

Araştırma Makalesi

**ÇİĞ ET VE ISIL İŞLEM GÖRMÜŞ ET ÜRÜNLERİNDE ELISA *
TEKNIĞİ İLE FARKLI ET TÜRLERİNİN TESPİTİ**

Uğur GÜNŞEN* Ali AYDIN** Banu Bilge OVALI* Yasemin COŞKUN*

Geliş Tarihi : 08.02.2006

Kabul Tarihi : 16.02.2006

**Detection of Different Meat Species in Raw Meat and Cooked Meat
Products Using ELISA Technique**

Summary:

Detection of species in meat and meat products is important for consumers. In this study, a total of 410 random samples of meat and meat product samples (65 minced meat, 35 meatball dough 50 sausage dough, 125 Turkish sucuk, 75 salami, 60 sausage), which were collected from Bursa and Istanbul Markets in 2004 and 2005, were analysed. Cattle meat was detected in all 410 samples, chicken meat and horse meat were detected in 85 (20.7 %) and 14 (4.3 %) samples, respectively. It was determined that given information of 67 (16.3 %) of 410 samples were not in line with labels and 79 (19.2 %) of 410 samples were found fraud.

Key Words : Raw meat, Cooked meat products, ELISA, species detection

Özet: Et ve et ürünlerinde kullanılan et türlerinin tespiti tüketiciler için önem taşımaktadır. Araştırmada Bursa ve İstanbul bölgesindeki çeşitli satış noktalarından 2004-2005 yılı içerisinde tesadüfi örnekleme yoluyla temin edilen 410 et ve et ürünü (65 hazır kıyma, 35 köfte hamuru, 50 sucuk hamuru, 125 sucuk, 75 salam 60 sosis) analiz edilmiştir. Analiz edilen 410 adet numunenin tümünde (% 100) sığır eti, 85 adedinde (% 20.7) tavuk eti, 14 adedinde (% 4.3) at eti tespit edilmiştir. İncelenen 410 numuneye ait etiket bilgilerinin, 67 örnek (% 16.3) için etiket üzerinde verilen bilgiler ile uyumlu olmadığı belirlenerek, toplam 79 adet (% 19.2) örneğin hileli olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Çiğ et ve karışımları, ısı işlemleri görmüş et ürünleri, ELISA, Tür tespiti

Giriş

Et, evcil ruminantlar, kanatlılar, tavşan ve domuzdan elde edilen insan tüketimine uygun tüm parçaları ifade etmektedir (3). Özellikle vücut tarafından sentezlenemeyen eksojen aminoasitleri bünyesinde bol miktarda bulundurması, ek

* Gıda Kontrol ve Merkez Araştırma Enstitüsü, 16036 Hürriyet, Bursa

** İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, 34320 Avcılar, İstanbul

olarak Fe, P, Zn, Cu gibi mineral maddeler ile Vitamin B₁₂ gibi vitaminler ve yağ içermesi nedeniyle, beslenme açısından büyük önem taşımaktadır (27).

Et ürünleri içerisinde yer alan et türlerinin tespiti; düşük değerli istenmeyen et ve sakatatların karıştırılması ile ahlaki ve ekonomik yönden haksız rekabet oluşmasından, diğer taraftan dini inançları doğrultusunda bazı hayvanlara ait etleri tüketmeyen insanların aldatılmasından ötürü, tüketiciler açısından büyük bir öneme sahiptir (5, 7, 13).

Ülkemizde ve dünyanın diğer bölgelerinde, et ve et ürünlerine düşük değerli et kısımlarının ilavesi ya da farklı hayvanlara ait etlerin hileli olarak katılmış olduğunu bildiren çok sayıda araştırma mevcuttur (6, 14, 16, 26). Günümüzde etlerde tür tespitini yapmak amacıyla organoleptik analize dayanan sensorik analizler, kıl yapılarına dayanan anatomik ayırım, yağ dokunun fiziksel özellikleri vb. gibi histolojik yöntemlerin yanında sarkoplazmik proteinlerin elektroforetik yapı analizi (17), DNA hibridizasyon (10) ve PCR tekniği (5) ile immunoenzimatik yöntemler (ELISA) (14) yoğun olarak kullanılmaktadır.

