslı ses dalgalarının vücut dokularından geçirilmesi ilkesine göre çalışır. Ses dalgaları iki vücut dokusu arasına geldiğinde dalgaların bir kısmı yansır. Bir titreşim jeneratörü, aktarıcıda (transmitter) ses sinyallerine dönüştürülen elektrik dalgaları gönderir. Sonra bu elektrik dalgaları ortak doku yüzeyinden yansıyana kadar doku içinden geçerler. Yansıyan sinyaller alıcıda toplanır ve sesler yükseltilerek, bir sinyal dönüştürücü (oscilloscope) yardımıyla görsel bir forma getirilir (5-7). Vücudun önemli dokuları ve organları farklı akustik yoğunluklara sahiptirler. Bu nedenle deri, yağ, kas ve organlar arasında farklı yansımalar meydana gelmektedir. Temel olarak A-modu ve B-modu tarayıcı olmak üzere iki tip ultrason söz konusudur. A-modu tarayıcı ile lineer (doğrusal) yağ kalınlığı ölçümleri; B-modu tarayıcı ile iki boyutlu ölçümler yani göz kası ölçümleri ve yağ alanı ölçümleri yapılabilir (8). Et endüstrisinde ultrason tekniği, mezbahalar için genetiği geliştirme programlarında kullanılan hızlı, tekrarlanabilir ve güvenilir bir teknolojidir (7). İnsanların gebeliğinde olduğu gibi, canlı hayvanlarda da

çeşitli frekanslardaki ses dalgaları kas, yağ ve iç organlar gibi dokuların titreme-yansıma görüntülerini üretmekte ve sürünün genetik gelişimi için çiftlik hayvanının seçimi ve yerleşimi, yağ ve kas büyümesi ve vücut kompozisyonu, kas içi yağ oranı ve karkas özelliklerinin belirlenmesi için bir yönetim aracı olarak kullanılmaktadır (7). İngiltere'de MLC (Meat and Livestock Commission)'nin işbirliğiyle çiftliklerde bu tip ölçüm cihazlarının kullanılması oldukça yaygınlaşmıştır ve yetiştiricilerin pek çoğu bu teknikleri kullanarak yağsız et üretimine yönelik seleksiyon programlarında değerlendirmeler yapabilmektedirler (8). Ultrasonla yapılan analizlerden elde edilen yağ ölçümleri ile doğrudan karkasın analizi ile elde edilen yağ ölçümlerinin uyum içinde olduğu görülmüştür (9). Dana eti örneklerinden alınan ölçümler, bu teknolojinin dana etinin yapısal karakteristiklerini görüntüleme ne kadar yararlı olduğunu göstermektedir. Rigor başlangıcı ve olgunlaştırma sırasında etin yapısında meydana gelen değişimler, pH ölçümleri ve miyofibrillerin mekanik direnci ile takip edilmektedir. Bu parametreler ve sonoelastografi analizlerinden gelen değişkenler arasında karşılaştırmalar yapılmaktadır. Sonuçlar sonoelastografinin ette rigor mortis başlangıcı ve olgunlaştırmayı izlemek için kullanılabileceğini belirtmektedir. Dışsal gerilimin neden olduğu kas içi bağlayıcı ve adipoz dokunun elastik deformasyonu ultrasonik olarak ortaya çıkarılmakta ve dana eti kalitesini önceden haber veren bir yöntem olarak düşünülmektedir (3).

NÜKLEER MANYETİK REZONANS (NMR)

Nükleer manyetik rezonans (NMR) görüntüleme, elektromanyetik spektrumun radyo frekansı aralığındaki enerjinin emisyonu ve absorpsiyonu temeline dayanmaktadır. Tek sayıda proton ve nötron içeren tüm çekirdekçikler NMR ile gözlenebilmektedir. Sıklıkla ölçülen çekirdekçikler ¹H ve ¹³C'dir. Temel olarak iki çeşit NMR uygulanmaktadır: i) zaman alanlı NMR ve ii) spektroskopik NMR (sinyale karşı frekans). Zaman alanlı NMR, relaksasyon zamanlarını vermektedir: eksenel (longitudinal) relaksasyon zamanı T₁ ve çapraz (transversal) relaksasyon zamanı T₂. Spektroskopik NMR, test edilen örneğin belli moleküllerine karşılık gelen pikleri vermektedir. Ayrıca, NMR yakalamaları, deneysel aletin statik manyetik alanına bağlı olarak düşük alanlı (LF) ya da yüksek alanlı (HF) yapılabilmektedir (10). ¹H NMR'nin domuz etinde su tutma kapasitesi, kas içi yağ ve toplam su içeriğini belirlemede görünür, floresans ve yakın kızılötesi (NIR) reflektans spektrometriden daha iyi bir spektroskopik yöntem olduğu da belirtilmiştir (11). NMR çapraz relaksasyonun kasın ete dönüşümü

