

Bazı Ticari Kitler Kullanılarak Et Ürünlerindeki Tavuk ve Sığır Eti Miktarının Belirlenmesi

Muhammet KAYA*¹, Ayşegül ARIKAN ASAN², Şafak BAŞIAÇIK KARAKOÇ³

¹Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, 26160, Eskişehir
(ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6474-121X>)

²TOB, Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, 16036, Bursa
(ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2664-4635>)

³TOB, Ulusal Gıda Referans Laboratuvar Müdürlüğü, 06170, Ankara
(ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9707-4097>)

(Alınış / Received: 10.07.2018, Kabul / Accepted: 04.03.2019, Online Yayınlanma / Published Online: 17.04.2019)

Anahtar Kelimeler

Et ürünleri,
Sığır eti,
Tavuk eti,
Miktar tayini,
Real time PCR

Özet: Hayvansal gıda kaynakları insan beslenmesinde hayati önem taşımaktadır. Dengeli bir diyet, yeterli ve kaliteli gıda maddeleri içermelidir. Uygun etiketleme insan sağlığı için önemli olduğu kadar et endüstrisinde adil ticaret için de önemlidir. DNA, fiziksel ve kimyasal gıda işleme tekniklerinden etkilenmediği için, et ürünlerini oluşturan içeriğin kaynağı olan türleri ve oranlarını belirlemek amacıyla DNA tabanlı kitler üretilmiştir. Çalışmamızın amacı, ticari kitlerin Türkiye'deki et ürünleri tebliğine uygunluğunu incelemek ve et ürünlerindeki tavuk ve sığır eti miktarını belirlemesini araştırmaktır. Çalışmamızda et ürünlerindeki tavuk ve sığır eti miktarının belirlemek için TaqMan prob kullanan Real Time PCR kitleri kullanılmıştır. Çalışma sonunda incelenen kitlerin RT-PCR reaksiyonlarının eğim ve korelasyon katsayısı kriterleri uygun bulunmuş ancak et ürünlerindeki çeşitli oranlardaki tavuk ve sığır etlerinin kantitatif tayinleri yeterli bulunmamıştır.

Determination The Proportion of Chicken and Beef In Meat Products Using Some Commercial Kits

Keywords

Meat products,
Beef,
Chicken meat,
Quantitation,
Real time PCR

Abstract: Animal food sources are vital to human nutrition. A balanced diet should contain adequate and high-quality food items. Proper labeling is important for human health as well as for fair trade in meat industry. Since DNA is not affected by physical and chemical food processing techniques, DNA-based kits are produced to determine species and their proportions in meat products. The aim of our study was to examine the suitability of commercially available kits for Turkey notified meat products and to investigate proportion of chicken and beef in meat products. Real Time PCR kits using TaqMan probe were used to determine the amount of chicken and beef in meat products. As a result of the study, the slope and correlation coefficient criteria of the RT-PCR reactions of the kit were appropriate, but sensitivity of quantitative determinations of different chicken and beef meat products were not sufficient.

1. Giriş

İnsan beslenmesinde hayvansal besin kaynakları çok önemlidir. Dengeli bir diyet için yeterli ve kaliteli yiyecekler kullanılmalıdır. Metabolik bazı özellikleri (alerjik vb.) ve dini inançları gereği belirli gıdaların tüketimine özen gösteren insanlar için doğru ve yeterli etiketleme çok önemlidir. Uygun etiketleme sadece sağlık açısından değil, aynı zamanda et

endüstrisinde adil ticarete yardımcı olmaktadır. Üreticiler bazı et türlerinin ucuz olmasından dolayı ürünün içerisine, etikette belirtilen türlerden farklı et ve/veya et ürünleri, etikette belirtilen orandan daha az miktarda et tipleri ilave ederek tağşiş yapmaktadırlar. Türkiye'de kırmızı ette olduğu gibi bazı et ürünlerinin pahalı olduğu durumlarda tağşiş yapılması daha da önem kazanmaktadır.

Et ve et ürünleri içerisindeki türlerin tespiti DNA'ya dayalı yöntemlerden oligonükleotit prob [1], PCR (Polymerase Chain Reaction - Polimeraz Zincir Reaksiyonu) [2], çoklu PCR [2], PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism - Kesilmiş Parça Uzunluğu Polimorfizmi) [3, 4], dizi analizi [5], RT (Real Time- Gerçek Zamanlı) PCR [6, 7, 8], mikroçip [9] ve proteine dayalı yöntemlerden olan HP-LC (High Performance Liquid Chromatography - Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) [10], iso-elektroforetik teknik [11], ELISA (Enzyme linked immunosorbent assays - Enzime Bağlı Bağışıklık Analizi) [12], NIR (Near infrared hyperspectral imaging - Yakın kızıl ötesi hiperspektral görüntüleme) [13], FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy - Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) [14] gibi teknikler kullanılarak yapılmaktadır. DNA'nın çoğu koşulda proteine kıyasla daha kararlı olmasından dolayı proteine dayalı yöntemlere göre DNA'ya dayalı yöntemler daha çok tercih edilmektedir [15, 16].

