

**Kayseri ve Erzurum Piyasasında Satılan Et Ürünlerinde Farklı
Hayvan Türlerine Ait Etlerin PCR Tekniğı Kullanılarak
Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma**

Hasan Yetim^{1*}, Zülal Kesmen², Fikrettin Şahin

¹ Erciyes Üniv. Mühendislik. Fak. Gıda Müh. Bölümü, Kayseri,

² TC Sağlık Bakanlığı Hıfzıssıhha Enstitüsü Bölge Müdürlüğü, Erzurum.

³ Yeditepe Üniv. Mühendislik. Fak. Genetik ve Biyomüh. Bölümü, İstanbul

¹ hyetim@erciyes.edu.tr

Özet

Bu araştırmada at, eşek ve domuz türlerine spesifik oligonükleotid primerler dizayn edilerek, her bir türün ng DNA seviyesinde tespitini sağlayacak bir spesifik PCR metodu geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem kullanılarak Erzurum ve Kayseri piyasasından toplanan çiğ kıyma, sucuk, sosis, salam ve kavurma örneklerinden oluşan toplam 40 et ürününün analizi yapılmış ve bu örneklerin hiçbirinin at, eşek ve domuz türlerine ait etleri içermediğı tespit edilmiştir. Ancak tüketicilerin korunması ve haksız rekabetin önlenmesi amacıyla et ve et ürünlerinin sürekli ve düzenli olarak kontrollerinin yapılması gerektiğı ve dolayısıyla bu çalışma kapsamında at, eşek ve domuz türlerine ait etlerin tespitinde kullanılmak üzere geliştirilen spesifik PCR tekniğinin ülkemiz gıda kontrol laboratuvarlarının bu konudaki ihtiyacını giderecek rutin bir kontrol metodu olabileceğı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: PCR, et ürünleri, tür tayini

Giriş

Et ve et ürünlerine hile amacıyla karıştırılan farklı et türlerinin tespiti, tüketicinin korunması, gıdalarda etiket bilgisi mevzuatının uygulanması ve haksız rekabetin önlenmesi açısından önem taşımaktadır (1). Bu nedenle, et ve et ürünlerinin elde edildiğı hayvan türlerinin belirlenmesinde, hızlı sonuç veren, basit, rutin kullanımlara uygun, duyarlılığı yüksek ve güvenilir metotlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler ve PCR tekniğinin bu alanda kullanılmasına bağlı olarak et türlerinin belirlenmesinde nükleik asit analizine dayanan yeni ve güçlü metotlar geliştirilmiştir. DNA'nın proteinlere nazaran daha stabil bir molekül olması, tüm hücre ve dokularda aynı özelliğı göstermesi ve birey hakkında daha fazla bilgi vermesi gibi nedenlerden dolayı tür belirleme çalışmalarında protein analizini esas alan yöntemler yerini giderek DNA baz dizi analizine dayanan yöntemlere bırakmaktadır (2, 4, 5, 6).

Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs 2006, Bolu

Bu araştırmada, taze ve işlenmiş et ürünlerinde farklı hayvan türlerine ait etlerin hassas ve hızlı bir şekilde tanı ve teşhisi için spesifik PCR metodu geliştirilmiş ve geliştirilen yöntemin pratikte uygulanabilirliğinin kontrolü amacıyla, Kayseri ve Erzurum piyasasında satılan çiğ kıyma, sucuk ve kavurma gibi et ürünlerinde kullanılan etlerin türleri belirlenerek bu ürünlerin etiketlerine uygunluk kontrolleri yapılmıştır.

Materiyal ve Yöntem

Materiyal

Araştırmada; at (*Equus caballus*), eşek (*Equus asinus*), domuz (*Sus scrofa domestica*), sığır (*Bos taurus*) ve koyun (*Ovis aries*) olmak üzere 5 ayrı hayvan türünün iskelet kas dokuları kullanılmıştır.

Yöntem

1. Türe spesifik primer dizaynı: Araştırmada at, eşek ve domuz türlerinin tespitinde kullanılmak üzere; mitokondrial DNA üzerinde her bir türe spesifik oligonükleotid primerler dizayn edilmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Araştırmada kullanılan spesifik primerler

Tür	Primer	Baz Dizisi	Gen	PCR Ürün Boyutu
At	Forwar	5'-CTATCCGACACACCCAGAAGTAAAG-3'	ATPase	153bp
	Revers	5'-GATGCTGGGAAATATGATGATCAGA-3'	ATPase	
Eşek	Forwar	5'-CATCCTACTAACTATAGCCGTGCTA-3'	ND2	145bp
	Revers	5'-CAGTGTGGGTGTACACTAAGATG-3'	ND2	
Domuz	Forwar	5'-CATTCGCCTCACTCACATTAACC-3'	ND5	227bp
	Revers	5'-AAGAGAGAGTTCTACGGTCTGTAG-3'	ND5	

2. DNA İzolasyonu: Taze ve işlenmiş et örneklerinden DNA izolasyonunda, DeSalle *et al.* (1993) tarafından bildirilen metot kullanılmıştır (4).

3. PCR: At, eşek ve domuz türlerine spesifik olarak dizayn edilen primerlerin ortak çalışma koşulları belirlendikten sonra gradient PCR kullanılarak metot optimizasyonu yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılan PCR metot parametreleri aşağıda verilmiştir.

Toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde; eppendorf tüplere 5 µl 10x PCR tamponu (100mM Tris-HCl (pH 8.3), 500mM KCl, 15mM MgCl₂ ve %0.1 (w/v) jelatin), 3 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl dNTP mix (10 mM), 1.5 µl forward primer (10 µM), 1.5 µl reverse primer (10 µM), 2U Taq DNA polimeraz

enzimi (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO) ve 2 µl kalıp DNA molekülü konulmuştur. Tüplere 94 °C'de 3 dak. ilk denatürasyon işleminden sonra 35 döngü süresince 94 °C'de 50 saniye, at, eşek domuz türleri için sırasıyla 61 °C, 57 °C ve 55 °C'de 50 saniye ve 72 °C'de 1 dak. termal döngü şartları uygulanmıştır.

4. Elektroforez: PCR amplifikasyon ürünleri, % 2'lik agaroz jel elektroforezde 70 V'da yaklaşık 2 saat yürütülerek analiz edilmiştir.

5. Ömek Hazırlama ve PCR ile Deteksiyon: Ayrıca at eşek ve domuz etlerinden izole edilen DNA'nın su içinde 100, 10, 1, 0.1 ve 0.01 ng/µl konsantrasyonlarında dilüsyonları hazırlanmış ve geliştirilen PCR yöntemi ile test edilen hayvan türlerine ait deteksiyon limiti belirlenmiştir. Geliştirilen PCR yönteminin, taze ve işlenmiş et ürünlerindeki başarısını test etmek amacıyla at, eşek ve domuz etlerinden her birisi, 5 farklı seviyede (%0.0, 0.1, 0.5, 1.0 ve 5.0) sığır ve koyun etlerine ilave edilerek ikili et karışımları hazırlanmıştır. Hazırlanan ikili et karışımları, çiğ kıyma, sos, salam, 120°C'de ve 100°C'de ısıtma işlemi (30 dak.) uygulanmış çeşitli et ürünlerine işlenmiştir.

6. Piyasa ürünlerinin analizi: Erzurum ve Kayseri piyasasından toplanan 8 çiğ kıyma, 15 sucuk, 6 sos, 6 salam ve 5 kavurma örneği olmak üzere toplam 40 et ürünü; at, eşek ve domuz etlerinin bulunup bulunmadığı spesifik PCR yöntemiyle test edilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Bu araştırmada, at, eşek ve domuz türlerine spesifik sırasıyla; 153 bp, 145 bp ve 227 bp uzunluğunda ampliconlar üreten oligonükleotid primerler dizayn edilmiştir. Bu oligonükleotid primerlerin kullanıldığı PCR reaksiyonları sonucunda; her bir tür, 0.01 ng DNA seviyesinde ve diğer türlerle çapraz reaksiyon olmaksızın tespit edilebilmiştir.

Geliştirilen metodun başarısını test etmek amacıyla, çiğ kıyma, sucuk ve sos tipi et ürünlerine işlenen ve 100 °C'de 30 dak süreyle ısıtma işlemi uygulanan ikili et karışımlarının hepsinde; at, eşek ve domuz etleri, % 0.1'den % 5'e kadar olan tüm karışım seviyelerinde tespit edilebilmiştir. Buna karşılık, 120 °C'de ısıtma işlemi uygulanan et ürünlerinde ise hiçbir tür % 0.1 seviyesinde tespit edilememiş, ancak % 0.5 ve daha üzerindeki seviyelerde belirlenebilmiştir. İkili et karışımlarının sığır veya koyun etleriyle hazırlanmış olması, bulunan sonuçlar üzerinde etkili olmamıştır.

Sonuçta geliştirilen PCR metodu kullanılarak, Erzurum ve Kayseri piyasasından toplanan taze ve işlenmiş toplam 40 et ürünü test edilmiş ve ürünlerin hiçbirinin at, eşek ve domuz türlerine ait etler içermediği tespit edilmiştir.

Sonuç

Bu çalışmada taze ve işlenmiş et ürünlerinde at, eşek ve domuz etlerinin tespitinde kullanılmak üzere her bir tür için bir spesifik PCR metodu geliştirilmiş ve piyasadan toplanan örnekler test edilmiştir. Sonuçta; tüketicilerin korunması ve haksız rekabetin önlenmesi amacıyla et ve et ürünlerinin sürekli ve düzenli olarak kontrollerinin yapılması gerektiği ve dolayısıyla bu çalışma kapsamında at, eşek ve domuz türlerine ait etlerin tespitinde kullanılmak üzere geliştirilen spesifik PCR tekniğinin, ülkemiz gıda kontrol laboratuvarlarının bu konudaki ihtiyacını giderecek rutin bir kontrol metodu olabileceği sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

1. Ayaz, Y., Ayaz, N.D., Erol, İ. 2004. Elisa tekniği ile et ve et ürünlerinde tür tayini. I. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi. 29 Eylül-1 Ekim 2004. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dışkapı Kampusu/Ankara.
2. Brodmann, P.D., Nicholas, G., Schaltenbrand, P., Ilg, E.C. 2001. Identifying unknown game species: with nucleotid sequencing of the mitochondrial sitokrom b gene and a subsequent basic local alignment search tool search. Z. Lebensm. Unters Forsch. 212: 491-496.
3. DeSalle, R., Williams, A., George, M. 1993. Isolation and characterization of animal mitochondrial DNA. Meth. Enzymol. 224: 174-204.
4. Lockley, A.K., Bardsley, R.G. 2000. DNA based methods for food authentication. Trends in food Sci. Technol. 11: 67-77.
5. Mackie, I.M. 1996. Food Authentication, Ashurt & Dennis (Eds), Blackie Academic and Professional, London, U.K. 140-170.
6. Wolf, C., Lüthy J. 2001. Quantitive compatitive (QC) PCR for quantification of porcine DNA. Meat Sci., 57: 161-168.