

Real-Time PCR tekniği ile çeşitli et ürünlerinde tavuk ve sığır eti oranlarının kantitatif tayini*

Yıldız AYAZ¹, Naim Deniz AYAZ², Mihriban AKSOY¹, Yusuf Ziya KAPLAN¹

¹ Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Etlik, Ankara

² Kırıkkale Üniversitesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Yahşihan, Kırıkkale

Geliş Tarihi / Received: 12.11.2013, Kabul Tarihi / Accepted: 27.12.2013

Özet: Et ürünleri üretiminde kullanılan et türlerinin tür bazında ve oransal olarak doğru belirlenmesi tüketicinin aldatılmasının önlenmesi, halk sağlığının korunması ve üreticiler arası haksız rekabetin önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Yapılan bu çalışmada, hem tür analizi hem de kantitatif analiz yapabildiği üretici firma tarafından ifade edilen SureFood Animal QUANT Beef ve SureFood Animal QUANT Chicken real-time PCR kitleri kullanılmıştır. Çalışmada deneysel olarak belirli oranlarda (%10 sığır eti + %90 tavuk eti, %20 sığır eti + %80 tavuk eti, %30 sığır eti + %70 tavuk eti, %50 sığır eti + %50 tavuk eti, %20 tavuk eti + %80 sığır eti, %30 tavuk eti + %70 sığır eti olmak üzere) sığır eti + tavuk eti karışımlarının yanı sıra farklı oranlarda sığır ve tavuk etinden hazırlanmış et ürünleri (salam, sosıs ve sucuk) test materyali olarak kullanılmıştır. Et karışımlarından ve et ürünlerinden DNA ekstraksiyon işlemleri SureFood Prep Animal DNA ekstraksiyon kiti (Congen S 1003, Berlin, Almanya) ile yapılmıştır. DNA ekstraksiyonunu takiben Real-Time PCR tekniği ile et oranları tayin edilmeye çalışılmıştır. PCR analizleri Light Cycler-2 (Roche) cihazında gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, kullanılan SureFood Animal QUANT Beef and SureFood Animal QUANT Chicken real-time PCR kitlerinin deneysel olarak farklı oranlarda sığır ve tavuk etinden hazırlanmış et karışımları ile yine çeşitli sığır ve tavuk eti karışımlarından yapılan salam, sosıs ve sucuk örneklerinde sığır ve tavuk eti oranlarını kantitatif olarak doğru tespit edemediği ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: Et ürünleri, et türleri, kantitatif analiz, Real-Time PCR.

Quantitative detection of chicken and beef meat from meat products by Real-Time PCR

Summary: Quantitative detection of meat species that are used in production of meat products has a great importance for preventing consumers from adulteration, protection of public health and prevention of unfair competition between producers. In this study, SureFood Animal QUANT Beef and SureFood Animal QUANT Chicken real-time PCR kits were used to detect meat species quantitatively. For this purpose, various proportions (10% bovine + 90% chicken, 20% bovine + 80% chicken, 30% bovine + 70% chicken, 50% bovine + 50% chicken, 80% bovine + 20% chicken, 70% bovine + 30% chicken) of bovine and chicken meat mixtures and meat products (salami, sausage and sucuk from different bovine + chicken meat) were experimentally prepared. After DNA extraction process of these meat mixtures and products, Real-Time PCR technique was used for the quantitative detection of meat species. SureFood Prep Animal DNA extraction kit (Congen S 1003, Berlin, Germany) was used for the extraction of DNA from mixtures. PCR analyses were carried out with Light Cycler-2 (Roche, Germany). According to the real-time PCR results, SureFood Animal QUANT Beef and SureFood Animal QUANT Chicken kits were not able to detect the rates of meat species in meat mixtures (beef and chicken) and meat products (salami, sausage and sucuk) accurately.

Key words: Meat products, meat species, quantitative detection. Real-Time PCR.