sırasındaki su dağılımı ve molalitesini belirlemede ve bu değişikliklerin et kalitesiyle nasıl bağlantılı olduğunu açıklamada mükemmel bir araç olduğu kanıtlanmıştır (12). Kas enerjisindeki değişiklikler, ATP, kreatin fosfat, şeker fosfatları ve inorganik fosfat (Pi) gibi fosforlanmış bileşikler ölçen ^{31}P NMR ile kolayca görüntülenebilmektedir. pH Pi rezonansının pozisyonundan ölçülebilmektedir. ^{31}P NMR kas hücreleri arasında pH heterojenliğini belirlemeyi mümkün kılmaktadır (13). Çeşitli et türlerinden elde edilen kaslarda ^{31}P NMR kullanılarak post mortem metabolizma ve pH değişiklikleri incelenmektedir. Li et al. (2012) yaptıkları çalışmada, farklı kalitedeki domuz etlerinin düşük alanlı NMR ile sınıflandırılabilmesini belirtmiştir (14). Siciliano et al. (2013) ise domuz eti ürünlerinin yağ asidi zincir profillerini incelemiş ve ^1H NMR'nin besinsel parametreleri belirlemede hızlı ve doğru bir yöntem olduğu sonucuna varmıştır (15). NMR yöntemiyle diğer biyofiziksel yöntemleri birleştirmek genellikle faydalı olmaktadır. Örneğin LF ^1H NMR, görünür (VIS) ve yakın kızılötesi (NIR) reflektans, Raman saçılımı ve floresans emisyonu birleştirilerek farklı kesim öncesi stres seviyelerindeki hayvanlardan elde edilen domuz etlerinde istenmeyen lezzet karakteristiğini (warmed-over flavor; WOF) belirlemek için kullanılmıştır (16). NMR tekniği, son yıllarda gıda analizleri, gıdaların kalite kontrolü ve gıdaların coğrafi orijinlerinin belirlenmesinde kullanımı yaygınlaşan bir teknik olmuştur (17). *In vitro* olarak kas örneklerinde kullanılabildiği gibi, *in vivo* olarak küçük ya da orta büyüklükteki hayvanlarda da kullanılmaktadır. Kimyasal tekniklerden daha çok avantajı bulunmaktadır. Bununla birlikte, NMR spektrometrelerinin yüksek maliyeti dezavantajlarından (9).

GÖRÜNTÜ ANALİZLERİ

Video görüntü analizi, insan görme sisteminin işleyişinin taklit edilerek nesnelere ait görüntülerin sayısal olarak ifade edilmesidir. Bu sistemde, nesnelere ait şekil, uzunluk, alan, açı, nisbi konum, tekstürel yapı, gri-ton değeri, RGB renk değerleri vb. parametreler ölçülmektedir (18). Yağ ve etin görsel olarak fark edilebilir karakteristiği taze etin yeme kalitesini belirlemektedir. Etteki bu yağ dağılımının kesin olarak belirlenmesinin zorluğu çeşitli tekniklerin gelişmesine olanak sağlamıştır. Kimyasal analizlerle etteki yağ oranı kesin olarak belirlenebilmektedir fakat bu hem maliyetli hem de zaman alan bir yöntemdir. Bir video kamera ve görüntü analizi kullanılarak hazırlanan bir sistem kemiksiz taze et ve et ürünlerindeki görünür yağ ve et oranının hızlı ve zararsız olarak ölçülmesinde kullanılmaktadır (19). Et kalitesini (özellikle gevreklik ve su tutma

kapasitesi) on line ölçümlerle tahmin etmek ticari anlamda çok önemli bir potansiyeldir. Ölçümlerde kontaminasyon meydana gelmez, ürün çok az düzeyde zarar görür ve ölçümler oldukça hızlı ve pratiktir (20). Video görüntüleme analizi karkas boyutu ve renk değerlendirmede otomatik ölçüm olanağı tanımaktadır (18).

YAKIN KIZILÖTESİ (NIR) SPEKTROSKOPİ

NIR spektroskopisi, görünür spektrumun kırmızı ucuna çok yakın olan, kızılötesinin özel bir bölgesiyle ilgilidir (3). NIR spektroskopisi elektromanyetik spektrumun 780 ile 2500 nm dalga boyu aralığındaki bölgesini kapsamakta ve yapı içerisindeki O-H, C-H, C-O ve N-H gibi moleküler bağların titreşimleri ile ilgili olarak absorpsiyon bantları oluşturmaktadır. Söz konusu bölgede analiz edilecek olan örnek yakın kızılötesi ışınları ile karşılaştığı zaman, bu bağlar titreşimsel enerji değişikliklerine maruz kalmakta ve bunun sonucu olarak da moleküller titreştiği zaman NIR bölgesindeki organik moleküllerin enerji absorpsiyonu meydana gelmektedir (3, 21). NIR spektroskopisi, taranan örnekteki moleküler bağlar ve kimyasal bileşenler hakkında tam bilgi sağlamaktadır, bu nedenle bu teknoloji sadece gıdayı karakterize etmek için değil aynı zamanda kalite ölçümü ve proses kontrol için de uygun bir araçtır (22). NIR spektroskopinin dört temel avantajı bulunmaktadır: hız (3 dakikadan daha az), örnek hazırlama kolaylığı (bazen örnek hazırlama gerektirmemesi), tek bir spektrometrede çoklu analiz yapabilme (farklı bileşenlerin aynı anda belirlenmesi) ve örneğin deforme olmaması (analizden sonra örnek başka bir amaçla kullanılabilmektedir) (19, 23-25). NIR spektroskopisi gıda ve et ürünlerinde kabul edilebilir uygulamalar bulmuştur. Etteki yaygın uygulamalar sadece yağ ve protein gibi kimyasal kompozisyonun belirlenmesiyle kalmayıp aynı zamanda sertlik ve gevreklik gibi fiziksel karakteristiklerin de belirlenmesini kapsamaktadır (16, 19, 24, 26-28). Su, et ve et ürünlerinde taze materyalin %75'ine kadar bulunabilen değişken bir bileşendir. O-H bağlarının NIR'da 1450-1940'taki özgül absorpsiyonu bu bileşenin NIR ile belirlenebilirliğini açıklamaktadır. Ham protein ve kas içi yağ içeriğinin belirlenmesinde NIR'in iyi performansı, ham protein için N-H bağlarının 1460-1570 nm ve 2000-2180 nm'de absorpsiyonuna ve kas içi yağlar için C-H bağlarının (1100-1400, 1700 ve 2200-2400 nm) absorpsiyonuna bağlıdır (26). Bunun yanı sıra, su tutma kapasitesi, pH ve koku, lezzet, sululuk ve renk gibi duyu özelliklerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır (23, 29). Bu teknik ayrıca piliç göğüs etinde yağ asitlerinin tespitinde de kullanılmış (27, 30) ve

