Su Ürünlerinde Gıda Orijin Tespitinde Yaygın Kullanılan Moleküler Teknikler

Ercüment Aksakal[1]*, Nilgün Özdemir[1], Orhan Erdoğan[1], Abdulkadir Çiltaş[1]

[1]Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Bölümü, Erzurum
*eaksakal@atauni.edu.tr

Özet

Su ürünlerinde moleküler çalışmaların giderek artan bir önem kazanması, teknolojik gelişmelere ve ihtiyaca bağlı olarak değişen birçok yöntemin geliştirilmesine sebep olmuştur. Bu bağlamda; genomik DNA ve mtDNA üzerindeki bölgelerde; PCR, RFLP, RAPD, SSCP ve DNA baz dizilimi gibi bir çok moleküler teknik su ürünlerinde gıda orijininin tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle taze, dondurulmuş ve hatta işlenmiş (konserve, tuzlanmış, tütsülenmiş) örneklerin hangi orijinden olduğu rahatlıkla tespit edilebilir. Bu yöntemler basit, hızlı, düşük maliyetli, güvenilir, kullanımı çok yaygın, bilim alanındaki kabul edilebilirlik oranı ve popularitesi oldukça yüksektir. Bu derlemede su ürünlerinde gıda güvenilirliği sahasındaki uygulamalara farklı bir yaklaşım tarzı sunan moleküler çalışmaların teknolojileri, prensipleri, uygulama alanları, avantaj ve dezavantajları tartışılmıştır.
Anahtar Kelimeler: su ürünleri, Gıda orijini, Moleküler teknikler

Giriş

Son yıllarda hızlı bir gelişim sürecine giren moleküler markör teknolojisi tıp ve tarım başta olmak üzere, su ürünlerinde de canlı türleri arasındaki genetiksel farklılığın belirlenmesi, kromozom haritalamaları, gen kaynaklarının karakterize edilmesi ve gıda orijin tespitine yönelik yeni yöntemler ortaya koymuştur. Morfolojik ve biyokimyasal markörlerin uygulamadaki yetersizliklerini içeren klasik yöntemlere göre büyük avantajlar sağlayan moleküler markörler, polimorfiktirler ve çevresel faktörlerden etkilenmezler. Epistatik ve pleotropik etki göstermeyip son derece stabildirler (1-3).

Su ürünlerinde gıda orijin tespitinde kullanılan protein tabanlı klasik metotlar artık yerini genomik DNA ve mtDNA üzerindeki bölgelerde; RT-PCR, RFLP, mikrosatelit, SNP ve DNA baz dizilimi gibi moleküler tekniklere bırakmaktadır. Bu yöntemlerle taze, dondurulmuş ve hatta protein denatürasyonu gerçekleşmiş konserve, tuzlama, tütsüleme gibi işleme süreçlerine tabi tutulmuş örneklerin hangi orijinden olduğu rahatlıkla tespit edilebilir (4).

Su Ürünlerinde Gıda Orijin Tespitinde Kullanılan Moleküler Teknikler: Çoğu balık türünün morfolojik benzerliği ve işleme sürecinde morfolojik özelliklerinin

kaybolması, su ürünlerinde gıda orijin tespitini zorlaştırmaktadır. İşlenmiş ürünlerin tam bir doğrulukla identifiye edilmesi yalnızca gıda orijin ve kalitesinin belgelendirmesinde değil aynı zamanda toksik kimyasalları ihtiva eden örneklerin sebebiyet verebileceği riskleri de tespit edebileceği için önemlidir. Su ürünlerinde, morfolojik analizler ve protein tabanlı metotlarla; konserveleme, tuzlama, kızartma, tütsüleme ve pişirme gibi işleme süreçleriyle genel identifikasyon karakterleri kaybolan örneklerin hangi orijinden olduğunun tespiti mümkün olmamaktadır. Bu problemin giderilmesinde morfolojik analizlere alternatif olarak farklı birçok metot geliştirilmiştir. İlk başlarda HPLC (Yüksek basınçlı sıvı kromotografisi), CE (kapillar elektroforezi) ve IEF (izoelektrik fokuslama) gibi spesifik proteinlerin karakterizasyonu ve ayrışmasına bağlı elektroforetik teknikler kullanılmaktaydı. Ancak oldukça yüksek ısıl işleme maruz kalan örneklerde identifikasyona imkan veren proteinlerin biyolojik aktiviteleri, biyokimyasal yapıları ve kimyasal özelliklerini kaybetmesi bu metotlarla elde edilen sonuçların güvenilirliğini azaltmaktadır. Yine SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poli Akrilamid Jel Elektroforezi) ve IEF (İzo Elektrik Fokuslama) normal işleme sürecine tabi tutulmuş ürünlerde identifikasyon amaçlı kullanılabilmesine rağmen, ağır işleme sürecine tabi tutulmuş ürünler için güvenilir sonuçlar vermemektedir (5- 7). Son yıllarda DNA üzerindeki PCR tabanlı çalışmalar, elektroforetik, kromatografik ve immunolojik tekniklere bir alternatif olarak görülmektedir. Nükleik asitlerin analizi protein tabanlı tekniklerden daha avantajlıdır. Çünkü DNA tabanlı çalışmalarda örneğin işlenmiş olması, bireyin yaşı ve dokunun hangi kaynaktan olduğu önemli değildir. DNA yakın akrabalı türlerde bile karakterizasyonu sağlayabilen oldukça polimorfik baz dizilimleri içermektedir. Bu amaçla sucul organizmadan alınan doku örneğinden DNA izole edilir. DNA üzerinde istenilen bölge PCR aracılığıyla amplifiye edilir. PCR ürününe uygulanan farklı teknikler ile örneklerin hangi sucul organizmaya ait olduğu tespit edilebilir. Balık türleri arasındaki farklılığın belirlenmesinde kullanılan çoğu PCR metodu mtDNA'nın belirli bir bölgesindeki amplifikasyonu takiben baz dizilimi belirlenmesi veya RFLP esasına dayanır. MtDNA, nDNA'dan 5-10 kat daha hızlı bir gelişim göstermektedir. Birçok türde mtDNA oldukça değişken bir yapıya sahiptir ve bu nedenle mümkün olan genetik farklılıkların tespitinde iyi bir işaretleyici olarak kullanılmaktadır (8-15).