Giriş

Çeşitli et karışımları ve et ürünlerinde kullanılan et türleri (sığır eti, at, eşek eti, domuz eti, tavuk, hindi eti vb.) AGID, ELISA, RT PCR ve Real-Time PCR metotları ile teşhis edilebilmektedir. Türk Gıda Kodeksi Et Ürünleri Tebliği madde 4/a) “Et; sığır, manda, koyun, keçi gibi büyük ve küçükbaş

hayvanlar; tavuk, hindi, kaz, ördek, beç tavuğu gibi evcil kanatlı hayvanlar ile tavşan ve domuzdan elde edilen, insan tüketimine uygun olan tüm parçaları” olarak tanımlanmıştır. Kodeks 2000 yılına kadar salam, sosıs, sucuk gibi et ürünlerinde sığır eti ile karışık olarak tavuk eti kullanımına izin vermemiştir. Ancak Türk Gıda Kodeksi 2000/4 no’lu tebliğinde et ürünlerinde sığır eti + tavuk eti kullanımına izin

Yazışma adresi / Correspondence: Yıldız Ayaz, Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Gıda Kontrol Laboratuvarı, Etlik, Ankara E-posta: yildizayaz@hotmail.com

*TAGEM/GY/11/03/191 nolu Gıda Tarım ve Hayvancılık projesinden özetlenmiştir.

vermiştir. Türk Gıda Kodeksi 2000/4 tebliği madde 12/ b ye göre “Et ürünlerinin elde edildiği et türü karışım söz konusu ise ürün adının hemen yanına en az 12 puntoluk büyüklükte üretimde kullanılan her et türünün yüzdesi yazılacaktır.” koşulu getirilmiştir. Laboratuvarlarımızda kullanılan presipitan serumlar, ELISA kitleri, primerler veya kalitatif kitler değişik hayvan türlerinden elde edilen ve et karışımlarında kullanılan etlerin oranlarını tespit etmek için yeterli değildir. Bu nedenle Kodekste sığır eti, koyun eti vb. kullanımına izin verilen etlere tavuk eti katılarak üretilen et ürünlerinde tavuk eti oranını saptamak olanaksızdır.

Yapılan bu çalışmada son yıllarda yurt dışında üretilerek tanıtımı yapılan, hem tür analizi hem de kantitatif analiz yapabilen Real-Time PCR kiti kullanılarak bu sorun aşılmaya çalışılmıştır.

Sığır eti ve tavuk eti karışımlarından yapılan Et Ürünlerinde (salam, sucuk, sosis vb.) tavuk etinin yüksek oranda kullanılması ürünün maliyet fiyatını düşürürken raf ömründe kıalmaya neden olmakta ürünün tad, koku, aroma ve yapı kalitesini bozmaktadır. Ayrıca tavuk eti sığır etine oranla Salmonella spp. yönünden daha büyük bir risk taşımaktadır. Et ürünlerinde kullanılan et karışımlarında et türü oranları etikette doğru olarak belirtilmediği takdirde tüketicinin kandırılmasının yanı sıra üreticiler arasında da etik çalışanların aleyhine olarak haksız rekabete neden olmaktadır. Laboratuvarlarda et ürünlerinde kullanılan et oranlarının miktarı tespit edilmediğini bilen bir kısım üreticiler bu boşluktan yararlanarak ürün etiketinde sığır eti oranını olduğundan yüksek, tavuk eti oranını da olduğundan daha düşük gösterebilmektedir. Laboratuvarlarda et ürünlerinde kullanılan hayvan türlerinin tür bazında ve oransal olarak doğru belirlenmesi tüketicinin aldatılmasının önlenmesi, halk sağlığının korunması ve üreticiler arası haksız rekabetin önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Et ürünlerine düşük değerli et türlerinin karıştırılması, ekonomik, dini ve sağlık yönünden önemli olduğu kadar et ve et ürünleri üretiminde kullanılan et türlerinin tespiti ve kantitasyonu ürünün mevzuata uygunluğunun kontrolü gıda hijyeni, gıda kontrolü, gıda kodeksi ve veteriner adli tıp açısından büyük öneme sahiptir.

Bu çalışma et ürünlerinde sığır eti ve tavuk eti oranlarını Real-Time PCR tekniği ile kantitatif olarak test etmek amacı ile yapılmıştır.

Kanatlı eti ve sığır eti karışımından yapılan et ürünleri örnekleri:

Materyal ve Metot

Bu çalışmada çeşitli ulusal firmalar tarafından üretilen, etiketlerinde tavuk eti ve sığır eti karışımından yapıldığı belirtilen 30 sosis, 30 salam ve 30 sucuk olmak üzere toplam 90 adet et ürünündeki sığır eti ve tavuk eti oranları Real-time PCR tekniği ile kantitatif olarak test edilmesi planlanmıştır.

