



Moleküler Metodların Gıda Kontrollerindeki Uygulama Alanları

Şehnaz ÖZATAY

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ezine Meslek Yüksekokulu, Ezine, Çanakkale, TÜRKİYE

*Sorumlu Yazar

sehnazozatay@comu.edu.tr

Geliş Tarihi : 15 Ocak 2012

Kabul Tarihi : 10 Şubat 2012

Özet

Gıda endüstrisinde özellikle gıda güvenliğinin kontrol edilebilmesi için hızlı yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Hızlı metotlara ihtiyaç duyulmasıyla birlikte çok sayıda tespit ve tanımlama sistemleri geliştirilmiştir. Moleküler alanda yaşanan gelişmeler sayesinde bu ihtiyaca cevap verebilecek nitelikte teknikler gıda mühendisliğinde uygulama alanı bulmaya başlamıştır. Başta mikrobiyolojik analizler olmak üzere genetiği değiştirilmiş ürünlerin, gıda bileşen ve kontaminantlarının da tespitinde bu metotlardan yararlanılmaktadır. Moleküler metotların duyarlılığı sayesinde geleneksel metotlarda rastlanan metodolojik hata olasılıklarının da önüne geçilmeye başlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Gıda kontrolü, moleküler teknikler, PZR (polimeraz zincir reaksiyonu)

Abstract

Rapid methods are needed for controlling of food safety in the food industry. A large number of systems were developed with require of rapid detection and identification methods. The techniques started to find applications in food engineering area to provide this need by thanks to advances in the molecular field. At first microbiological analysis, genetically modified products, food ingredients and contaminants are also detected by these methods. The common methodological error probabilities in traditional methods have also been prevented by sensitivity of molecular methods.

Key words: Food control, molecular techniques, PCR (polymerase chain reaction).

GİRİŞ

Son yıllarda çeşitli moleküler metotların geliştirilmesi ile birlikte bu metotlardan gıda kontrollerinde sıklıkla yararlanılmaya başlanmıştır. Son üründe bulunma olasılığı olan bitkisel veya hayvansal kaynaklı alerjen maddelerin, belli başlı gıda bileşenlerinin ve kontaminantların moleküler bazlı metotlar ile tespiti mümkün olabilmektedir [12, 22]. Genetik kelimesinin gıdalarla birlikte anılmaya başlaması ilk olarak genetiği değiştirilmiş gıdalar ile olmuştur. Bu gıdaların tespit edilmesinde yine moleküler metotlara başvurulmaktadır. Buna paralel olarak gıdalarda ve sularda bulunan mikroorganizmaların, örneğin patojen bakterilerin tespitinde de moleküler metotlardan yararlanılmaktadır [3]. Bu moleküler metotlardan en çok bilinen ve kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR, Polimerase Chain Reaction=PCR)'dur. PZR hızlı ve güvenilir bir tespit

yöntemidir. Moleküler metotların büyük çoğunluğu DNA bazlı metotlardır. DNA stabil bir molekül olması, bazı viruslar hariç tüm canlılarda bulunarak genetik bilgiyi içermesi açısından oldukça ideal bir markördür [3]. mRNA'nın kullanıldığı ve günümüzde rRNA'dan yararlanılan metotlar da bulunmaktadır [24]. DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ve FISH (Fluorescence in situ Hybridisation) gibi moleküler metotlar arasındadır [8,26,29]. DNA bazlı metotların gıdalarda kullanılmasında DNA'nın ekstraksiyonu, purifikasyonu ve ayrıca PZR'nu inhibe edebilecek bileşenlerin ortamdan uzaklaştırılması oldukça önem teşkil etmektedir [22, 27]. Örnek alma, örnek hazırlama, deteksiyon aşamaları ve protokol seçimi sırasında dikkat edilmesi gereken hususlar söz konusu olmaktadır [12, 22,24].

Tablo 1. DNA Ekstraksiyonu Öncesinde Gıda Örneklerine Uygulanan Ön İşlemler ve Homojenizasyon Prosedürleri [27]