Et ürünlerinde türün tanımlanması önemli olmakla beraber karışım üründe bir et türünün ne oranda katıldığına tespitinin yapılması da etiketlere uygunluk açısından önemlidir. Proteine dayalı tekniklerden olan ELISA [17, 18] ve HPLC [19] yöntemleri kullanarak karışım ürünlerdeki miktarlar belirlenebilmesine rağmen et ürünlerindeki karışımların miktarlarını belirlemek için yapılan çalışmalar genellikle DNA'ya dayalı yöntemlerden Taq-Man prob kullanarak yapılan RT-PCR yöntemi tercih edilmektedir [20]. Literatürde miktar tayini çalışmalarında hayvan türü ve genel için tek kopya genler veya genomdaki tekrar dizilerinin kullanıldığı bildirilmiştir [21]. Bunlardan bazıları Mitochondrial tRNA [22], Mitochondrial rRNA [23], Mitochondrial cytochrome b [7, 24], Transferrin [25], Myostatin [26] ve Mitochondrial D-loop [27] dizileri hedeflenerek RT-PCR ile miktar tayini çalışmaları yürütülmüştür.

RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan miktar tayini analizlerinde türe ve hayvana özgü DNA dizilerini çoğaltıp miktarını tespit edebilmek için iki PCR sistemine ve onlara ait standart eğrilere ihtiyaç duyulmaktadır. Standart eğriler genellikle $DNA_{tür}/DNA_{genel}$ olarak hazırlanmış miktarı bilinen DNA karışımlarından yapılmaktadır [20]. RT-PCR çalışmalarında elde edilen standart eğriler için kabul kriterleri tespit edilmiştir. Bunlar; PCR verimi (R^2) $\geq 0,98$, PCR slope değeri; $-3,1 \geq$ eğim $\geq -3,6$ ve çalışmada kullanılan paraleller arası RSD \leq % 30 olmasıdır [28].

Karışım et ürünlerindeki oranların belirlenmesi ve tüketicilerin korunmasına yönelik olarak bazı firmaların et ürünlerindeki miktarları belirleyebilen ticari kitleri piyasada bulunmaktadır. Araştırmamızda piyasadaki bazı ticari kitler kullanılarak et ve et ürünleri numunelerinde et türünün (tavuk ve sığır) ağırlıkça yüzde miktarının belirlenebilme olasılığı araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyal

Çalışmamız Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı'nda (UGRL) yürütülmüştür. Araştırmamız için ticari bir işletmeye farklı oranlarda tavuk-sığır eti karışımı içeren sucuk yaptırılmıştır. Bu örneklerin bazıları sadece kas dokusu içerirken (Tablo-1; 1-6), bazıları ise diğer dokuları içermektedir (Tablo-1; 7-10). Örneklerin içerik oranları ve kodları Tablo 1'de verilmiştir. Ayrıca %100 sığır eti ve %50 sığır + %50 tavuk eti örnekleri laboratuvar ortamında hazırlanarak bazı çalışmalarda analiz edilmiştir.

Tablo1. Analizler için kullanılan örnekler ve içerikleri

Kod	% Sığır (kg/kg)	% Tavuk (kg/kg)	% Tavuk karaciğer (kg/kg)	% Tavuk taşlık (kg/kg)	% Tavuk derisi (kg/kg)	% Sığır Dalak (kg/kg)
1	100	0	0	0	0	0
2	90	10	0	0	0	0
3	80	20	0	0	0	0
4	70	30	0	0	0	0
5	60	40	0	0	0	0
6	0	100	0	0	0	0
7	70	10	5	5	5	5
8	55	15	8	10	7	5
9	45	20	8	15	10	2
10	40	25	10	15	3	7

2.2. DNA Saflaştırma

Ticari kit ile (R-Biofarm-SureFood PREP Animal, Kat. No: S1003) her numuneden ikişer adet (A ve B) DNA ekstraksiyonu yapıldı. Saflaştırılan DNA örnekleri temizleme kolonları (Eurofins-GeneScan DNA Cleaning Columns, Kat. No: 5224700305) kullanılarak olası PCR inhibitör maddelerinden arındırılmıştır. Elde edilen DNA'ların saflıkları ve miktarları spektrofotometre (Thermo Scientifici NanoDrop 1000) ile ölçülerek miktarları PCR analizine alınmadan önce 50 ng/ μ l olarak ayarlanmıştır.