Metot validasyonu için belirli oranlarda:

%10 sığır eti + %90 tavuk eti

%20 sığır eti + %80 tavuk eti

%30 sığır eti + %70 tavuk eti

%50 sığır eti + %50 tavuk eti

%20 tavuk et i+ %80 sığır eti,

%30 tavuk eti + %70 sığır eti karışımları hazırlanarak bu karışımlarda DNA ekstraksiyonu işlemini takiben Real-Time PCR tekniği ile et oranları tayin edilmeye çalışılmıştır

Deneme çalışmalarında kullanılmak amacıyla özel bir firmaya tavuk eti ve sığır eti karışımı oranı

%50 Sığır eti + %50 Tavuk eti

%70 Sığır eti + %30 Tavuk eti

%80 Sığır eti + %30 Tavuk eti olan sosis, salam ve sucuk örnekleri yaptırılmıştır.

Çalışmada laboratuvarında hazırlanan, bilinen orandaki sığır eti ve tavuk etinden oluşan et karışımları ve belirli oranlarda sığır eti ve tavuk eti karışımından yaptırılan sucuk, sosis ve salam ürünlerinden toplam hayvansal et DNA oranı ile sığır ve tavuk eti DNA oranı karşılaştırılarak ürünündeki sığır eti ve tavuk eti oranını belirlemek amacıyla Real-time PCR tekniği kullanılmıştır. Analiz; örneklerin hazırlanması, DNA ekstraksiyonu, Real-time PCR reaksiyon karışımlarının hazırlanması, cihaza yükleme yapılması ve Real Time PCR işlemini takiben sonuçların bilgisayarda değerlendirilmesi aşamalarından oluşmuştur.

Çalışmalar Kurumumuz Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarında bulunan Roche marka Light Cycler-2 cihazında gerçekleştirilmiştir.

Örneklerin hazırlanması ve DNA ekstraksiyonu: Et karışımlarından ve et ürünlerinden DNA ekstraksiyonu amacıyla SureFood Prep Animal DNA

ekstraksiyon kiti (Congen S 1003, Berlin, Almanya) kullanılmıştır.

SureFood Prep Animal DNA ekstraksiyon kiti manüeline göre örneklerden DNA ekstraksiyonu yapıldı. Mekanik olarak homojenize edilen et örneğinden 40 mg 1.5 ml'lik eppendorf tüpünde tartılarak alındı ve üzerine 400 µl Lysis buffer (Kit kod L) ve 40 µl Proteinaz K (Kit kod K) eklendi. Vortekslenerek homojenize edilen örnek benmaride çalkalanarak ve sık sık vortekslenerek 52°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpler 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant başka bir 1.5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı. Süpernatant 200 µl Binding buffer (Kit kod B) ile süspanse edilerek vortekslendi. Karışım spin filtreden (Kit kod S) geçirilerek yeni bir tüpe (Kit kod R) filtre edildikten sonra 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Filtrat atıldı ve spin filtre tekrar başka tüpe yerleştirildi. Spin filtreden 550 µl yıkama solüsyonu (Kit kod W) geçirildi ve 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Bu şekilde filtre yıkama solüsyonundan arındırıldı. Aynı şekilde yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı. Filtrat atıldıktan sonra spin filtre tekrar tüpe yerleştirildi ve kurutma işlemi için 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından filtreler yeni bir tüpe (Kit kod R) yerleştirildi ve üzerine 100 µl Eluotion buffer (Kit kod E) eklendi. Tüpler 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtreler atılarak tüp içinde DNA' elde edildi. DNA miktarı Nano drop cihazında ölçüldü. Elde edilen ekstraksiyon PCR için aynı gün içinde kullanılmayacaksa kullanım aşamasına kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Real-Time PCR analizi: Çalışmada SureFood Animal Real-time PCR kitleri (Congen) kullanılmış olup Amplikasyon işlemi toplam 20.0 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Bu kitin manuali izlenerek yapılan çalışmalarda üründe bulunan toplam ete ait DNA oranı ve tespit edilmek istenen hayvan eti türüne özgü spesifik DNA oranı için Real Time PCR karışımları ayrı ayrı hazırlanmıştır. Et ürünündeki toplam ete ait DNA miktarını saptarken her bir örnek için 17 µl Ref reaksiyon karışımı (kod 3), 1.0 µl FDE (kod 5), 0.1 µl Taq polymerase (kod 6) ve 2.0 µl örneğe veya standartlara ait DNA PCR tüple-

rinde karıştırıldı. Tavuk veya sığır etine özgü DNA miktarının belirlenmesi için 17 µl hayvan türü (sığır veya tavuk) reaksiyon karışımı (kod 4), 1.0 µl FDE (kod 5), 0.1 µl Taq polymerase (kod 6) ve 2.0 µl örneğe veya standartlara ait DNA PCR tüplerinde karıştırıldı. Standart DNA'lar 105, 104, 103, 102, 101 kopya/µl olmak üzere 5 farklı dilüsyonda kullanıldı. Real-Time PCR işleminde LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics) cihazı kullanılmış olup sığır eti ve tavuk eti için Kitte verilen programlar uygulanmıştır.