0.10 g/kg konsantrasyonun üzerinde hızlı ve uygulanabilir bir yöntem olacağı belirlenmiştir (30). Hamburger köftelerinde taşıyışın belirlenmesi (31), kanguru etinin sığır etinden ayırımının yapılması (32) gibi konularda başarılı kalibrasyon modelleri oluşturulmuştur. Bununla birlikte, balıklarda kimyasal kompozisyonun belirlenmesinde de kullanılmaktadır (33).

İMMUNOLOJİK YÖNTEMLER

İmmünolojik yöntemler bir antikorun bir antijene spesifik olarak bağlanmasını temel almaktadır. İmmünolojik testler homojen ve heterojen testler olarak ayrılmaktadır. Antikor-antijen kompleksi doğrudan ölçülebilir ve test süresi kısa olduğundan homojen testler için markörlere gerek yoktur. Aglutinasyon reaksiyonları, immünodiffüzyon ve türbidimetri bu tür testlere örnektir ve bu testler pek çok patojen için uygundur. Heterojen testler daha karmaşık prosedürlerdir ve çeşitli destek ve raporlama sistemlerinde immobilize antikorları kullanılmaktadır. Bu prosedürler özel ekipman ihtiyacı olmaksızın yürütülebilmektedirler. Pek çok mikroorganizma için tespit limitleri 10^3 - 10^5 hücre/ml arasındadır. Gıdalarda doğrudan tespit mümkün değildir ve zenginleştirme gerekmektedir. İmmüno testler aynı zamanda bakteriyel toksinleri de tespit edebilmektedir (34). Mikroorganizmaların belirlenmesi ve karakterizasyonunda antikor antijen reaksiyonu yıllardır uygulanmaktadır. Ayrıca, düşük moleküler ağırlığa sahip mikotoksin, pestisit veya veteriner ilaçları gibi gıda kontaminantlarının belirlenmesinde de tercih edilmektedir. Bir immünolojik yöntemin spesifitesini büyük ölçüde kullanılan antikorun spesifitesi belirlemektedir. İmmünolojik yöntemlerde üç çeşit antikor kullanılmaktadır: Poliklonal antikorlar, monoklonal antikorlar ve rekombinant antikorlar (35). Antijen antikor reaksiyonunu gerçekleştirmek için birçok yöntem olmasına rağmen son yıllarda en çok kullanılan yöntem "Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" testidir (35). ELISA yöntemi, antijen-antikor reaksiyonlarının direkt olarak saptandığı bir enzim immunoassay yöntemidir (36). Bu yöntemde, antijen ya da antikor bir enzimle işaretlenmekte ve immünolojik reaksiyon, enzimatik bir aktivite sonucu ölçülmektedir (35). ELISA hassas, spesifik, basit ve hızlı bir yöntem olmasından dolayı tür tespitinde tercih edilmektedir (37). Patojen mikroorganizmaları ve toksinlerini belirlemek için birçok ELISA testi geliştirilmiştir. Fakat bunun yanında ELISA'nın manuel prosedürü çok zahmetli olduğu için son zamanlarda bazı ELISA testleri (VIDAS, Assurance EIA, Transia ElisamaticII, Detex vb) tamamen otomatik hale getirilmiştir. Bu sistemler ile *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *E. coli* 0157, stafilakokkal enterotoksin ve *Campylobacter* gibi

patojen ve toksinleri kısa sürede otomatik olarak teşhis edilmektedir (35).

MOLEKÜLER BİYOLOJİK YÖNTEMLER

Gıdalarla taşınan bakterilerin identifikasyonu ve karakterizasyonu için fenotipik yöntemlerin kullanımını yaygın şekilde devam etmekle birlikte, son yaklaşımlar gıda kaynaklı patojenler için genotipik yöntemlerin kullanımına yöneliktir. Bu teknikler parmak izi yöntemleri olarak adlandırılmaktadır. Bunlar arasında, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP), rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD), vurgulu alan jel elektroforezi (PFGE) ve PCR ve RFLP'nin kombinasyonu olan AFLP bulunmaktadır (34, 38).