2.3. RT-PCR Çalışmaları

PCR analizlerinde tavuk eti miktar tayini için; ticari R-Biofarm SureFood Animal Quant Chicken (Kat. No: S1014) kit, sığır miktar tayini için; R-Biofarm SureFood Animal Quant Beef (Kat. No: S1010) ve GeneScan DAnimal BosQuant kitleri kullanılmıştır. RT-PCR analizlerinde ticari kitlerin talimatlarına uyulmuş, her çalışmada her kite özgü amplifikasyon kontrol (no template kontrol) ve pozitif kontrol kullanılmıştır. RT-PCR çalışmalarında her bir örnekten dört paralel kullanılmıştır (Her bir örnekten iki adet ekstraksiyon yapılarak cihaza her biri ikişer kez yüklenmiştir). Örnek sonuçlarının %hata değeri (bias) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır [28].

$$\% \text{ Hata} = \left(\frac{\text{Bulunan değer} - \text{Gerçek değer}}{\text{Gerçek değer}} \right) \times 100 \quad (1)$$

2.3.1. SureFood Animal Quant Chicken

Et ve et ürünlerinde tavuk DNA'sının hayvan DNA'sına oranı (DNA/DNA) olarak tespit edilmektedir. Kitin LOD (Limit of Detection- Tespit eşik değeri) ≤ 5 kopya, LOQ (Limit of Quantitation-Miktar tayini sınırı) %0,1 olarak (DNA konsantrasyonuna bağlı olarak eğer 50000 referans gen varsa) bildirilmiştir. Kit iki RT-PCR sistemine özgü (Gallus-tavuk geni ve Ref-hayvan geni) çalışmaktadır. Her iki sistem için ayrı standart eğri çizilmektedir. Standart eğri için kullanılan kalibrantlar tek bir standarttan seri dilüsyonlar halinde (1/10) hazırlanmaktadır. Numuneler kullanım öncesi TE (Tris-EDTA) tampon ile 1/10 seyreltilmektedir. Bilinmeyen numunelerin Ct'lerine göre bu eğrilerden kopya sayıları elde edilmektedir. Numunelerin değerleri hesaplanırken düzeltme faktörü (Pozitif kontrol temel alınarak) (k değeri)'de kullanılmaktadır.

2.3.2. SureFood Animal Quant Beef

Et ve et ürünlerinde sığır DNA'sının hayvan DNA'sına oranı (ağırlık/ağırlık) olarak tespit edilmektedir. Kitin LOD ≤ 5 kopya, LOQ %0,04 olarak (DNA konsantrasyonuna bağlı olarak eğer 50000 referans gen varsa) bildirilmiştir. Kit iki RT-PCR sistemine özgü (Bos-sığır geni ve Ref-hayvan geni) çalışmaktadır. Her iki sistem için ayrı standart eğri çizilmektedir. Standart eğri için kullanılan kalibrantlar tek bir standarttan seri dilüsyonlar halinde (1/10) hazırlanmaktadır. Numuneler kullanım öncesi TE tampon ile 1/10 seyreltilmektedir. Bilinmeyen numunelerin Ct'lerine göre bu eğrilerden kopya sayıları elde edilmektedir. Numunelerin değerleri hesaplanırken düzeltme faktörü (Pozitif kontrol temel alınarak) (k değeri)'de kullanılmaktadır.

2.3.3. GeneScan DNAnimal BOSQuant

Et ve et ürünlerinde sığır DNA'sının hayvan DNA'sına oranı tespit edilmektedir. İki sistem (Bovine-sığır geni ve Animal-hayvan geni) çalışılmaktadır. Kitin LOD 1 kopya, LOQ 10 kopya olarak bildirilmiştir. Her iki sistem için ayrı standart eğri çizilmektedir. Standart eğri için kullanılan kalibrantlar ayrı ayrı hazır olarak kitte bulunmaktadır. Bilinmeyen numunelerin Ct'lerine göre bu eğrilerden kopya sayıları elde edilmektedir. Her bir numune DNAsı 1/5 ve 1/ 20 seyreltilerek RT-PCR'da kullanılmaktadır. Her ekstrakt ve dilüsyonların % sığır miktarları hesaplandıktan sonra bu dört paralelin sonucunun ortalamaları alınarak sonuç hesaplanmaktadır.

3. Bulgular

RT-PCR analizlerinde ticari kitlerin talimatlarına uyulmuş, her çalışmada her kite özgü amplifikasyon kontrol (no template kontrol) ve pozitif kontrol kullanılmıştır. Her bir örnekten iki adet DNA

ekstraksiyonu yapılarak, RT-PCR çalışmalarında cihaza her bir ekstraksiyon örneği ikişer kez verilerek toplamda bir örnekten dört paralel kullanılmıştır. Kitlerin talimatlarında dört paralelin ortalaması sonuç olarak verilir denirken araştırmamızda sonuçları daha net göstermesi için ortalama değerler alınmadan her bir paralel için ayrı ayrı gösterilmiştir.