Tablo 1. PCR Quant Beef Programı

	LightCycler
Initial Denaturation (HOLD)	1 min, 95°C
CYCLES	45
Denaturation	5 sec, 95°C
Annealing	10 sec, 62°C
Extension (CYCLE)	15 sec, 65°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	20°C/sec
Fluorescence Detection Setup	Channel: 530/610 or F1/F2 Acquisition mode: Single in extension phase

Tablo 2. PCR Quant Chicken Programı

	LightCycler/Rotor-Gene Q
Initial Denaturation (HOLD)	1 min, 95°C
CYCLES	45
Denaturation	10 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	20°C/sec
Fluorescence Detection Setup	Channel: 530/610 or F1/F2 Acquisition mode: Single in extension phase

Standart curve eldesi için kit içinde bulunan standart DNA TE buffer ile 1/10 oranında sulandırıldıktan sonra 10 katlı dilüsyonları hazırlandı.

Tablo 3. Standart DNA Dilüsyonlarının Hazırlanması

Standard	Dilutions	Copy number per µl	Final copy number per reaction
S1	45 µl TE Buffer + 5 µl Standard DNA	100.000 copies	500.000 copies
S2	45 µl TE Buffer + 5 µl DNA of S1	10.000 copies	50.000 copies
S3	45 µl TE Buffer + 5 µl DNA of S2	1000 copies	5000 copies
S4	45 µl TE Buffer + 5 µl DNA of S3	100 copies	500 copies
S5	45 µl TE Buffer + 5 µl DNA of S4	10 copies	50 copies

PCR protokolü sonrası aranan hayvan türüne özgü et DNA kopya sayısı toplam et DNA kopya sayısına bölünüp 100 ile çarpılarak karışık ette aranan ete ait et oranı bulundu. Düzeltme faktörü olarak K değeri %100 pozitif DNA sayısının ölçüm sonunda bulunan test sonunda elde edilen değere bölünmesi ile bulundu.

K: %100 pozitif DNA / % Ölçülen pozitif DNA

Bulgular

Laboratuvarda hazırlanan, bilinen orandaki sığır eti ve tavuk etinden oluşan et karışımlarında yapılan analizler sonucunda bulunan değerler Tablo 4 de gösterilmiştir.

Tablo 4. Sure Food ANİMAL QUANT Chicken test kiti ile yapılan çalışma sonuçları

Sıra no	Hazırlanan Karışım Oranı %	Bulunan Tavuk Eti Oranı %
1	70 Sığır eti + 30 Tavuk eti	44
2	70 Sığır eti + 30 Tavuk eti	18,92
3	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	43,91
4	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	59,57
5	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	15,7
6	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	-
7	70 Sığır eti + 30 Tavuk eti	18
8	70 Sığır eti + 30 Tavuk eti	15,6
9	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	15,6
10	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	16,2
11	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	46,8
12	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	37,2
13	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	22,29
14	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	35,85

15	20 Sığır eti + 80 Tavuk eti	29,25
16	20 Sığır eti + 80 Tavuk eti	24,12
17	10 Sığır eti + 90 Tavuk eti	27,63
18	10 Sığır eti + 90 Tavuk eti	34,54
19	10 Sığır eti + 90 Tavuk eti	48,46
20	100 Tavuk eti	204
21	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	29,9
22	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	76
23	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	100
24	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	900
25	10 Sığır eti + 90 Tavuk eti	33,7
26	10 Sığır eti + 90 Tavuk eti	39,5

Tablo 5. Sure Food ANİMAL QUANT Beef test kiti ile yapılan çalışma sonuçları

Sıra no	Hazırlanan Et Karışım Oranı %	Bulunan Sığır Eti Oranı %
1	100 Sığır eti	102
2	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	13,72
3	5 Sığır eti + 95 Tavuk eti	1,55
4	70 Sığır eti + 30 Tavuk eti	68,75
5	70 Sığır eti + 30 Tavuk eti	52,4
6	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	67
7	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	53
8	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	66
9	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	33,8
10	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	18
11	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	14,3
12	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	46,1
13	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	28