ELISA gibi immunoenzimatik yöntemler hassas, spesifik, basit ve hızlı metodlar olmalarından dolayı tür tespitinde tercih edilmektedir (13, 22, 23). ELISA tekniği, hileli hazırlanmış taze et karışımları (14) ile ısıl işlem görmüş et ürünlerinin tür tespiti için etkili bir metod olarak da bildirilmektedir (1).

ELISA tekniği ile et türlerinin ayırt edilmesinde, türe özgü poliklonal ve monoklonal olmak üzere iki tip antikor kullanılmaktadır. Bunlardan monoklonal antikorlar tür tespitlerinde, homojen antikor popülasyonuna sahip olmaları (18) spesifiteleri, umumi olarak kullanılmalrı, tanımlanmış biyolojik aktiviteleri ve maliyeti düşürmeleri nedeniyle tercih edilmektedirler (8, 21).

Bu çalışmada, Bursa ve İstanbul bölgesinden temin edilen çeşitli çiğ et ve et karışımı ile ısıl işlem görmüş et ürünlerinde, tavuk, sığır, domuz ve at eti varlığının, monoklonal antikor sandviç (Mab sandwich) ELISA metodu kullanılarak tespiti amaçlanmış ve örneklerin ilgili standartlara uygunluğu incelenmiştir.

Materyal ve Metot

Araştırmada, Bursa ve İstanbul bölgesindeki çeşitli satış noktalarından (kasap, süpermarket, şarküteri vb.) 2004 - 2005 yılı içerisinde tesadüfi örnekleme yoluyla temin edilen et (65 adet hazır kıyma) ve karışımları (35 adet köfte hamuru, 50 adet sucuk hamuru) ile sucuk (125 adet), salam (75 adet) ve sosis (60 adet) gibi et ürünlerinden oluşan toplam 410 adet numune soğuk zincir altında laboratuvara getirilmiş ve en kısa sürede analize tabi tutulmuştur. Et ve et ürünlerinde tür tespiti ELISA yöntemi kullanılarak TS 12191 (2) standardı doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Çiğ ve ısı işlemi görmüş et ürünlerinde tür tespitleri, Biokits (pişmiş) tür identifikasyon kiti (Tepnel Biosystems Limited, England) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Örneklerin Hazırlanması :

Küçük parçalar haline getirilen çiğ ya da ısı işlemi görmüş et ve et ürünü numunelerinden 25 g alınarak blendera (Warring blender) USA konulmuş ve örneklerin üzerine 225 ml fizyolojik tuzlu su ilave edilmiştir. Örnekler 1 - 2 dakika kadar blenderda homojen hale getirilmiştir. Daha sonra süzgeç kağıdından (Whatman No: 4) geçirilen numuneler su banyosunda (95 - 100 °C), 15 ± 1 dakika süre ısı işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen süzüntü tekrar filtre kağıdından (Whatman No: 4) süzülmuş ve örnekler tüplere alınmıştır.

Test Prosedürü :