1980'li yıllarda Kary Mullis tarafından geliştirilen PCR; DNA polimeraz enziminin kullanılmasıyla in vitro şartlarda DNA çoğaltılmasını ifade etmektedir. PCR, hedeflenen DNA bölgesinin milyonlarca kopyasını bir iki saat gibi kısa sürelerde oluşturabilen bir tekniktir. PCR'da DNA polimeraz enzimi yardımıyla genomun tamamı değil, spesifik bölgelerin kopyalanması gerçekleştirilir. Hangi bölgenin çoğaltılacağı ise çalışmanın amacına ve kullanılan yönteme bağlıdır. PCR yönteminin uygulanabilmesi için teorik olarak tek kopya DNA bile yeterli görülmektedir (39). PCR çeşitleri, farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Kalitatif veya kantitatif özelliğine göre ise ikiye ayrılır: Klasik PCR çeşitleri ve Realtime-PCR (36). DNA'ya dayalı pek çok yöntem bulunmakla beraber bunlardan en umut verici olanı; hızı, hassasiyeti, spesifitesi, seçiciliği, hedef bakterinin kantitatif olarak belirlenebilmesi ve otomasyona uygun olması gibi nedenlerle real-time PCR tekniğidir. Real-time PCR tekniğinde, klasik PCR'dan farklı olarak işaretli PCR ürünlerinin yaydığı floresans sinyali belirleyen optik bir modül mevcuttur. PCR'in her bir döngüsünde floresans sinyalinin şiddeti enstrümental olarak belirlenir (40,41). Bu teknikte, ürün analizi reaksiyon sırasında yapıldığı için, amplifikasyon sonrasında uygulanan agaroz jel elektroforez işlemine de gerek kalmamaktadır. Böylece sonuçlar reaksiyon anında alınabilmekte ve çok sayıda örnek, son derece az bir kontaminasyon riskiyle güvenli bir şekilde analiz edilebilmektedir. Araştırmacılar, real-time PCR tekniğinin geniş bir dinamik aralığa sahip olmasının yanında, daha spesifik bir dedeksiyona ve kantitasyona imkan sağlaması nedeniyle klasik PCR'a kıyasla oldukça avantajlı bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (41). PCR aynı zamanda; bakteri, virüs, fungus, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin, primerler (özgül tamamlayıcı oligonükleotitler) ile ısıya dayanıklı

enzimleri kullanarak laboratuvar ortamında çoğaltılmasını sağlayan özgün ve güvenilir bir yöntemdir. Üzerinde çalışma yapılan genetik materyal, çok az sayıda ve hatta birçok ilgisiz DNA moleküllerinin arasında olsa bile çoğaltılabilmekte, homojen bir DNA materyali haline getirilebilmekte ve böylelikle kolayca tanımlanabilmektedir (42).

RFLP tekniği DNA düzeyinde polimorfizm (çok biçimlilik) elde etmek amacıyla günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakteriler, bakteriyofajlara (bakterileri enfekte ederek çoğalan virüsler) karşı savunma mekanizması olarak çeşitli restriksiyon enzimleri oluşturmaktadırlar. Bu enzimler DNA molekülünü özgün tanıma sıralarından kesebilen enzimlerdir (43). Restriksiyon enzimleri (RE), çok özgül olarak, DNA'yı belirli bölgelerden keserek 1000-20000 baz çiftlik parçalar oluştururlar. DNA'nın bu enzimlerden bir veya birkaçı ile kesime uğratıldıktan sonra, agaroz jel elektroforezine tabi tutulması ve sonra etidyum bromür ile boyanan jelde oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe "restriction fragment length polymorphism (RFLP)" denmektedir (44). Girish et al., (45) 12S rRNA mitokondrial geni üzerinde PCR-RFLP tekniğini kullanarak, farklı et türlerinin tanımlanmasını araştırmışlardır. Sığır, bufalo, koyun ve keçi etlerinin kalitatif olarak tanımlanmasında taze ve işlenmiş et örneklerinde tutarlı sonuçlar elde ettiklerini ancak et karışımlarında aynı başarıyı yakalayamadıklarını bildirmişlerdir.

"Random amplification of polymorphic DNA (RAPD)"; kullanılan kısa oligonükleotid primerlerin hedef DNA dizisinde birden fazla yere bağlanarak bu bölgeleri çoğaltması ve çoğaltılan segmentlerin jel elektroforezde yürütülmesi işlemidir. Jel elektroforezde oluşan DNA bantları karşılaştırılarak türlerin ayırımı yapılmaktadır. (46). RAPD yöntemi genellikle 9-10 bazlık kısa, tek bir primer kullanılarak genomdaki rasgele bölgelerin çoğaltıldığı PCR temelli bir yöntemdir. Bu yöntemde özgün hedef DNA bölgesi ya da hedef gen yoktur. Her bir primer rasgele DNA molekülünün farklı bölgelerine bağlanabilmekte ve bu bölgelerin çoğaltılmasını sağlamaktadır (43). Bu yöntem bitki, bakteri ve hayvan türlerinin tespitinde başarıyla kullanılmaktadır (46). Diğer moleküler genetik yöntemlerle karşılaştırıldığında RAPD yönteminin çeşitli üstünlükleri ve de eksiklikleri bulunmaktadır (43). DNA molekülleri ısı işlem, tütsüleme, salamura, kurutulmuş vb. gibi işlemlere tabi tutulmuş et ve ürünlerinde önemli veya önemsiz oranda genellikle daha küçük boyutlara parçalanırlar. Bu gibi durumlarda etin türünü tespit etmek için küçük parçalara ayrılmış DNA'yı kullanmak gerekir. Böyle durumlarda RAPD'nin spesifik PCR'ye göre daha elverişli olduğu vurgulanmıştır (46).