3.1. Tavuk eti miktar tayini sonuçları

Ticari kitin talimatlarına uygun olarak hazırlanan kalibrantlar ile yapılan RT-PCR çalışmalarından elde edilen standart eğrilerin değerleri Tablo 2'de, çalışma sonuçları ve tespit edilen numune değerleri Tablo 3'de verilmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde özellikle bazı örnekler için paraleller arası amplifikasyon eğrilerinde büyük farklılıklar görülmüştür (Cihaz çıktıkları verilmemiştir). RT-PCR çalışmalarındaki büyüme eğrilerine dayanarak uygun olmayan paraleller çıkarılmıştır. Numunelerin % değerleri hesaplanırken pozitif kontrol dikkate alınarak düzeltme faktörü (k değeri) kullanılmıştır.

Tablo 2. Surefood tavuk miktar tayini standart eğri değerleri

	Gallus sistemi		Ref sistemi	
	R ²	Eğim	R ²	Eğim
I. Çalışma	1,000	-3,324	0,998	-3,297
II. Çalışma	1,000	-3,225	0,999	-3,512

Tablo 3. Surefood tavuk miktar tayini sonuçları

Kod	Gerçek değer	% Tavuk (K değeri ile düzeltilmiş sonuçlar)			
		I. Çalışma		II. Çalışma	
		% Tavuk Miktarı	% hata	% Tavuk Miktarı	% hata
PC	100	100	0,00	100,00	0,00
1A	0	2,3318		2,38	
1B	0	20,89		24,79	
2A	10	23,789	137,89	34,80	247,96
2B	10	24,721	147,21	29,67	196,75
3A	20	28,713	43,57	35,66	78,30
3B	20	20,476	2,38	30,03	50,17
4A	30	49,61	65,37	74,77	149,23
4B	30	62,453	108,18	79,91	166,38
5A	40	67,877	69,69	99,95	149,88
5B	40	88,052	120,13	119,96	199,90
6A	100	148,31	48,31	254,39	154,39
6B	100	132,41	32,41	215,81	115,81
7A	25	51,812	107,25	68,61	174,45
7B	25	49,765	99,06	72,55	190,18
8A	40	58,781	46,95	95,96	139,90
8B	40			107,08	167,69
9A	53	84,354	59,16	137,73	159,87
9B	53	74,278	40,15	154,12	190,80
10A	53	81,582	53,93	131,22	147,59
10B	53	79,669	50,32	134,83	154,39

3.2. Sığır Eti Miktar Tayini Sonuçları

3.2.1 Surefood Kiti Sığır Miktar Tayini

Ticari kitin talimatlarına uygun olarak hazırlanan kalibrantlar ile yapılan RT-PCR çalışmalarından elde edilen standart eğrilerin değerleri Tablo 4'de, çalışma sonuçları ve bulunan miktarlar Tablo 5'de verilmiştir.

Numunelerin % değerleri hesaplanırken pozitif kontrol dikkate alınarak düzeltme faktörü (k değeri) kullanılmıştır. %100 tavuk içeren sucuk numunesinin %0,14-0,33 civarında sığır eti içerdiği tespit edilmiştir. Bazı numunelerde (2, 4 ve 5) ekstraktlar arası bulunan sonuçlar arasındaki fark yüksek çıkmıştır. %100 sığır eti içeren sucuk sonuçları kabul sınırları içinde olmasına karşın farklı dokular içeren örneklerin sonuçları normal değerlerden oldukça düşük tespit edilmiştir.

Tablo 4. Surefood sığır miktar tayini standart eğri değerleri

	Bos sistemi		Ref sistemi	
	R ²	Eğim	R ²	Eğim
I. Çalışma	0,994	-3,448	0,999	-3,335
II. Çalışma	0,997	-3,557	0,997	-3,452

Tablo 5. Surefood sığır miktar tayini sonuçları

Kod	Gerçek değer	% Sığır (K değeri ile düzeltilmiş sonuç)			
		I.		II.	
		Çalışma	% hata	Çalışma	% hata
PC	100	100,00	0,00	100,00	0,00
1A	100	67,45	-32,55	86,64	-13,36
1B		58,08	-41,92	79,20	-20,80
2A	90	25,96	-71,15	40,84	-54,62
2B		88,71	-1,43	106,32	18,13
3A	80	66,39	-17,01	93,34	16,68
3B		93,28	16,59	117,83	47,29
4A	70	64,64	-7,65	76,09	8,70
4B		17,28	-75,31	31,22	-55,40
5A	60	30,30	-49,50	36,90	-38,51
5B		21,47	-64,21	53,63	-10,62
6A	0	0,19		0,33	
6B		0,14		0,27	
7A	75	25,92	-65,44	40,21	-46,38
7B		30,15	-59,80	48,04	-35,94
8A	60	19,00	-68,34	24,33	-59,45
9A		10,45	-77,77	14,13	-69,93
9B	47	13,92	-70,39	20,25	-56,92
10A		27,56	-41,36	30,91	-34,24
10B	47	20,25	-56,92	29,45	-37,34