Tablo 6. Sure Food ANİMAL QUANT Chicken ve Beef test kitleri ile et ürünlerinde yapılan çalışma sonuçları

Numune	Karışım Oranı %	Bulunan Sığır Eti Oranı %
Salam	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	58,37
Salam	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	48,33
Sosis	80 Sığır eti + 20 Tavuk eti	49,25
Sosis	80 Sığır eti + 20 Tavuk eti	117,18
Sosis	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	20,59
Sosis	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	49,06
Sucuk	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	71,42
Sucuk	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	73,04
Sucuk	70 Sığır eti + 30 Tavuk eti	207,28
Sucuk	70 Sığır eti + 30 Tavuk eti	484,7

Çalışmanın tümünde standartlarla ilgili bir sorun yaşanmadı, PCR da linear doğrular elde edildi.

TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü laboratuvarında %10 sığır eti ve %90 tavuk eti karışımından birlikte yaptığımız çalışma sonucunda bulunan değer Tablo 7 de verilmiştir.

Tablo 7. TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü ve EVKMAE Gıda Kontrol Laboratuvarının Birlikte Surefood ANİMAL QUANT Beef Kiti İle Yapılan Çalışma Sonuçları

Kod no	Hazırlanan Karışım Oranı %	Bulunan Sığır Eti Oranı %
1	10 Sığır Eti + 90 Tavuk Eti	6,3
1	10 Sığır Eti + 90 Tavuk Eti	5,9

Bulunan değerler hazırlanan karışımda bulunan değerden düşüktür.

Deneyisel ortak çalışma: 31 Ekim 2011 tarihinde Ulusal Gıda Referans Laboratuvar Müdürlüğünde yapılan "Et ve Et ürünlerinde miktar analizi" ile ilgili toplantıda yapılan görüşmeler sonunda kurumumuz ve Ulusal Gıda Referans Laboratuvar Müdürlüğünden katılan teknik personelle birlikte hazırladığımız 4 farklı oranda sığır eti + tavuk etinden oluşan ve rondoda homojenize edilmiş et karışımları örnekleri kodlanarak Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne, TÜBİTAK Gen Müh. ve Biyoteknoloji Laboratuvarına ve MAM Gıda Enstitüsüne yollandı. Bu kurumlardan gelen analiz sonuçları Tablo 8 de verilmiştir.

Tablo 8. TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü Çalışma Sonuçları

Numune Kodu	SUREFOOD KİTİ İLE		SENTROMER KİTİ İLE		Hazırlanan Numune Oranları %	
	SIĞIRETİ	TAVUKETİ	SIĞIRETİ	TAVUKETİ	SIĞIRETİ	TAVUKETİ
ETLİK1	20	80	42	57	30	70
ETLİK2	50	50	73	26	70	30
ETLİK3	13	87	23	77	20	80
ETLİK4	32	68	65	35	50	50

TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Hayvan Genetiği ve Üreme Biyolojisi Laboratuvarı Sonuçları

Tablo 9. SUREFOOD BEEF Kiti İle Yapılan Çalışma Sonuçları

Numune Kodu	SUREFOOD KİTİ İLE		SUREFOOD KİTİ İLE TEKRAR		Hazırlanan Numunede Et Oranları %	
	(2 Paralelin CT Ortalaması alınmış)		(2 Paralelin CT Ortalaması alınmamış)		SIĞIR ETİ	TAVUK ETİ
	SIĞIR ETİ		SIĞIR ETİ			
ETLİK1	23,6		20	25	30	70
ETLİK 2	59,2		55	60	70	30
ETLİK 3	11,1		10	15	20	80
ETLİK 4	31		30	35	50	50

Tablo 10. SENTROMER Firmasına yaptırılan Real Time PCR Analiz Kiti (Sentroplex kit) ile yapılan çalışma sonuçları

Numune Kodu	SENTRO PLEX REAL TIME PCR ET TÜRÜ ANALİZ KİTİ		Hazırlanan Numunede Et Oranları %	
	TAVUK ETİ	SIĞIR ETİ	TAVUK ETİ	SIĞIR ETİ
ETLİK 1	50	50	70	30
ETLİK 2	10	90	30	70
ETLİK 3	60	40	80	20
ETLİK 4	10-20	80-90	50	50

Tartışma ve Sonuç

Laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda elde edilen et oranları sonuçları ile kontrollü olarak hazırlanarak analize alınan et oranları arasında bir paralellik görülmemiştir. Sonuçlar incelendiğinde: bulunan değerler her çalışmada bilinen değer üzerinde veya değer altında değil karışık bir tablo sergilemiştir. Paralel örneklerin sonuçlarında da bir standart gözlenmemiştir.