Elektroforez, moleküllerin ayrılmasında basit ve hızlı bir yöntemdir. Jel elektroforez, değişken alan elektroforez, immunoelektroforez, kapiler elektroforez, iki boyutlu elektroforez gibi farklı elektroforez yöntemleri vardır. Et ve et ürünlerinde proteinlerin tanımlanmasında en belirleyici elektroforez yöntemi, iki boyutlu (2D) elektroforez olarak belirtilmiştir. Bunun yanında SDS-PAGE yöntemi de yapılan araştırmalarda en çok kullanılmış olan yöntemlerdendir (39). Darbeli alan jel elektroforezi ilk kez 1982'de işlevsel hale getirilmiş ve bu tarihten itibaren büyük DNA moleküllerini ayırmak için çoklu elektrik alanlarını kullanan çeşitli aygıtlar geliştirilmiştir. Tüm sistemler DNA moleküllerini aynı boyutta ayırır, ancak ayırma hızı ve netliğinde farklılıklar vardır (42). Bu yöntemde genomik DNA bir ya da daha fazla restriksiyon enzimi ile kesilir ve oluşan restriksiyon fragmentlerinin ayırımı akımı çeşitli yönlerde değişen elektroforez ile gerçekleştirilir. Aktifleştirilmiş olan bakteriler düşük sıcaklıkta eriyebilen agaroz karıştırılır ve küçük kalıplar içerisine dökülür. Agaroz içerisindeki hücrelerden DNA izolasyonu gerçekleştirilir (41). İki boyutlu elektroforez (2DE: 2 Dimension Electrophoresis); proteinlerin izoelektrik nokta ve molekül ağırlığına göre, protein karışımlarını ayırmada etkili yöntemlerden biridir. Bu yöntemle proteinler, izoelektrik nokta pH'larına, dolayısıyla yüklerine göre duyarlı şekilde ayrıştırılabilirler. Birinci boyutta, yüke bağlı izoelektrik odaklama, ikinci boyutta molekül ağırlığına bağlı elektroforez kullanılır (39). SDS-PAGE, denatüre edici maddeler (örneğin; sodyumdodesilsülfat, -merkaptolanol) kullanılarak proteinlerin poliakrilamid jelde ayrılmasını sağlayan bir tekniktir. Bu teknikte proteinler denatürasyona uğrayarak üç boyutlu yapıdan lineer yapıya dönüşerek poliakrilamid jelde ayrılırlar. Bu teknik etlerin orijinlerinin belirlenmesinde kullanılabilir. Elektroforetik tekniklerin; numunelerdeki %2-10 arasındaki yabancı et karışımlarının tespit edilebilmesi, dondurulmuş, çok küçük parçalara ayrılmış, kürlenmiş, 75 °C'ye kadar ısıtılmış et ürünlerinde uygulanabilmesi ve genetik olarak birbirine yakın hayvan türlerinin etlerinin ayırt edilebilmesi gibi avantajları bulunmaktadır. SDS-PAGE tekniğini, Scope ve Penny, ilk defa et proteinlerinin ayırımı için kullanmışlar ve daha sonraları bu metodun, et karışımlarındaki ve et ürünlerindeki et türlerini belirlemede çok değerli bir yöntem olduğu anlaşılmıştır. SDS-PAGE metodu kullanılarak yapılan bir çalışmada, SDS-PAGE metodunun yüksek çözünürlük sağlaması, kolay tekrarlanabilirliği ve elektroferogramlarda proteinlerin molekül ağırlıklarına göre hareket etmesinden dolayı

üstün olduğu bildirilmiştir (47). Yapılan bir çalışmada, ülkemizde yetiştirilen alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) ile aynı familyadan olan ve Norveç'ten ithal edilen Atlantik somonunun (*Salmo salar*) sodyum dodesil sülfat poli-akrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemiyle protein profilleri ve protein kaliteleri araştırılmıştır. Protein bant profillerine göre *Salmo salar* balığının alabalığa göre daha yoğun protein bantlarına sahip olduğu tespit edilmiştir (48). SDS-PAGE tekniğiyle rigor-mortis sonrası domuz kaslarındaki sarkoplazmik proteinlerin ayırımı ve identifikasyonları yapılmış, moleküler ağırlıkları farklı 14 tane sarkoplazmik protein elde edilmiştir. Elektroforez teknikler ayrıca bazı balık türlerinin belirlenmesinde de kullanılabilir (17).