Soğukta muhafaza edilen (2 - 8°C) kit ve reaktifler kullanım öncesi oda sıcaklığına getirildikten sonra her hayvan türü için stripteki kuyucuklardan 1 adet pozitif kontrol, 2 adet negatif kontrol kuyucuğu ayrılmıştır. Pozitif kuyucuğa 100 µl pozitif kontrol, negatif kuyucuklara da diğer pozitif kontrollerden 100 µl konulmuştur. Geri kalan kuyucuklara örnek süzüntülerinden 100 µl konularak plaklar oda sıcaklığında (18 - 23 °C) 60 dakika bekletilmiş, süre sonunda plaklar dökülmüş ve dilüe edilmiş yıkama çözeltisi (Tris buffered saline) ile 3 kez yıkanmıştır. Daha sonra plak kuyucuklarına 50 µl türe ait spesifik antiserum (Anti-species Biotinylate) pipetlenmiş ve plak 60 dakika süre ile oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Plaka dökülerek tekrar, dilüe edilmiş yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkanmıştır. Bu kez kuyucuklara 50 µl konjugat (Avidin Peroxidase) ilave edilerek hafifçe çalkalanmış ve plak tekrar 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda plak ters çevrilmiş ve yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkama işlemi müteakip ve plak kurutulmuştur. İşlem sonrası kuyucuklara, hazırlanmış substrat (ABTS Concentrate (2,2'-azino-D-i-(3-ethylbenzt azoline sulphonic acid)'nın 1:24 oranında Peroxyde citrate buffer ile dilüsyonu sonucu elde edilen Working ABTS solüsyonu) solüsyonundan 100 µl ilave edilmiştir. Daha sonra tüm kuyucuklara stop çözeltiden (%1.5'lik sodium fluoride) 50 µl ilave edilerek reaksiyon durdurularak ELISA okuyucusunda (ELX 800, Bio-tek Inst., USA) ortalama 414 nm (405-420 nm) dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür.

Hesaplama ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Deneyde uygulanan negatif kontrollerin absorbans değerlerinin toplamı negatif kontrollerin sayısına bölünmekte ve çıkan sonuç F değeri (2.5) ile çarpılarak Cut-off değeri bulunmaktadır. Numunelerin absorbans değerleri Cut-off değeri ile kıyaslanmaktadır. Cut-off değerine eşit ve daha yüksek absorbans değerine sahip örnekler pozitif olarak tespit edilmektedir.

Bulgular

Araştırmada çeşitli satış noktalarından temin edilen çiğ et ve karışımları ile ısı işlemini görmüş et ürünlerinden yapılan analizler neticesinde elde edilen sonuçlar Tablo 1'de görülmektedir.

Analiz edilen 410 adet numunenin tümünde (% 100) sığır eti, 85 adedinde (% 20.7) tavuk eti, 14 adedinde (% 4.3) at eti tespit edilmiştir. Domuz eti örneklerin hiçbirinde saptanmamıştır. İncelenen 410 numuneye ait etiket bilgileri değerlendirildiğinde, toplam 67 örneğin (% 16.3), üzerinde bulunan etiket bilgilerinden farklı hayvan türüne ait et içerdiği saptanmış, belirlenen bu örneklerle ilave olarak etiketlerde varlığı bildirilmemiş hayvan türlerini de içeren toplam 79 adet (% 19.2) numunenin hileli olduğu belirlenmiştir.

Tablo 1: Örneklerde saptanan farklı et türleri ve düzeyleri

Table 1 : The detection of different meat species and levels of samples

Numune Çeşidi	Numune Sayısı (n)	Saptanan Sığır Eti Sayısı ve (%) Değerleri	Saptanan Tavuk Eti Sayısı ve (%) Değerleri	Saptanan At Eti Sayısı ve (%) Değerleri	Saptanan Domuz Eti Sayısı ve (%) Değerleri	Etiketden Farklı Numune Sayısı ve (%) Değerleri	Hileli Numune Sayısı ve (%) Değerleri
Hazır kıyma	65	65 (100)	5 (7.7)	1 (1.5)	-	5 (7.7)	6 (9.2)
Köfte hamuru	35	35 (100)	-	2 (5.7)	-	2 (5.7)	2 (5.7)
Sucuk Hamuru	50	50 (100)	11 (22.0)	1 (2.0)	-	11 (22.0)	12 (24)
Sucuk	125	125 (100)	58 (46.4)	10 (8.0)	-	38 (30.4)	48 (38.4)
Salam	75	75 (100)	3 (4.0)	-	-	3 (4.0)	3 (4.0)
Sosis	60	60 (100)	8 (13.3)	-	-	8 (13.3)	8 (13.3)
Toplam	410	410	85	14	-	67	79

Tartışma

Etlerde ve et ürünlerinde kullanılan et türlerinin belirlenmesi, söz konusu gıda maddelerinin hem ilgili gıda standartlarına uygunluğu, hem de tüketici haklarının korunması bakımından önem taşımaktadır (24).