Et ve et ürünlerinde hayvan türlerinin tayininde serolojik [20], histolojik [24], İmmunoelektroforezis [19] ve immünokimyasal [21] tekniklerin yanında, yüksek duyarlılığı, spesifitesi ve kantitatif sonuç verebilmesi nedeniyle moleküler biyolojik bir teknik olan Real-time PCR tekniğinin etkin olarak kullanılan bir metot olduğu bildirilmektedir[15]. Kullanılan aynı metotla yapılan sonuçlarımız ile bu bildirim uyusmamaktadır.

Dooley ve ark. [6] yapmış oldukları çalışmada Real-time PCR tekniği ile et karışımı içinde %0.5 gibi çok düşük oranlardaki et türlerinin kantitatif olarak tespit edilebildiğini ortaya koymuşlardır. Et karışımlarında düşük miktarlardaki et türlerini kantitatif olarak laboratuvarımızda biz de ayırt edebilmekteyiz.

Chisholm ve ark. [4] yapmış oldukları çalışmada Real-time PCR tekniğinin et türlerinin kantitatif tespiti açısından kompleks yapıları ticari ürünlerde de spesifik ve duyarlılığı yüksek bir metot olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmaların aksine son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda bazı çelişkili sonuçlar elde edilmiştir.

Köppel ve ark. [14] sığır, koyun, domuz ve at eti karışımlarından Real -time PCR ile et türlerinin miktar olarak tespitine yönelik yapmış oldukları çalışmada; 5 farklı et karışımlarına %1, %9, %25,

%35, %55 olarak katılan sığır eti miktarını sırasıyla %0,35, %23, %34, 529,9 ve %51,2 olarak bulmuşlardır. Dolayısıyla bazı numunelerde yakın değerler tespit edilse de hiçbir numunede sığır eti yüzde değeri doğru olarak belirlenmemiştir. Bu çalışmada yaptığımız çalışmayı doğrular sonuçlar alınmıştır.

Et ürünlerine istenmeyen veya düşük değerli et türlerinin karıştırılması, ekonomik, dini ve sağlık yönünden olduğu kadar [2], et ürünleri üretiminde kullanılan et türlerinin tespiti ve mevzuata uygunluğunun kontrolü de gıda mevzuatı ve tüketici hakları yönünden büyük öneme sahiptir [22].

Et ürünlerine hile amacıyla ucuz et türlerinin karıştırılması, üreticiye haksız ekonomik kazanç sağlarken, bazı et türlerine hassasiyet gösteren insanlarda allerjik reaksiyonların şekillenmesiyle sağlık problemlerine neden olmakta ve dini inanışlar doğrultusunda bazı et türlerini tüketmeyen insanlar aldatılmaktadır [12]. Ayrıca BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy) hastalığının ortaya çıkmasına bağlı olarak et türlerinin tespiti daha da önem kazanmıştır [19].

Kanatlı etinin memeli hayvan etlerine oranla daha az doymuş yağ ve kolesterol içermesi nedeniyle Avrupa'da kanatlı eti tüketiminin artmasına bağlı olarak kanatlı eti üretiminin arttığı, bu nedenle diğer kasaplık hayvanların etinden üretilen ürünlere hile amacıyla mekanik olarak ayrılmış kemiksiz kanatlı dokularının katılması olasılığının yükseldiği bildirilmiştir [1].

Hsieh ve ark. [13] yerel marketlerden almış oldukları sığır ve kuzu kıyma örneklerinin kanatlı etiyle karıştırılmış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu durumun sığır ve kuzu etlerinin pahalı olmasına karşın kanatlı etinin daha ucuz olmasından ve tam olarak temizlenmemiş kıyma makinalarında farklı

et türlerinin arka arkaya çekilmiş olmasından kaynaklanabileceğini vurgulamışlardır.