Prosedür	Metot	Kullanımı/Sonuçları	Avantajları	Dezavantajları
Homojenizasyon	Stomacher	Un, protein tozları, tofu veya soya sosları için iyi bir yöntemdir.	Kontaminasyon riski yoktur.	Soya fasulyesi ve mısır örneklerinde karıştırmada yetersiz kalabilir.
	Havan/Öğütücü	Soya, mısır ve öğütülecek tahıllar gibi partiküllü örnekler için iyi bir yöntemdir.	İyi bir karıştırma sağlar.	Kontaminasyon riski vardır.
	Karıştırma/Çalkalama	Sıvı örnekler için iyi bir yöntemdir.	Kontaminasyon riski yoktur.	Sadece sıvılarda kullanılabilir.
Ön İşlemler	NaOH ile Muamele	Asidik örneklerin nötralizasyonu.	Soya sosları, ketçap veya meyve sularında ekstraksiyon verimini arttırmaktadır.	Protokole ilave bir basamaklıdır.
	Hekzan ile Muamele	Örnekten yağları uzaklaştırır.	Katı ve sıvı yağların ve yağ içeren örneklerde ekstraksiyon verimini arttırmaktadır.	
	Termamil ile Muamele	Sıvı tamponda dağılan nişastayı parçalar.	Nişasta içeren örneklerde ekstraksiyon verimini arttırmaktadır.	

Örnek Alma Ve Örnek Hazırlama

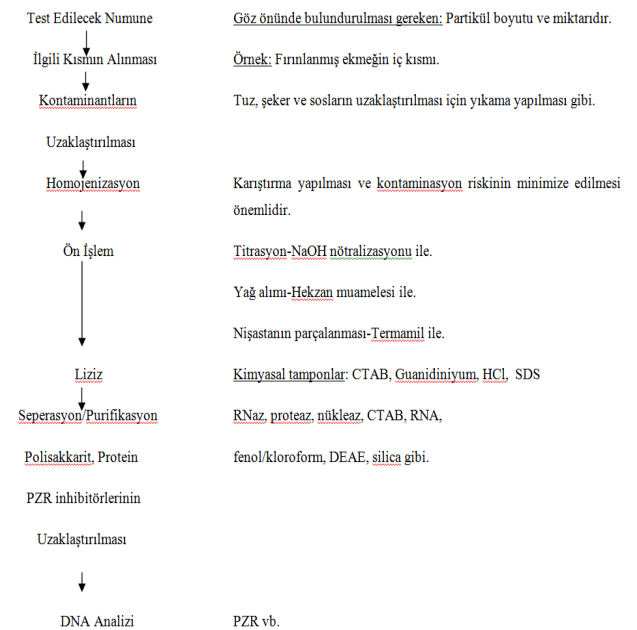
Örnek Alma (Sampling)

Uygun örnek alma planının belirlenmesinde analiz edilecek materyalin türü oldukça önem teşkil etmektedir. İncelenecek örneğin hammadde veya işlenmiş son ürün olup olmadığı örnek planının karar verilmesinde en belirleyici faktör olmaktadır. Heterojenitenin seviyesi de uygun örnekleme planının oluşturulmasında önemli bir kriterdir [12]. Analiz için alınan parçanın analiz edilecek örneği veya hedef kısmı temsil edebilecek miktarda olmasına dikkat edilmelidir. Homojen örneklerde (örneğin bir tohum veya tek bileşenli bir gıda maddesinde) numunenin bütünü alınan temsili miktar olarak kabul edilmektedir. Temsili test porsiyonunun elde edilmesinde sıvı örnekler yeterli miktarda karıştırılarak veya çalkalanarak homojenize edilmelidir. Katı örneklerin ise Tablo 1’de belirtilen yöntemler ile homojenize edilmesi gerekmektedir. Kontaminasyona neden olan öğütme ve ezme tekniklerinden mümkün olduğunca uzak durulmalıdır. “Stomach blender” olarak bilinen homojenizasyon tekniği ise kontaminasyonu azaltmaktadır, ancak soya fasulyesi ve mısır gibi ürünlerin karıştırılmasında yetersiz kalabilmektedir [27]. DNA amlifikasyonunun verimliliğini arttırabilmek için örnek alma sırasında numunenin steril ve siyah renkte poşetler içine alınarak dondurulması önerilen örnek alma şekillerindedir. En doğru bulunan ise örnek alınmasından birkaç saat sonra DNA ekstraksiyonuna başlanmasıdır [3].

Örnek Hazırlama

Hammadde durumundaki bileşenler dışındaki birçok gıda örneği fiziksel, kimyasal ve enzimatik işlemlerden geçmiş ve dolayısıyla içeriğindeki DNA ve proteinler degrades veya modifiye olmuş durumdadır. Uzun süreli ısıl işlem DNA ve protein degradasyonuna sebep olduğu gibi düşük pH’da DNA’nın hidrolizine yol açabilmektedir [22, 27]. Gıdalarda bulunan bakterilerin PZR bazlı metotlar ile tespit edilebilmesi için uygun örnek hazırlama metotlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Uygun örnek hazırlama basamakları, bakterinin konsantr