Amerika'da yapılan bir araştırmada çiğ kıymaların % 15.9'unun hileli olduğu bildirilmiştir (15). Ankara'da yapılan araştırmada ise 9 adet parça et ile 16 adet kıyma köfte örneğinin, sırasıyla % 22.2 (2 adet) ve % 6.3'ünün (1 adet) farklı et türü içerdiği saptanmıştır (6). Silvestre (26) çiğ kıyma ve hamburger numunelerinin sırasıyla % 46.4 ve % 83.3 düzeyinde bir veya birden fazla türe ait et içerdiğini belirlemiştir. Konu ile ilgili yapılan diğer bir araştırmada Alabama (Amerika)'da satışa sunulan domuz kıyması örneklerinin % 90'ında hileli olarak kanatlı eti tespit edilmiştir (14). Buna karşın Macedo-Silva ve ark. (19) Brezilya'da piyasadan temin edilen 18 adet sığır, 18 adet tavuk ve 3 adet domuz hamburger örneğinde ELISA yöntemi ile tür tayini yapmışlar hiçbir örnekte farklı bir et türü saptamamışlardır. Buna göre çiğ et ve et karışımlarında tür tespitine yönelik araştırmalar ülkelere göre önemli değişimler gösterebilmekte, bazı çalışmalarda farklı et türü oranı % 80-90 düzeyine ulaşırken bazı çalışmalarda bu düzey % 6.3 ve hatta sıfır olabilmektedir. Bu durum örneklerin temin edildiği satış noktalarının bulunduğu mevki ve örneklerin satış fiyatları, aynı zamanda satışa sunulan noktalara yapılan denetimlerin yoğunluğu ile ilişkili olabilir.

Isıl işlem görmüş et ürünleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, Hsieh ve ark. (15) Amerika'da (Florida) incelemiş oldukları domuz sosis ürünlerinin % 22.5'inin hileli olduğunu bildirmiş, Silvestre (26) ise analiz ettiği sosis numunelerinin % 63.6'sında bir veya daha fazla farklı türe ait olduğunu saptamıştır. Alabama'da yapılan araştırmada domuz sosis örneklerinin % 54'üne kanatlı eti karıştırıldığı tespit edilmiştir (14). Konu ile ilgili diğer bir çalışmada araştırmacılar, incelemiş oldukları sucuk örneklerinin % 39.2'sinin, salam örneklerinin % 35.7'sinin ve sosis örneklerinin ise % 27.2'sinin farklı et türü içerdiğini saptamışlardır (6).

Çalışmamızda etikete göre farklılık gösteren numunelerde yabancı et türü olarak en çok tavuk etinin kullanıldığı görülmektedir. Benzer sonuç diğer araştırmacılar tarafından da bildirilmektedir (6, 14, 15). Memeli hayvan etlerine göre daha düşük düzeyde kolesterol ve doymuş yağ içeren kanatlı etlerine rağbet tüm dünyada artmaktadır. Buna bağlı olarak elde edilmesi diğer hayvanlara göre daha ekonomik ve kolay olan kanatlı etlerinde üretim fazlası oluşabilmekte, kemiksiz hale getirilmiş kanatlı etlerinin parça ya da kıyılmış memeli hayvan etlerine ilave olasılığı yükselmektedir (25).