Alternatif olarak kullanılabilecek bir diğer metot da SSCP (Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi) dir. Bu metot ile baz dizilimi bilinmeyen PCR ürünlerinin jelde verdiği bant görüntüleri değerlendirilmektedir (16, 17). Ökaryotik türlerin identifikasyonunda, polimorfik olarak tekrarlanan DNA baz dizilimleri ve satelitleri içeren DNA gen ailesi (rDNA, SINE, LINE baz dizilimleri) diğer genetik markörler olarak düşünülebilir. Son zamanlarda balık türlerinin identifikasyonunda türe spesifik nükleer 5S rDNA geni üzerine yapılan PCR uygulamaları yaygın bir

hal almıştır. Genetik polimorfizm çalışmalarında ise RAPD (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) uygulamalarının çok kullanışlı olduğu görülmektedir. Son yıllarda RAPD metodunun, balık türlerinin identifikasyonunda kullanılıp kullanılamayacağı araştırılmaktadır (18). DNA baz diziliminin belirlenmesi ise pahalı bir metot olup kritik uygulamalarda kullanılır ve kesin doğrulukta sonuçlar vermektedir. Su ürünlerinde tür identifikasyonunda kullanılan teknikler Çizelge 1'de özetlenmiştir (19).

Çizelge 1. Su ürünlerinde tür identifikasyonunda kullanılan teknikler

Analiz	Kullanılan molekül tipi	Analiz tipi
^{13}C, ^{2}H, ^{1}H NMR	Lipid	Fingerprint
Elektroforez	Protein	Fingerprint
SDS-PAGE		
IEF		
^{2}D-elektroforez		
Peptit haritalama		
İmminolojik teknikler	Protein ve diğerleri	Tanınan hedef bölgeler
Blot hibridizasyon		
ELISA		
İmminohistokimya		
PCR,elektroforez, hibridizasyon	DNA	DNA Fingerprint
		RAPD
		RFLP ve prob hibridizasyonu
		Fingerprint-Konsensus primerlerle tanınan hedef bölgeler
		PCR-RFLP
		PCR-SSCP
		DNA baz dizilimi belirlenmesi
		SNP (Tek nükleotid polimorfizmi)
		Tanınan hedef bölgeler
		Türe özgü DNA baz dizilimi

Sonuç

Dünya nüfusundaki artışa paralel olarak gıda ihtiyacının artması güvenli gıda teminini zorlaştırmaktadır. Gıda ürünlerindeki ticari sahtekarlık olayları ve gıda güvenilirliğinin tespitininde, gıda orijinin belirlenmesi zorunlu olmaktadır. Klasik metotların uygulamadaki yetersizliği ve güvenilir olmayışı moleküler markörler kullanılarak yapılan uygulamaların önemini daha da arttırmıştır. Su ürünleri sahasında gıda orijin tespitinde; genomik DNA ve mtDNA üzerindeki bölgelerde; SSCP, RT-PCR, RFLP, mikrosatelitler, SNP ve DNA baz dizilimi gibi bir çok moleküler teknik kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle; - Taze, dondurulmuş ve hatta konserveleme, tuzlama, kızartma, tütsüleme ve pişirme gibi işleme süreçlerine tabi tutulmuş sucul organizmaların hangi orijinden olduğu rahatlıkla tespit edilebilir. - Basit, hızlı, düşük maliyetli ve güvenilir bir metottur. - Kullanımı çok yaygındır, bilim alanındaki kabul edilebilirlik oranı ve popularitesi oldukça yüksektir.