Ayaz ve ark. [1] Ankara'da ELISA tekniği ile yapmış oldukları analizler neticesinde, 28 sucuktan 11'inin (%39.2), 14 salamdan 5'inin (%35.7), 11 sosisten 3'ünün (%27.2), 9 parça etten 2'sinin (%22.2), 16 kıyma ve köfteden ise 1'inin (%6.2) olmak üzere toplam 100 çiğ veya pişmiş et ve et ürünlerinden 22'sinin (%22.0) etiket bilgileri ile bağdaşmadığını bildirmişlerdir.

Günşen ve ark., [10] İstanbul'da yapmış oldukları çalışmada ELISA tekniği ile analiz edilen 410 adet numunenin tümünde (%100) sığır eti, bunun 85 adedinde (%20.7) tavuk eti, 14 adedinde (%4.3) at eti tespit etmişlerdir. 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.

Et ve et ürünlerinde hayvan türlerinin tayininde basit teknikler [11], serolojik [20], histolojik [24] ve immünokimyasal [21] tekniklerin yanında, yüksek duyarlılığı, spesifitesi ve kantitatif sonuç verebilmesi nedeniyle moleküler biyolojik bir teknik olan real-time PCR tekniği etkin olarak kullanılan bir metottur [15].

Son yıllarda ELISA tekniğine ek olarak PCR [9], polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) [5], random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) [7], DNA hybridization [18] ve nükleotid sekanslama [8] gibi moleküler tekniklerde et türlerinin tespitinde etkin olarak kullanılmaya başlanmıştır. PCR tekniği ise bu moleküler teknikler arasında en yaygın kullanılan moleküler biyolojik metottur [3]. Son yapılan çalışmalar Real-time PCR tekniğinin et türlerinin kantitatif tespitinde etkin olarak kullanılabilceğini ortaya koymuştur [15,16,17]. Bizim çalışma sonuçlarımız bu bildirimleri desteklemektedir.

Soares ve ark [23] bilinen oranlarda hazırlanan kanatlı ve domuz eti karışımlarında Real-time PCR ile kantitatif olarak et türü tayini yaptıkları çalışmada domuz eti miktarının tespitinde varyasyon katsayısının %4,1 ile %7,6 oranında olduğunu bildirmişlerdir.

Bugünkü durumuyla et karışımlarından hazırlanmış et ürünlerinde kullandığımız ticari kitlerle et

türü oranlarını doğru ve kesin tekrarlanabilir olarak tespit etmek mümkün görülmemektedir. Kitlerle ilgili AR-GE çalışmalarının devam ettirilmesi ve bu kitlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Deneysel çalışmalarda olumlu sonuçlar alınmadığından yanlış bilgilendirme yapmamak adına piyasa ürünlerinde analizler yapılmamıştır.

Sığır eti ve kanatlı etlerinin karışımından yapılan et ürünlerinde kullanılan sığır eti ve kanatlı eti oranlarının doğru olarak tespit edilemediği ortak görüşüyle 2012 yılında revize edilen Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliğinde (Tebliğ No:2012/74) sığır etine kanatlı eti katılması yasaklanmıştır. Ancak, kanatlı etinden yapılan et ürünlerine katılan oran etiketinde bildirilmeden sadece isim verilerek sığır eti veya yağı katılabilmektedir.

Sonuç olarak sığır eti ve tavuk eti karışımlarından üretilen et ürünlerinde kullanılan sığır eti ve tavuk eti oranları bu amaçla kullanılan Real Time PCR kitleri ile doğru olarak tespit edilemediğinden et ürünlerinde yapılabilecek hileleri önlemek ve haksız rekabetin önüne geçmek amacıyla 2012 yılında yayınlanan Et ve Et Ürünleri Tebliğinde Sığır etinden yapılan et ürünlerine kanatlı eti katılması yasaklanmıştır.