ELISA tekniği ile türe özgü monoklonal ya da poliklonal antikorların kullanımına bağlı olarak çapraz reaksiyon gibi nedenlerden ötürü farklı sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Poliklonal antikorlar hem albumin gibi kan proteinlerini (28) hem de kasta bulunan çözünebilir proteinleri (20) yakalama eğilimindedir. Bununla birlikte araştırmacılar poliklonal antikorların değişken afiniteye sahip olduklarını ve diğer türlerden olabilecek çapraz reaksiyon ihtimalinin yüksek olduğunu (11) ve çapraz reaksiyonu önlemek için ilave saflaştırma işlemine ihtiyaç göstermelerini (1, 16, 28) önemli dezavantaj olarak bildirmektedir. Buna karşın günümüzde monoklonal antikorların tür tespitinde kullanılması daha çok rağbet görmektedir (12, 21). Chen ve ark. (9) monoklonal antikor indirekt ELISA yöntemi kullanarak çiğ ve ısıl işlemi görmüş tavuk ürünlerinden domuz eti varlığı tespit düzeyini %1 olarak bildirmişlerdir. Aynı

araştırmacılar monoklonal antikorların bağlanma özellikleri ile her ELISA yönteminde optimize edilebileceklerini ve düşük tespit limitleri ile güvenilir ve en iyi düzeyde analizin gerçekleştirilebileceğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde araştırmamızda monoklonal sandviç ELISA yöntemi kullanılmıştır. Çiğ et ve et ürünleri tespitinin yapıldığı kitlerde sığır, domuz ve kanatlılar için tespit limiti < %1 olarak bildirilmektedir (4).

Sonuç olarak çiğ et ve ısıl işlemi görmüş et ürünlerinde tür tayini, başta tüketiciler olmak üzere birçok açıdan büyük önem taşımaktadır. Uygun olmayan ürünlerin tespiti için kontrollerin sürekli ve güncel metodlar ile hızlı bir biçimde gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla immunoenzimatik ve moleküler yöntemler ön plana çıkmakta; pratik, hızlı sonuç veren, hassas ve uygulama için profesyonel ekibe ihtiyaç göstermemesinden ötürü ELISA yöntemi rutin analizlerde tercih sebebi olarak görülmektedir.

Kaynaklar

1. **Andrews, C.D., Berger, R.G., Mageau, R.P., Schwab, B., Johnson, R.W.:** Detection of beef, sheep, deer, and horse meat in cooked meat products by enzyme-linked immunosorbent assay. J. AOAC Int., 1992; 75: 572-576.
2. **Anonymous:** Türk Standardları Enstitüsü (TS) 12191. Et ve Et mamulleri-kullanılan etin türlerinin tespiti-ELISA metodu, Mart 1997, 3 sayfa.
3. **Anonymous:** Türk Gıda Kodeksi. Taze Et, hazırlanmış Et ve Hazırlanmış et karışımları Tebliği. Tebliğ No: 2000/5. Resmi Gazete Tarihi: 10.02.2000.
4. **Anonymous:** Biokits (cooked) species identification kits. Tepnel biosystems. 2005. (<http://www.tepnel.com>).
5. **Aslan, A., Ilhak, O.I., Calicioglu, M.:** Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. Meat Sci., 2006; 72: 326-330.
6. **Ayaz, Y., Ayaz, N.D., Erol, İ.:** ELISA tekniği ile et ve et ürünlerinde tür tayini. I. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, Ankara Üniversitesi Basımevi, 2004; 355-362.
7. **Berger, R.G., Mageau, R.P., Scwab, B., Johnston, R.W.:** Detection of poultry and pork in cooked and canned meat foods by enzyme-linked immunosorbent assays. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1988, 71: 406-409.
8. **Billett, E.E., Bevan, R., Scanlon, B., Pickering, K., Gibbons, B.:** The use of a poultry specific murine monoclonal antibody directed to the insoluble muscle protein desmin in meat speciation. J. Sci. Food Agric., 1996; 70: 396-404.