AFLP; genetik markör teknikleri içerisinde genetik karakterizasyon çalışmaları için geliştirilmiş çoklu lokus parmak izi analizi tekniklerinden biridir. Genellikle birbirine yakın türlerin karakter analizlerinde kullanılan AFLP sonuçları günümüzde bakteriyel taksonomiye açıklamakta ve sonuçları DNA-DNA hibridizasyonu gibi teknikler ile desteklenmektedir. Genomik tiplendirme teknikleri, birbirine çok yakın akraba türlerin tespiti, türlerin tanımlanması ve ayırımı, starter kültür analizleri, gıdalarda bozulmalara ve gastrointestinal enfeksiyonlara neden olan önemli mikroorganizmaların karakterizasyonlarında kullanılarak önem kazanmıştır (49).

MİKROBİYOLOJİDE YENİ GELİŞMELER

Son zamanlarda spesifik mikroorganizmaların belirlenmesi için alternatif yaklaşımlar geliştirilmiştir. Akış sitometrisi, az sayıda hücreyi (örn. 10^2-10^3) hızlıca (dakikalar içinde) belirleyebilen bir optik bazlı yaklaşımdır fakat gıda matrisleri tekniğe engel olabilmekte ve canlı ve ölü hücreler arasındaki ayırımı problemli olabilmektedir (34). Akış sitometrisi birçok bilim dalında yaygın olarak kullanılmaktadır. Önceleri hematoloji laboratuvarlarında kullanılan bu cihaz ve sistem günümüzde başta hematoloji, immünoloji, onkoloji olmak üzere; viroloji, bakteriyoloji, mikoloji, organ nakil birimleri, araştırma laboratuvarları ile patoloji, histoloji, biyokimya gibi klinik laboratuvarlarında kullanılan önemli bir araştırma yöntemi olarak yerini almıştır. Klinik laboratuvarların yanı sıra gıda, toksikoloji, deniz bilimleri araştırmalarında da bu cihazdan oldukça sık yararlanılmaktadır (50). Akış sitometrisi, hücre veya partiküllerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesidir. Akış sitometrisi ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller, lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin

büyükklük, parçacıklı yapıda olma gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli fluorokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikülün immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir (51, 52).

İmpedans mikrobiyoloji, mikroorganizmaları doğrudan metabolik son ürünlerin üretimi ya da dolaylı olarak CO₂ varlığına göre tespit etmektedir. Mikrobiyel metabolizma, hem iletkenlik hem de kapasitansta artışla sonuçlanırken, impedansta düşüşe neden olmaktadır. Bu impedans 20 saatlik bir periyot sonunda spesifik ortama inokule edilerek ölçülmektedir. Hedef organizmanın gelişimi nedeniyle sıvı ortamın elektriksel iletkenliğinin değişmesini temel alan bu yönteme "Empedometri" denmektedir (34, 52). Bu yöntem hızlı olmasa da, tam otomatik olduğundan ve birçok örnekle aynı anda başa çıkabildiğinden dolayı, yüksek iş hacmine uygundur. Özgünlük hedef mikroorganizmanın gelişmesinde kullanılan ortama bağlıdır (34). Bu yöntem, klinik örneklerde bakterilerin ve spesifik gıda patojenlerinin tespiti ve kalitenin görüntülenmesi için oldukça uygundur (52).

SONUÇ

Et kalitesinin belirlenmesinde her ne kadar geleneksel yöntemler önemli bir rol oynasa da, moleküler yöntemlerin kullanımının yaygınlaşacağı da açıkça görülmektedir. Moleküler biyoloji alanında meydana gelen gelişmelerle birlikte, bu alanda kısıtlı olan bilimsel çalışmaların artarak, et ve et ürünlerinin kalitesinin belirlenmesinde kullanılacak yöntemlerin standardize edilmesi, kolayca hızlı ve güvenilir sonuçlara ulaşılması açısından faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Öztan A. 2010. Et Bilimi Ve Teknolojisi. TMMOB Gıda Mühendisleri Odası Yayınları Kitaplar Serisi No:1, Ankara, Türkiye, 526 s.
2. Kahraman T, Nazlı B, Ergün Ö. 2006. Elektrik Stimülasyonunun Et Kalitesi Üzerine Etkileri. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.* 32 (2), 23-30.
3. Mullen AM. 2002. New Techniques For Analysing Raw Meat Quality. In: *Meat Processing, Improving Quality*. Editors: Kelly, J., Kelly, J., Ledward, D. Woodhead Publishing Limited And Crc Press LLC, Washington
4. Andersen HJ, Oksbjerg N, Young JF, Therkildsen M. 2005. Feeding And Meat Quality - A Future Approach. *Meat Sci* 70, 543-554.