edilmesi, DNA’nın ekstraksiyonu ve reaksiyonu inhibe edecek bileşenlerin ortamdaki uzaklaştırılması şeklindedir. Gıdalardan veya analiz için zenginleştirilmiş ortamlardan DNA’nın ekstraksiyonu için çeşitli metotlar geliştirilmiştir. DNA’nın bakteri hücrelerinden çıkarılması amacıyla lizozim ve/veya proteinaz K gibi enzimler kullanılabilmekte, su veya denatürasyon çözeltisi içinde kaynatma veya ısıtma yapılabilmektedir. Bakteri hücrelerinden çıkarılmış DNA’nın PZR’nu inhibe eden maddelerden uzaklaştırılması cam boncuklarla, afinite kolonlarıyla veya Glassmilk gibi ticari matrikslerle olabilmektedir [21,27]. Çoğaltılabilir miktarda DNA’nın elde edilebilmesi ve yanlış-negatif sonuçların önlenmesi için örnek miktarının yeterli miktarda olması

**Şekil 1.** PZR’na kadar geçleştirilen aşamaları akım şeması [27];

önemlidir. Rutin analizlerde genellikle uygun test porsiyonunun miktarı 1-5 gram civarında olmaktadır [27]. Fakat genellikle yüksek duyarlılıkta PZR için DNA ekstraksiyonunda 100 mg ve 350 mg bitkisel materyal yeterli olabilmektedir [12].

Kısaca DNA ekstraksiyonu, organizmanın mekanik veya kimyasal yollarla parçalanması, nükleik asit dışındaki maddelerin (proteinler, polisakaritler vb.) çöktürülmesi ve uzaklaştırılması ve nükleik asitlerin çöktürülerek uzaklaştırılması şeklinde açıklanabilir [3]. Elde edilen DNA moleküler analizler için kullanılabilir durumdadır. Eğer çalışmada RNA molekülünden yararlanılacak ise yine benzer fakat RNA'nın hassaslığından kaynaklı daha özel yöntemlere başvurulması gerekmektedir [29].

Moleküler Teknikler

Polimeraz zincir reaksiyon tekniğinin geliştirilmesiyle birlikte bu teknik hibridizasyon temelli yöntemlerin yerini almaya başlamıştır. Hibridizasyon temelli yöntemlerin dezavantajı, doğru sonuçların elde edilebilmesi için çok fazla sayıda hedef mikroorganizma hücresine (yaklaşık 10^4 - 10^5) ihtiyaç duyulmasıdır. İlk olarak 1980'li yıllarda in vitro teknikler ile DNA polimeraz enzimi, hedef nükleik asit sekansları ve primerler kullanılarak amplifikasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bakteriyel gıda patojenlerinin PZR bazlı metotlar ile tespiti ise ilk defa 1990'lı yıllarda gerçekleştirilmiştir [8]. PZR reaksiyonunun temel mantığı çift zincirli DNA molekülüne ısı işlem uygulandığında iki zinciri birbirine bağlı tutan hidrojen bağlarının kopması prensibine dayanmaktadır. Reaksiyonun mekanizması incelendiğinde her PZR'nun istenilen sayıda tekrarlanabilen döngülerden oluştuğu görülmektedir. Bir PZR döngüsü üç adımdan oluşmaktadır. İlk adım, çift sarmallı DNA iplikçiklerinin yüksek sıcaklıkta birbirlerinden ayrıldıkları denatürasyon, ikinci adım; çoğaltılması istenen hedef DNA bölgesinin iki ucuna spesifik 20-30 baz uzunluğuna sahip ayrı iki nükleotidin yine uygun sıcaklıkta hedef DNA'ya yapışmaları, üçüncü adım ise yeni çift zincirli DNA'lar şeklinde uzamasıdır. Bu adımlardan her birinin gerçekleşmesi için farklı sıcaklıklar gerekmektedir. Bu üç adım standart bir PZR reaksiyonunda yaklaşık 30-35 kez tekrar edilerek polimerizasyon ürünü her üç adımlı döngüden sonra bir önceki döngüye göre iki kat artar. PZR'nun en önemli özelliği ise çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamasıdır [21,26].