3.2.2 Genescan Kiti Sığır Miktar Tayini

Ticari kitin talimatlarına uygun olarak hazırlanan kalibrantlar ile yapılan RT-PCR çalışmalarından elde edilen standart eğrilerin değerleri Tablo 6'de, çalışma sonuçları ve bulunan miktarlar Tablo 7'de verilmiştir. Genescan sığır kit ile yapılan ilk çalışmada (I. Çalışma) yalnızca iki numune çalışılmıştır. Bu ilk çalışmada standart eğri istenildiği gibi çıkmıştır (Tablo 6). İkinci çalışmada standart eğri istenildiği gibi çıktığı ve pozitif kontrolde gerçek değere çok yakın bulunduğu halde numune paralelleri arasında uyum görülmediğinden PCR inhibitörlerinin varlığı araştırılmıştır. Çalışma numunelerinin PCR inhibitörü içerip/içermediklerini belirlemek için ¼, 1/16, 1/64 ve 1/256 seyrelterek RT-PCR yapılmıştır, seyreltilen paraleller arasında 2 Ct fark görüldüğünden numunelerde PCR inhibitörü olmadığı saptanmıştır [28] (Cihaz çıktıları verilmemiştir). Bu nedenle bir sonraki çalışma (III. çalışma) numuneler 1/64 ve 1/256 seyreltilerek yapılmıştır. Tablo 7'de verildiği

üzere I. çalışma hatalara bakıldığında oldukça düşük hata değerleri çıktığı görülmektedir. Seyreltmeler ve ekstraktlar arası farklar az ve gerçek değerlere oldukça yakın bulunmuştur. III. çalışmaya bakıldığında artık seyreltmeler arası döngü farkları beklenildiği gibi çıktığından aynı numuneye ait hem ekstraktlar hem de seyreltmeler birbirine yakın çıkmıştır. Ancak numune sonuçlarının % hatalarının yüksek olduğu görülmüştür. Gerçek değerlerinden oldukça düşük sonuçlar elde edilmiştir. %100 sığır eti ile yapılan sucuk %30-40 civarında (yalnızca birisi %90) tespit edilmiştir. Ayrıca karışım ürün olmayan sadece %100 sığır etinden laboratuvarımızda hazırlanan numune ise %47-66 olarak bulunurken, %50 tavuk eti ile karıştırılmış sığır eti numunesi ise %24-28 arasında tespit edilmiştir.

Tablo 6. Genescan sığır miktar tayini standart eğri değerleri

	Bovine Sistemi		Hayvan Sistemi	
	R ²	Eğim	R ²	Eğim
I. Çalışma	0,991	-3,187	0,997	-3,26
II. Çalışma	0,998	-3,345	0,999	-3,396
III. Çalışma	0,992	-3,079	0,994	-3,192

4. Tartışma ve Sonuç

Karışım et ürünlerindeki oranların belirlenmesi ve tüketicilerin korunmasına yönelik etiketlere uygunluğunun ticari kitler yardımı ile incelendiği çalışmamızda hazırladığımız sucuk numunelerinde et türünün (tavuk ve sığır) ağırlıkça yüzde miktarının belirlenebilme olasılığı araştırılmıştır. Ticari kitler kullanarak karışım et örneklerindeki miktarları belirlemek için yapılan RT-PCR çalışmalarının standart eğrilerine ait değerler ilgili tablolarda verilmiş, bu değerler kabul kriterlerinin sınırları içinde bulunmuştur [28]. Standart eğriler kullanılarak karışımı oluşturan türlerin miktarları hesaplanarak sonuçlar ilgili tablolarda gösterilmiştir. Araştırmamızda kullanılan Surefood tavuk ve sığır eti miktarı belirleme kitleri sonuçları hesaplarken kit içerisinde bulunan ve oranı bilinen pozitif kontrol yardımı numunelerin sonucunu düzelterek vermektedir. GeneScan sığır eti miktar tayini kiti ise düzeltme faktörü kullanılmakta paralellerin ortalamasını direk sonuç olarak vermektedir.

Çalışmada kullanılan ticari kitler örneklerden elde edilen DNA'larda PCR inhibitörlerin etkisini azaltmak veya gidermek için numunelerin seyreltilerek RT-PCR'da kullanılmasını önermektedirler. Örnekleri Surefood ticari kitleri 1/10, GeneScan kiti ise 1/5 ve 1/20 seyreltilerek RT-PCR kullanılmasını ve paralellerin ortalamaları alınarak sonuçların verilmesini önermektedir. Yapılan çalışmada PCR inhibitörleri gidermek için örnek DNA'ları ticari temizleme kitleri ile işlemden geçirildikten sonra PCR inhibitör testi yapılmıştır. Literatürde [28] önerilen seyreltme testi sonucunda örneklerde inhibitörün bulunmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 7. Genescan kiti sığır miktar tayini sonuçları