Kaynaklar

1. Avise JC. 1994, Molecular Markers, Natural History And Evolution, Chapman & Hall. International Thomson Publishing, p 3-359, New York.

2. Bretting PK, Widrlechner MP. 1995. Genetic markers and horticultural germplasm management. Hort. Sci., 30 (7); 1349-1356.
3. Aksakal E. 2005. Aras, Karasu ve Çoruh Havzalarından Yakalanan *Capoeta* sp.'lerin mtDNA Sitokrom-b Bölgesinde PCR-RFLP Yöntemi ile Genetik Farklılığın Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Ana Bilim Dalı, 41 sayfa.
4. Aksakal E, Erdoğan O. 2007a. PCR-RFLP Uygulamalarının Su Ürünlerinde Kullanım Alanları. Türk Sucul Yaşam Dergisi, Yıl 3-5, Sayı 5-8, 747-753.
5. Rehbein H. 1990. Electrophoretic techniques for species identification of fishery products. Zeitschrift furL ebensmittel Untersuchung und Forschung, 191, 1–10.
6. Sotelo CG, Pineiro C, Gallardo JM, Perez-Martin R. 1993. Fish species identification in seafood products. Trends in Food Science and Technology, 4, 395–401.
7. Knuutinen J, Harjula P. 1998. Identification of fish species by reversed-phase high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. Journal of Chromatography, 705, 11–2.
8. Barlett SE, Davidson WS. 1992. FINS (forensically informative nucleotide sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. BioT echniques, 12, 408–411.
9. Asensio LM, Gonzalez I, Cespedes A, Hernandez PE, Garcia T, Martin R. 2000. Identification of Nile perch (*Lates niloticus*), grouper (*Epinephelus guaza*), and wrek fish (*Polyprion americanus*) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of 12S rRNA gene fragment. Journal of Food Protection, 63, 1248–1252.
10. Russell VJ, Hold GL, Pryde SE, Rehbein H, Quinteiro J, Rey-Mendez M, Sotelo CG, Perez-Martin RI, Santos AT, Rosa C. 2000. Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 2184–2188.
11. Sebastio P, Zanelli P, Neri TM. 2001. Identification of anchovy (*Engraulis encrasicholus* L.) and gilt sardine (*Sardinella aurita*) by polymerase chain reaction, sequence of their mitochondrial cytochrome b gene and restriction anlysis of polymerase chain reaction products in semipreserves. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49, 1194–1199.
12. Hold GL, Russell VJ, Pryde SE, Rehbein H, Quinteiro J, Rey-Mendez M, Sotelo CG, Perez-Martin RI, Santos AT, Rosa C. 2001. Validation of a PCR-RFLP based method for the identification of salmon species in food products. European Food Research and Technology, 212, 385–389.
13. Bellagamba F, Moretti VM, Comincini S, Valfre` F. 2001. Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 3775–3781.
14. Aksakal E, Erdoğan O. 2007b. Use of PCR-RFLP Analysis of mtDNA cytochrome-b gene to determine genetic differences in *Capoeta* spp. The Isr. Journal of Aquaculture–Bamidgeh, 59(4), 206-211.
15. Hisar O, Erdoğan O, Aksakal E, Hisar SA. 2006. Authentication of fish species using a simple PCR-RFLP method. The Isr. Journal of Aquaculture–Bamidgeh, 58(1), 62-65.
16. Rehbein H, Kress G, Schmidt T. 1997. Application of PCR-SSCP to species identification of fishery products. Journal of Science and Food Agriculture, 74, 35–41.
17. Rehbein H, Stelo CG, Perez-Martin RI, Chapela-Garrido MJ, Hold GL, Russel VJ, Pryde SE, Santos AT, Rosa C, Quinteiro J, Rey-Martinez M. 2002. Differentiation of raw or processed eel by PCR-Based techniques: restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) and single strand conformation polymorphism analysis (SSCP). European Food Research and Technology, 214, 171–177.
18. Moretti VM, Turchini GM, Bellagamba F, Caprino F. 2003. Traceability Issues in Fishery and Aquaculture Products. Veterinary Research Communications, 27 (1), 497–505.
19. FAO. 2005. Application of modern analytical techniques to ensure seafood safety and authenticity. Iciar Martinez SINTEF Fisheries and Aquaculture Ltd Trondheim, Norway Department. FAO Fisheries Technical Paper, 455.