5. Çilek S, Tekin ME. (2005). Koyunlarda Karkas Derecelendirmesinde Ultrason Ve Sondaların Kullanılması. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 15, 2: 17-2.
6. Çilek S, Dirican S. 2008. Koyun Karkaslarının Derecelendirilmesinde Ultrasonografik Yöntemlerin Kullanımı. Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs, Erzurum.
7. Awad TS, Moharram HA, Shaltout OE, Asker D, Youssef MM. 2012. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Res Int* 48, 410-427.
8. Kor A, Ertuğrul M. 2000. Canlı Hayvanda Karkas Kompozisyonu Tahmin Yöntemleri. *Hayvansal Üretim* 41: 91-101.
9. Bayraktaroğlu G, Obuz E. 2006. Ultrason Yönteminin İlkeleri Ve Gıda Endüstrisinde Kullanımı. Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs, Bolu, Türkiye.
10. Damez JL, Clerjon S. 2013. Quantifying and predicting meat and meat products quality attributes using electromagnetic waves: An overview. *Meat Sci* 95 879-896
11. Br ndum J, Munck L, Henckel P, Karlsson A, Tornberg E, Engelsen SB. 2000. Prediction of water-holding capacity and composition of porcine meat by comparative spectroscopy. *Meat Sci* 55,177-185.
12. Pearce KL, Rosenfold K, Andersen HJ, Hopkins DL. 2011. Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes - A review. *Meat Sci* 89, 111-124.
13. Monin G. 1998. Recent Methods For Predicting Quality Of Whole Meat. *Meat Sci*, Vol.49, No. Supply.1, 231-243.
14. Li C, Liu D, Zhou G, Xu X, Qi J, Shi P, Xia T. 2012. Meat quality and cooking attributes of thawed pork with different low field NMR T21. *Meat Sci* 92, 79-83.
15. Siciliano C, Belsito E, De Marco R, Di Gioia ML, Leggio A, Liguori A. 2013. Quantitative determination of fatty acid chain composition in pork meat products by high resolution 1H NMR spectroscopy. *Food Chem* 136, 546-554.
16. Br ndum J, Byrne DV, Bak LS, Bertelsen G, Engelsen SB. 2000. Warmed-over flavour in porcine meat -a combined spectroscopic, sensory and chemometric study. *Meat Sci* 54, 83-95.
17. Ekici K, Akyüz N. 2003. Farklı Hayvan Türlerine Ait Çiğ Etlerin SDS-PAGE Yöntemiyle Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. *Yyü Vet Fak Derg* 14 (2):78-82.
18. İnce D, Ayhan V. 2008. Koyunlarda Karkas Kalitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Hayvansal Üretim* 49(1): 57-61.
19. Serdaroğlu M, Yıldız Turp G. 2004. Recent Techniques For Evaluation Of Meat Quality. *Pamukkale J Eng Sci* 10 (1) 111-117.
20. Swatland HJ. 2002. On-Line Monitoring Of Meat Quality. In: *Meat Processing, Improving Quality*. Editors: Kelly, J., Kelly, J., Ledward, D. Woodhead Publishing Limited And Crc Press Llc, Washington.
21. Ertugay MF, Başlar M. 2011. Gıdaların Kalite Özelliklerinin Belirlenmesinde Yakın Kızılötesi (NIR) Spektroskopisi. *GIDA* 36 (1): 49-54.
22. Andre S S, Murray I, Navajas EA, Fisher AV, Lambe NR, Bünger L. 2007. Prediction Of Sensory Characteristics Of Lamb Meat Samples By Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Meat Sci* 76, 509-516.
23. Elmasry G., Sun D-W, Allen P. 2012. Near-Infrared Hyperspectral Imaging For Predicting Colour, Ph And Tenderness Of Fresh Beef. *J Food Eng* 110, 127-140.
24. Cai J, Chen Q, Wan X, Zhao J. 2012. Determination Of Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N) Content And Warner-Bratzler Shear Force (WBSF) In Pork Using Fourier Transform Near Infrared (FT-NIR) Spectroscopy. *Food Chem* 126, 1354-1360.
25. Kamruzzaman M, Elmasry G, Sun, D-W, Allen P. 2012. Nondestructive Prediction And Visualization Of Chemical Composition In Lamb Meat Using NIR Hyperspectral Imaging And Multivariate Regression. *Innovative Food Science And Emerging Technologies*, Doi: 10.1016/J.İfset.2012.06.003.
26. Prieto N, Roehe R, Lavin P, Batten G, Andres S. 2009. Application Of Near Infrared Spectroscopy To Predict Meat And Meat Products Quality: A Review. *Meat Sci* 83, 175-186.
27. De Marchi M, Riovanto R, Penasa M, Cassandro M. 2012. At-Line Prediction Of Fatty Acid Profile In Chicken Breast Using Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Meat Sci* 90, 653-657.
28. Zamora-Rojas E, Pérez-Marín D, De Pedro-Sanz, E, Guerrero-Ginel JE, Garrido-Varo A. 2012. Handheld NIRs Analysis For Routine Meat Quality Control: Database Transfer From At-Line Instruments. *Chemometrics And Intelligent Laboratory Systems* 114, 30-35.
29. Sinelli N, Limbo S, Torri L, Di Egidio V, Casiraghi E. 2010. Evaluation Of Freshness Decay Of Minced Beef Stored In High-Oxygen Modified Atmosphere Packaged At Different Temperatures Using NIR And MIR Spectroscopy. *Meat Sci* 86, 748-752.