Kod	Gerçek Seyreltme I.			II.			Seyreltme Oranı	III. Çalışma	
	Değer	Oranı	Çalışma	% hata	Çalışma	% hata		Çalışma	% hata
PC	1		1,25	24,98	1,11	11,15		2,53	-152,83
1A	100	1/5	79,99	-20,01	7,84	-92,16	1/64	90,87	9,13
		1/20	78,89	-21,11	75,95	-24,05	1/256	34,44	65,56
1B	100	1/5	78,55	-21,45	1,37	-98,63	1/64	30,80	69,20
		1/20	86,55	-13,45	34,57	-65,43	1/256	44,80	55,20
2A	90						1/64	31,53	64,97
							1/256	26,66	70,38
2B	90						1/64	34,30	61,88
							1/256	37,01	58,87
4A	70	1/5	63,22	-9,68			1/64	27,76	60,34
		1/20	68,21	-2,55			1/256	27,01	61,41
4B	70	1/5	88,50	26,42			1/64	35,26	49,63
		1/20	70,11	0,15			1/256	28,05	59,93
5A	60	1/5			10,32	-82,79	1/64	13,27	77,88
		1/20			48,76	-18,73	1/256	23,84	60,26
5B	60	1/5			9,51	-84,15	1/64	17,95	70,09
		1/20			43,12	-28,14	1/256	15,81	73,64
6A	0	1/5	0,02				1/64	0,03	
		1/20	0,08				1/256	0,08	
6B	0						1/64	0,11	
							1/256	0,17	
7A	75						1/64	27,41	63,46
							1/256	27,64	63,14
7B	75						1/64	22,19	70,41
							1/256	41,45	44,73
9A	47						1/64	11,24	76,10
							1/256	7,08	84,95
9B	47						1/64	6,98	85,15
							1/256	4,25	90,95

Yapılan çalışmalar sonucunda analiz değerleri incelendiğinde (Tablo 3, 5 ve 7) kullanılan üç ticari kitin (SureFood Animal Quant Chicken, SureFood Animal Quant Beef ve GeneScan DNAnimal BOSQuant) RT-PCR çalışmaları sonucunda negatif çıkması beklenen numunelerde düşük oranlarda pozitiflik saptanmıştır. Bu durum sucuk imalatı sırasında bir bulaşma olabileceği gibi negatif bir numune çalışılan ticari kitin yanlış pozitif sonuç verebileceği dikkate alınmalıdır.

Tavuk eti miktarı belirleme kiti ile hesaplanan sonuçların hataları, sığır eti belirleme kitleriyle hesaplanan sonuçların hatalarının 2-3 katı olmuştur. Karışım et ürünlerindeki et içeriklerini ağırlık/ağırlık olarak belirleyen DNA veya proteine dayalı yöntemlerle ilgili bazı problemler bildirilmektedir [20]. Hazırlanan sucuk numuneleri piyasadaki diğer et ürünleri gibi ağırlık/ağırlık olarak hazırlanmış numunelerdir. Kullanılan kitler DNA/DNA oranını saptamaktadırlar. Halbuki hazırlanan sucuk numuneleri ve et numuneleri ağırlıkça yüzdelerdir. Bu nedenle farklı dokuların katıldığı karışım örneklerin miktarları doğru olarak ölçülememektedir. Araştırmamızda tavuk % DNA sonuçları ağırlıkça yüzdeden fazla bulunmaktayken, sığır % DNA sonuçları ağırlıkça yüzdeden düşük olarak (değerinin yaklaşık yarısı kadar) tespit edilmiştir. Araştırmamızda da görüldüğü üzere DNA/DNA hazırlanmış teknikler kullanarak

ağırlık/ağırlık şeklinde hazırlanan numunelerin içerik oranlarını doğru olarak belirlemek mümkün olmamaktadır. Literatürde bildirilen çalışmaların çoğunluğu ve kullanılan kitler ağırlık/ağırlık kantifikasyonu yapmaktadır. Bazı araştırmacılar ise ağırlık/ağırlık kantifikasyonu yerine genomdaki tek kopya genleri kullanarak hazırlanan genom/genom kantifikasyonunun daha doğru sonuçlar vereceğini söylemektedirler [20].

Karışım etlerdeki oranların belirlenmesi ve hilelerin açığa çıkarılmasındaki temel problemler karışımdaki doku kompozisyonunun, örneğe ve ete uygulanan işlemlerin bilinmemesidir. DNA temelli yöntemler örneklerin bileşimini tam yansıtamamaktadır. Sucuk, yağlı ve yağsız et, yağ ve bağ dokusuna kadar değişen farklı doku materyalleri içerir. Bu farklı dokular, farklı DNA konsantrasyonları sergilerler. Bu nedenle karışımlardaki etin başlangıç ağırlığı, DNA izolasyonundan sonra alınan türe özgü DNA oranını tam yansıtamamaktadır. Araştırmamızda tavuğun farklı dokularından elde edilen DNA miktarı göstermiştir ki tavuk iç organlarından elde edilen DNA miktarı kas dokusundan elde edilen DNA miktarından daha fazladır (örneğin, karaciğerden elde edilen DNA miktarı göğüs kasından elde edilen DNA miktarından 25 kat fazla-Cihaz çıktıları verilmemiştir). Bu durum bazı dokular için yanıltıcı olmakta ve yanlış sonuçlara yol açabilmektedir. Bazı araştırmacılar bu soruna çözüm olarak araştırılacak

örneklere uygun olarak hazırlanmış kalibrantlar ile doğru sonuçlar alınabileceğini belirtmişlerdir [29]. Bu durum ise pratikte her zaman mümkün değildir.