Konvansiyonel PZR yönteminden sonra PZR bazlı yeni metotlar geliştirilmiştir. Konvansiyonel PZR'nun hem canlı hem cansız hücrelerin varlığını birlikte tespit etmesinden dolayı dezavantajlı yönü de bulunmaktadır. Yani tüm hücrelere ait nükleik asitleri tespit etmektedir. Bu durum özellikle canlı mikroorganizmaların tespit edilmesinde oldukça önemli bir ayrıntıdır. Bu durumda, DNA bazlı tespit yanısıra RNA bazlı yöntemler daha çok tercih edilmektedir. Bu yöntemlerden RT (reverse transcriptase)-PZR bakterilerin RNA bazlı tespitinde kullanılacak en uygun tekniklerdir [9,26]. RNA molekülü PZR ile çoğaltılmadığından PZR aşamasından önce RNA ters transkriptaz (reverse transcriptase) enzimi kullanılarak cDNA (komplementer DNA)'ya çevrilir. Ardından DNA, PZR ile çoğaltılır. Bu sentezler aşaması RT-PZR olarak adlandırılmaktadır [4,21,26].

Konvansiyonel PZR tekniğinin yetersizliklerinin giderilebilmesi için Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) geliştirilmiş ve yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. PZR yönteminde verimin düşmesi,

reaksiyon sırasında kimyasalların azalmasından, ampliconlar arasında primerler için rekabetin oluşmasından ve döngü sayısı arttıkça polimeraz enziminin aktivitesini kaybetmesinden kaynaklanmaktadır. GZ-PZR bu dezavantajların ortadan kaldırılmasına olanak sağlamasıyla birlikte, düşük hücre konsantrasyonunda kantitatif saptama olanağı sağlamaktadır [8,11,26]. GZ-PZR yöntemi her bir amplifikasyon döngüsünde ölçülebilir floresans sağlaması sonucunda, artan floresans miktarını grafik haline getirerek miktarın tayin edilmesi esasına dayanmaktadır. Bu sayede GZ-PZR sonucunda elde edilen DNA fragmentleri PZR işlemi sırasında analiz edilebilmektedir. PZR yönteminde DNA miktarı tayini için kullanılan zorunlu agaroz jel elektroforezi ve UV ışık altında görüntülenmesi adımlarına GZ-PZR yönteminde gerek duyulmamakta ve işlem son derece hızlı ve güvenilir bir şekilde gerçekleşmektedir [8]. GZ-PZR'nun en büyük avantajı çok hızlı olmasıdır [4, 12]. Oluşan PZR ürünlerinin miktarı sinyallerdeki artış ile orantılıdır [24]. Ayrıca sonucun ne olduğunu görmek için tüm döngülerin tamamlanmasına kadar beklemeye gerek yoktur [4]. Sinyallerdeki artış her döngüde görüntülenebilmektedir. PZR'nundaki kantitatif bilgiler DNA miktarının logaritmik olarak artış gösterdiği döngülerden elde edilmektedir. Genellikle, eğrinin logaritmik lineer kısmında 30-40 döngüden sadece 4-5 döngü bu aralığa düşmektedir [24]. Bu yöntemle sonuçlar saatler veya günler değil dakikalar içinde alınabilmektedir [4].

Multipleks PZR tekniği farklı bir PZR amplifikasyonuna sahip bir yöntemdir. Aynı hedef bölge üzerinde farklı bölgelerin primer çiftleriyle tek bir tüp içinde çoklu amplifikasyon yaparak tespiti izin veren bir yöntemdir. Bu yöntemin en büyük avantajı daha az kimyasal bileşen ile birkaç reaksiyonun aynı anda gerçekleştirilebilmesidir [4].

Denatüre Gradyent Jel Elektroforezi (DGJE) (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: DGGE), aynı uzunlukta fakat farklı dizilimde olan DNA parçalarının denatürant üre ve formamid gradyenti oluşturulmuş poliakrilamid jel üzerinde elektriksel alanda hareketi prensibine dayalı bir ayırma yöntemidir. Gıda mikrobiyolojisinde ve gıda ile ilişkili ekosistemlerde DGJE yönteminin birçok uygulaması bulunmaktadır. Gıdalardan izole edilen laktik asit bakterileri 16S rDNA bölgeleri çoğaltılarak DGJE yöntemi ile belirlenmiştir. Buğday ekmeğinden izole edilen *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar PZR-DGJE yöntemi ile tür düzeyinde tanımlanabilmiştir. Fermente ürünlerde ve fermentasyon süresince bakteriyel değişimi takip edebilmek için DGJE yöntemi kullanılmıştır [1,9,18].

FISH (Fluorescence *in situ* Hybridisation), ilgilenilen mikroorganizmanın sahip olduğu 16S ve 23S Ribozomal RNA (rRNA) moleküllerine spesifik oligonükleotid problemlerin kullanılması ile, hızlı ve oldukça etkin bir şekilde mikroorganizma sayılarının saptanmasını sağlamaktadır. FISH tekniği moleküler genetiğin duyarlılığını, mikroskopun sağladığı görsel avantaj ile birleştirilerek her bir mikroorganizmanın kendi doğal ortamında görüntülenmesini ve tanımlanmasını sağlamaktadır [17,29]. Bu amaçla hibridizasyon temelli veya PZR bazlı ticari kitler de piyasada mevcut bulunmaktadır [24].