30. Zhou LJ, Wu H, Li JT, Wang ZY, Zhang LY. 2012. Determination Of Fatty Acids In Broiler Breast Meat By Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Meat Sci* 90, 658-664.
31. Ding HB, Xu RJ. 2000. Near-Infrared Spectroscopic Technique For Detection Of Beef Hamburger Adulteration. *J Agr Food Chem* 48 (6): 2193-2198.
32. Ding HB, Xu RJ. 1999. Differentiation Of Beef And Kangaroo Meat By Visible/Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *J Food Sci* 64 (5): 814-817.
33. Isaksson T, Togersen G, Iversen A, Hildrum KI. 2006. Non-Destructive Determination Of Fat, Moisture And Protein In Salmon Fillets By Use Of Near-Infrared Diffuse Spectroscopy. *J Sci Food Agr* 69 (1): 95-100.
34. McClure PJ. 2002. Microbiological Hazard Identification In The Meat Industry In: *Meat Processing, Improving Quality*. Editors: Kelly, J., Kelly, J., Ledward, D. Woodhead Publishing Limited And Crc Press Llc, Washington.
35. Aras Z. 2011. Mikrobiyolojide Kullanılan Hızlı Tanı Yöntemleri. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 68 (2): 97-104.
36. Var I, Kabak B, Özkarlı M. 2004. Mikotoksin Aranmasında Kullanılan Analiz Yöntemleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, Cilt: 02 Sayı: 11 Sayfa: 1-11. www.mikrobiyoloji.org/pdf/702041101.pdf.
37. Günşen U, Ovalı BB, Coşkun Y. 2006. Çiğ Et Ve Isıl İşlem Görmüş Et Ürünlerinde ELISA Tekniği İle Farklı Et Türlerinin Tespiti. *İstanbul Üni. Vet. Fak. Derg.* 32 (2), 45-52.
38. Mutlu MB. 2010. Gıda Kalite Kontrolü. TC. Anadolu Üniversitesi Yayını. Eskişehir ISBN: 978-975-06-0748-6.
39. Gezgin T, Karakaya M. 2011. Et Ve Et Ürünlerinin Kalitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler Biyolojik Yöntemler. *Gıda Teknolojisi* 15 (5), 90-96.
40. Törnük F, Kesmen Z, Yetim H. 2008. Et Ve Et Ürünlerinde Patojen Bakterilerin Tespitinde Real-Time PCR Tekniğinin Kullanılması. Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs, Erzurum.
41. Kesmen Z, Güllüce A, Yetim H. 2008. Et Ürünlerinde Kullanılan Farklı Tür Hayvan Etlerinin Tespitinde Real-Time PCR Tekniği. Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs, Erzurum.
42. Çetinkaya E, Ayhan K. 2012. Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler. *Karaelmas Fen Ve Mühendislik Dergisi /Karaelmas Science And Engineering Journal* 2 (1), 53-62.
43. Özdil F. 2007. Mitokondriyel DNA PCR-RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) Markerleri Kullanılarak Türkiye'nin Farklı Yörelere Ait Bal Arılarının Tanımlanması. Ankara Üni. Fen Bilimleri Enst. Zootečni Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara, Türkiye.
44. Yağcı A. 2001. Restriction Fragment Length Polymorphism Ve Polimeraz Zincir Reaksiyon Bazlı Tipleme Yöntemleri. web.inonu.edu.tr/~iozerol/rdurmaz/uygmolmikr/149.pdf.
45. Girish PS, Anjaneyulu ASR, Wiswas KN, Shivakumar BM, Anand M, Patel M, Sharma B. 2005. Meat Species İdentification By Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (Pcr-Rflp) Of Mitochondrial 12s Rrna Gene. *Meat Sci* 70 (1):107-112.
46. İlhak İ, Arslan A. 2003. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Yöntemiyle Sığır, Koyun, Keçi Ve Yabani Domuz Etinin Ayırt Edilmesi. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 17 (1), 59-63.
47. Ateş M, Ögüt S, Şen İ, Gümüş BA, Polat M. 2010. Oncorhynchus Mykiss İle Salmo Salar L. Balık Türlerinin SDS-PAGE Elektrofrezisi Yöntemi İle Protein Bantlarının Karşılaştırılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Yaşam Dergisi*, 2(2):01-03.
48. Yetim H, Çam M. 2009. Enstrümental Gıda Analizleri. Erciyes Üniversitesi Yayınları No.175, Kayseri, Türkiye.
49. Yıldırım T. 2007. Laktik Asit Bakterilerine (LAB) Ait Bazı Türlerin AFLP (Çoğaltılan Parça Boy Farklılaşması) Yöntemi İle Parmak İzi Analizleri. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye.
50. Azkur AK, Aslan ME. 2012. Akış Sitometri Ve Veteriner Hekimlikteki Uygulamaları. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 7(1): 59-66.
51. Karaboz İ, Kayar E, Akar S. 2008. Flow Sitometri Ve Kullanım Alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi Tr (Eski Adı: Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi)* Cilt: 06 Sayı: 2 Sayfa: 01-18. www.mikrobiyoloji.org/pdf/702080201.pdf.
52. Mandal PK, Biswas AK, Choi K, Pal UK. 2011. Methods For Rapid Detection Of Foodborne Pathogens: An Overview. *American Journal Of Food Technology* 6 (2):87-102. Doi:10.3923/Ajft.2011.87.102.