Araştırmamızda kullandığımız kitlerin hedeflediği DNA dizisi bildirilmemekle beraber literatürde kullanılan çalışmaların çoğunluğu genomda bulunan çoklu tekrar dizilerini hedefleyerek RT-PCR çalışmalarını yürüttüğü görülmektedir [16, 20]. Her bir hayvan hücresi sadece bir genomik DNA içerirken birden fazla mitokondri ve dolayısıyla birden çok mitokondriyal DNA içerebilir. Mitokondriyal DNA'nın miktarı dokudan dokuya değişir [30]. Bu nedenle PCR kantifikasyonu ve ağırlıkça yüzdeye çevrilmesi, dokuların ne olduğunu bilmeden çok zordur ve pratikte mümkün değildir. Bu nedenle mitokondriyal DNA'nın kullanılması kantifikasyon için önerilmemektedir. RT-PCR az sayıdaki gen kopyasını doğru olarak belirleyebilen bir yöntem olduğundan kalitatif analizlerde yoğun olarak kullanılmaktadır. Karışımdaki türlerin belirlenmesi ve tanımlanması için genelde çok kopyalı hedef diziler üzerinden yapılırken, kantifikasyon ölçümleri elde etmek için tek kopyalı genler hedeflenmesi önerilmektedir [20, 29].

Araştırmamızda kullanılan tür ve doku farklılıkları, DNA'nın ekstrakte edilebilirliği, DNA degradasyonu, mitokondriyal dağılımı, su ve yağ içeriği gibi sebepler nedeniyle DNA yüzdesi ile ağırlıkça yüzde birbiriyle uyumlu sonuçlar vermemiştir. Tavuk % DNA sonuçları ağırlıkça yüzdeden fazla bulunmaktayken, sığır % DNA sonuçları ağırlıkça yüzdeden düşük bulunmuştur. Bunun sebebi tavuktan gelen DNA'nın daha fazla olması olabilir. Sadece kas içeren örneklerde bile % kg/kg değerleri doğru olarak bu kitlerle saptanamamıştır. Ayrıca et ürünleri et dışında da DNA ya da protein içermeyen maddeler içerebilir. Bu nedenle bu analizlerde et türünün tüm ürüne oranı değil de sadece toplam etin içerisindeki orandır [26].

Yaptığımız çalışma sonucunda DNA/DNA oranını uygulayan ticari kitler kullanarak karışım et ürünlerindeki ağırlık/ağırlık şeklinde hazırlanan numunelerin içerik miktarlarını doğru olarak yansıtmayacağı ve et karışım ürünlerde doğru bir değerlendirme yapılamayacağı ortaya konulmuştur. Yetkili yasal organ olan Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliğini değiştirerek karışım et ürünlerinin piyasaya sunulmasını yasaklayarak konuların kuralların denetlenebilir olmasını sağlamıştır [31].

Kaynakça

- [1] Hunt, D.J., Parkes, H.C., and Lumley, I.D. 1997. Identification of the species of origin of raw and cooked meat products using oligonucleotide probes. *Food Chemistry*, 60, 437-442.
- [2] Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J., and Shinmura, Y. 1999. A

quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*, 51, 143-148.

- [3] Girish, P.S., Anjaneyulu, A.S., Viswas, K.N., Shivakumar, B.M., Anand, M., Patel, M., and Sharma, B. 2005. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science*, 70, 107-112.
- [4] Haider, N., Nabulsi, I., and Al-Safadi, B. 2012. Identification of meat species by PCR-RFLP of the mitochondrial COI gene. *Meat Science*, 90, 490-493.
- [5] Imaizumi, K., Akutsu, T., Miyasaka, S., and Yoshino, M. 2007. Development of species identification tests targeting the 16S ribosomal RNA coding region in mitochondrial DNA. *International Journal of Legal Medicine*, 121, 184-191.
- [6] Dooley, J.J., Paine, K.E., Garrett, S.D., and Brown, H.M. 2004. Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science*, 68, 431-438.
- [7] Zhang, C.-L., Fowler, M.R., Scott, N.W., Lawson, G., and Slater, A. 2007. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food Control*, 18, 1149-1158.
- [8] Kesmen, Z., Yetiman, A.E., Sahin, F., and Yetim, H. 2012. Detection of chicken and turkey meat in meat mixtures by using real-time PCR assays. *Journal of Food Science*, 77, C167-173.
- [9] Özpınar, H., Tezmen, G., Gökçe, İ., and Tekiner, İ.H. 2013. Detection of Animal Species in Some Meat and Meat Products by Comparatively Using DNA Microarray and Real Time PCR Methods. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19, 245-252.
- [10] Chou, C.C., Lin, S.P., Lee, K.M., Hsu, C.T., Vickroy, T.W., and Zen, J.M. 2007. Fast differentiation of meats from fifteen animal species by liquid chromatography with electrochemical detection using copper nanoparticle plated electrodes. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 846, 230-239.
- [11] Hans-Jacob, S., Knut, K., and Ivar, H.K. 1998. Identification of animal species in ground meat mixtures by multivariate analysis of isoelectric focusing protein profiles. *Electrophoresis*, 19, 3103-3109.
- [12] González-Córdova, A.F., Calderón de la Barca, A.M., Cota, M., and Vallejo-Córdova, B. 1998. Detección inmunoquímica de la adulteración de chorizo de cerdo con proteínas de soja: Immunochemical detection of fraudulent