9. **Chen, F.C., Hsieh, Y.H.P., Bridgman, R.C.:** Monoclonal antibodies to porcine thermal-stable muscle protein for detection of pork in raw and cooked meats. *J. Food Sci.*, 1998; 63: 201-205.
10. **Chikuni, K., Ozutsumi, K., Koishikawa, T., Kato, S.:** Species identification of cooked meats by DNA hybridization assay. *Meat Sci.*, 1990; 27: 119-128.
11. **Dincer, B., Spearow, J.L., Cassens, R.G., Greaser, M.L.:** The effects of curing and cooking on the detection of species origin of meat products by competitive and indirect ELISA techniques. *Meat Sci.*, 1987; 20: 253-265.
12. **Garcia, T., Martin, R., Morales, P., Haza, A.I., Anguita, G., Gonzales, I., Sanz, B., Hernandez, P.E.:** Production of a horse-specific monoclonal antibody and detection of horse meat in raw mixtures by an indirect ELISA. *J. Sci. Food Agric.*, 1994; 66: 411-415.
13. **Hsieh, Y.H.P., Chen, F.C., Sheu, S.C.:** AAES research developing simple, inexpensive tests for meat products. *Highlights of Agricultural Research*, 1997; 44(2): Summer.
14. **Hsieh, Y.H.P., Johnson, M.A., Wetzstein, C.J., Gren, N.R.:** Detection of species adulteration in pork products using agar-gel immunodiffusion and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Food Quality*, 1996; 19: 1-13.
15. **Hsieh, Y.H.P., Woodward, B.B., Ho, S.H.:** Detection of species substitution in raw and cooked meats using immunoassays. *J. Food Protect.*, 1995; 58: 555-559.
16. **Kang'ehete, E.K., Jones, S.J., Patterson, R.L.S.:** Identification of the species origin of fresh meat using ELISA procedure. *Meat Sci.*, 1982 7(3): 229-240.
17. **Kim, H., Shelef, L.A.:** Characterization and identification of raw beef, pork, chicken and turkey meats by electrophoretic patterns of their sarcoplasmic proteins. *J. Food Sci.*, 1986; 51(31): 731-735.
18. **Kohler, G., Milstein, C.:** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495-497.
19. **Macedo-Silva, A., Barbosa, S.F.C., Alkmin, M.G.A., Vaz, A.J., Shimokomaki, V., Tenuta-Filho, A.:** Hamburger meat identification by dot-ELISA. *Meat Sci.*, 2000; 56: 189-192.
20. **Martin, R., Azcona, J.I., Garcia, T., Hernandez, P.E., Sanz, B.:** Sandwich ELISA for detection of horse meat in raw meat mixtures using antisera to muscle soluble proteins. *Meat Sci.*, 1988b; 30: 23-31.
21. **Martin, R., Wardale, R.J., Jones, S.J., Hernandez, P.E., Patterson, R.L.S.:** Monoclonal antibody sandwich ELISA for the potential detection of chicken meat in mixtures of raw beef and pork. *Meat Sci.*, 1991; 30: 23-31.

- 52 Uğur GÜLŞEN – Ali AYDIN – Banu BİLGE OVALI – Yasemin COŞKUN
22. **Mottar, J.:** Immunochemical techniques in the analysis of foodstuffs. Belg. J. Food Chem. and Biotechnol., 1989; 44: 115–124.
23. **Samarajeewa, U., Wei, C.I., Huang, T.S., Marshall, M.R.:** Application of immunoassay in the food industry. Critical Rev. Food Sci. and Nutrition. 1991; 29: 403-434.
24. **Shericar, A.T., Karkare, U.D., Khot, J. B., Jayaro, B.M., Bhilegaonkar, K.N.:** Studies on thermostable antigens, production of species specific antiadrenal sera and comparison of immunological techniques in meat speciation. Meat Sci., 1993; 33: 121-136.
25. **Sheu, S.C., Hsieh, Y.H.P.:** Production and partial characterization of monoclonal antibodies spesific to cooked poultry meat. Meat Sci., 1998; 50: 315-326.
26. **Silvestre, M.H.:** La calidad de carnes frescas picadas de bovino, ovino, porcino y similares. Alimentaria, 1995; 33: 83-85.
27. **Uğur, M., Nazh, B., Bostan, K.:** Gıda Hijyeni, İstanbul, Teknik Yayınları, 2001, 186-188.
28. **Whittaker, R.G., Spencer, T.L., Copland, J.W.:** An enzyme-linked immunosorbent assay for species identification of raw meat. J. Sci. Food Agric., 1983; 34: 1143-1148.