Kaynaklar

1. Ayaz Y, Ayaz ND, Erol I, (2006). *Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay*. J Muscle Foods. 17, 214-220.
2. Berger RG, Mageau RP, Schwab B, Johnston RW, (1988). *Detection of poultry and pork in cooked and canned meat foods by enzyme linked immunosorbent assays*. J AOAC Int. 71, 406-409.
3. Chikuni K, Tabata T, Kosugiyama M, Monma M, (1994). *Polymerase chain reaction assay for detection of sheep and goat meats*. Meat Scie. 37, 337-345.
4. Chisholm J, Conyers C, Booth C, Lawley W, Hird H, (2005). *The detection of horse and donkey using real-time PCR*. Meat Scie. 70, 727-732.
5. Chung ER, Kim YS, Han SK, (2000). *Identification of Hawoon meat using PCR-RFLP marker of MCIR gene associated with bovine coat color*. J Animal Sci Technol. 42, 379-380.
6. Dooley JJ, Paine KE, Garrett SD, Brown HM, (2004). *Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays*. Meat Scie. 68, 431-438.
7. Ganai TAS, Sing RK, Butchiah G. (2000). *DNA amplification fingerprinting of cattle and buffalo genome by RAPD-PCR utilizing arbitrary oligonucleotide primers*. Buffalo J. 3, 331-339.

8. **Girish PS, Anjaneyulu ASR, Viswas KN, Anand M, Rajkumar N, Shivakumar BM, Et Al.**, (2004). *Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species*. Meat Sci. 66, 551-556.
9. **Guoli Z, Mingguang Z, Zhiang Z, Hongsheng O, Qiang L**, (1999). *Establishment and application of a polymerase chain reaction for the identification of beef*. Meat Sci. 51, 233-236.
10. **Günşen U, Aydın A, Ovalı BB, Coşkun Y**, (2006). *Detection of Different Meat Species in Raw Meat and Cooked Meat Products Using ELISA Technique*. J Vet Fac Vet Med. Istanbul Univ. 32, 45-52.
11. **Hsieh YHP, Chen FC, Sheu SC**, (1997). *A. AES research developing simple, inexpensive tests for meat products.*, Highlights of Agricultural Research, 44(2), Summer.
12. **Hsieh YHP, Johnson MA, Wetzstein CJ, Green NR**, (1996). *Detection of species adulteration in pork products using agar gel immunodiffusion and enzyme linked immunosorbent assay*. J Food Quality. 19, 1-9.
13. **Hsieh YHP, Woodward BB, Ho SH**, (1995). *Detection of species substitution in raw and cooked meats using immunoassays*. J Food Quality. 58, 555-559.
14. **Köppel R, Ruf J, Rentsch J**, (2011). *Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep*. Eur Food Res Technol. 232, 151-155.
15. **Kremar P, Rencova E**, (2005). *Quantitative Detection of Species-Specific DNA in Feedstuffs and Fish Meal*. Journal of Food Protec. 68, 1217-1221.
16. **Lahiff S, Glennon M, Lyng J, Smith T, et al.** (2001). *Real-time Polymerase chain reaction detection of bovine DNA in meat and bone meal samples*. J Agric Food Chem. 7, 1158-1165.
17. **Lombardo F, Galli A, Bongioni G**, (2004). *Real-Time PCR Approach for Detection of Bovine DNA in Animal Feedstuffs*, Atti del 39 Simposio Internazionale di Zootecnica "Meat scie and research", 10 giugno Roma.
18. **Matsunga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya H, Shibata K, Yamada J, Et Al.** (1998). *Determination of mitochondrial cytochrome b gene sequence for red deer (Cercus elaphus) and the differentiation of closely related deer meats*. Meat Sci. 49, 379-385.
19. **Necidova L, Recencova E, Svoboda L**, (2002). *Counter immunoelectrophoresis: a simple method for detection of species specific muscle proteins in heat processed products*. Vet Med Czech. 47, 143-147.
20. **Reddy PM, Reddy VSL, Rao ZS, Murthy GK**, (2000). *Identification of origin of fresh, cooked, and decomposed meats by using brain antigens*. J Food Sci. Technol. 37, 201-203.
21. **Rencova F, Necidova L, Svoboda L**, (2000). *Identification by ELISA of poultry, horse, kangaroo, and rat muscle specific proteins in heat processed products*. Vet Med Czech. 45, 353-356.
22. **Shericar AT, Karkare UD, Khot JB, Jayarao BM, Bhilegaonkar KN**, (1993). *Studies on thermostable antigens, production of species specific antiadrenal sera and comparison of immunological techniques in meat speciation*. Meat Sci. 33, 121-136.
23. **Soares S, Amaral JS, Mafra I, Oliveira MBPP**, (2010). *Quantitative detection of poultry meat adulteration with pork by a duplex PCR assay*. Meat Sci. 85, 531-536.
24. **Tremlova B**, (2000). *Histologischer Nachweis von Knochenpartikein in Fleischprodukten*. Fleischwirtsch. 80, 73-74.