- adulteration of pork chorizo (sausage) with soy protein. *Food Science and Technology International*, 4, 257-262.
- [13] Kamruzzaman, M., Sun, D.W., ElMasry, G., and Allen, P. 2013. Fast detection and visualization of minced lamb meat adulteration using NIR hyperspectral imaging and multivariate image analysis. *Talanta*, 103, 130-136.
- [14] Rohman, A., Sismindari, Erwanto, Y., and Che Man, Y.B. 2011. Analysis of pork adulteration in beef meatball using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Meat Science*, 88, 91-95.
- [15] Ballin, N.Z. 2010. Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, 86, 577-587.
- [16] Rahmati, S., Julkapli, N.M., Yehye, W.A., and Basirun, W.J. 2016. Identification of meat origin in food products—A review. *Food Control*, 68, 379-390.
- [17] Chen, F.-C., Hsieh, Y.-H.P., and Bridgman, R.C. 2002. Monoclonal antibodies against troponin I for the detection of rendered muscle tissues in animal feedstuffs. *Meat Science*, 62, 405-412.
- [18] Ayaz, Y., Ayaz, N.D., and Erol, I. 2006. Detection of Species In Meat And Meat Products Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Muscle Foods*, 17, 214-220.
- [19] Aristoy, M.C., and Toldra, F., 2004. Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants. *Meat Science*, 67, 211-217.
- [20] Ballin, N.Z., Vogensen, F.K., and Karlsson, A.H. 2009. Species determination - Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Science*, 83, 165-174.
- [21] Ballin, N.Z., Vogensen, F.K., and Karlsson, A.H. 2012. PCR amplification of repetitive sequences as a possible approach in relative species quantification. *Meat Science*, 90, 438-443.
- [22] Lahiff, S., Glennon, M., Lyng, J., Smith, T., Shilton, N., and Maher, M. 2002. Real-Time Polymerase Chain Reaction Detection of Bovine DNA in Meat and Bone Meal Samples. *Journal of Food Protection*, 65, 1158-1165.
- [23] Rodriguez, M.A., Garcia, T., Gonzalez, I., Hernandez, P.E., and Martin, R. 2005. TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. *Meat Science*, 70, 113-120.
- [24] Tanabe, S., Hase, M., Yano, T., Sato, M., Fujimura, T., and Akiyama, H. 2007. A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71, 3131-3135.
- [25] Hird, H.J., Hold, G.L., Chisholm, J., Reece, P., Russell, V.J., Brown, J., Goodier, R., and MacArthur, R. 2004. Development of a method for the quantification of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) in commercial products using real-time PCR. *European Food Research and Technology*, 220, 633-637.
- [26] Laube, I., Zagon, J., and Broll, H. 2007. Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR. *International Journal of Food Science & Technology*, 42, 336-341.
- [27] Kim, M., Yoo, I., Lee, S.Y., Hong, Y., and Kim, H.Y. 2016. Quantitative detection of pork in commercial meat products by TaqMan(R) real-time PCR assay targeting the mitochondrial D-loop region. *Food chemistry*, 210, 102-106.
- [28] Lipp, M., Shillito, R., Giroux, R., Spiegelhalter, F., Charlton, S., Pinero, D., and Song, P. 2005. Polymerase Chain Reaction Technology as Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. *Journal of AOAC International*, 88, 136-155.
- [29] Eugster, A., Ruf, J., Rentsch, J., Hübner, P., and Köppel, R. 2007. Quantification of beef and pork fraction in sausages by real-time PCR analysis: results of an interlaboratory trial. *European Food Research and Technology*, 227, 17-20.
- [30] Widmaier, E.P., Raff, H., and Strang, K.T. 2014. *Vanders Human Physiology: The Mechanisms of Body Function*. McGraw-Hill. New York, USA. 706s.
- [31] Anonymous. 2012. *Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği*. TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Ankara.