Kontaminasyon, İnhibisyon ve Alınması Gerekli Önlemler

Ekstrakte edilen DNA'nın saflığının arttırılabilmesi için DNA'nın bulunduğu matrikse (gıda materyali) uygun ekstraksiyon prosedürünün uygulanması gerekmektedir. Yağlar, polisakaritler, polifenoller ve diğer sekonder bileşikler PZR analizinde en çok sorun yaratan inhibitör maddelerdir. Kompleks

Tablo 2. Potansiyel PZR İnhibitörleri ve Önleyici Faaliyetler [27]

İnhibitör Maddelerin Kaynakları	İnhibitör	Önleyici Faaliyet
Matriks (Gıda Materyali)	Protein	SDS, CTAB, Guanidinyum tamponları, Proteinaz K
	Polisakkarit	Depolimeraz(amilaz), CTAB tamponu, kloroform ekstraksiyonu
	Yağ	Lipaz veya hekzan muamelesi, kloroform ekstraksiyonu
	Fenolikler	PVP, PVP/amonyum asetat
	Tuz	Yıkama (silica veya DEAE ve %70'lik alkolle yıkama)
	Asit	Ekstraksiyon öncesi NaOH ile nötralizasyon
Ekstraksiyon prosedürü	Tuz	Silica veya DEAE ve %70'lik alkolle yıkama
	EDTA	DEAE saflaştırması
	Organik Kalıntılar	%70'lik alkolle yıkama
	İzopropanol	Pellet kurutulur ve tekrar süspansiyon haline getirilir
	SDS/CTAB/Guanidinyum	Silica veya DEAE ve %70'lik alkolle yıkama

gıda matrikslerinden DNA izolasyonunda farklı varyasyonları ile iki çeşit DNA izolasyon metodu tercih edilmektedir. Birincisi CTAB metodu, diğeri ise ticari olarak satılan DNA-binding silika kolonları ile izolasyon metodudur. Bu iki protokol karşılığında CTAB gibi deterjan bazlı metotlarla elde edilen DNA'nın veriminin yüksek olduğu ancak DNA kalitesinin silika kolonlu metotlardan elde edilene göre daha düşük olduğu ve daha zaman alıcı metotlar oldukları tespit edilmiştir [12, 22]. Zenginleştirilmiş ortamdan alınan örneğe uygulanan PZR ortamdan ve gıda bileşenlerinden etkilenebilmektedir. Genellikle santrifüj, filtrasyon ve yıkama basamaklarından oluşan örnek hazırlama yöntemi bu tip inhibisyonların önlenmesinde etkili ve hatta yeterli olabilmektedir [22,24].

Özellikle gıda patojenlerinin tespitinde PZR bazlı metotların kullanılması sırasında reaksiyonun kontaminasyonu veya ölü bakterilerin tespit edilmesine bağlı olarak yanlış pozitif reaksiyonların görülmesi gibi birçok problem olabilmektedir. Yeterli miktarda numune ile örnek hazırlama ve PZR reaksiyonunun optimizasyonu ile bu tip problemlerin önüne geçilebilmektedir [24].

Tekrar edebilir ve güvenilir amplifikasyon için mililitre örnek başına yaklaşık 10^3 bakteri yeterli olmaktadır. Ancak, gıda örneğindeki bileşenler, büyüme ortamı ve DNA ekstraksiyon çözeltisi PZR'nun hassasiyetini azaltabilmektedir. Örneğin, sütte bulunan proteinaz enzimi Taq DNA polimeraz enzimini degrading ederek reaksiyonu inhibe edebilmektedir. Yine sütte bulunan kalsiyum iyonları PZR'nun inhibisyonuna neden olan en önemli etmenlerden biridir. Bu durum reaksiyondaki magnezyum konsantrasyonunun artırılması ile önlenmektedir. Örneğin seyreltilmesi de inhibisyonun önüne geçmek için etkin olabilecek en kolay yollardan birisidir. Fakat bu durumda PZR'nun hassasiyetinin de etkilenebileceği göz ardı edilmemelidir. PZR'ndan önce uygulanan kısa süreli bir zenginleştirme basamağı gıdada bulunan bakterilerin çoğaltılmasını sağlarken PZR inhibitörlerinin de seyrelmesine yardımcı olmaktadır. Ancak, kullanılan bazı zenginleştirilmiş ortamlar PZR amplifikasyonunu inhibe edebilmektedir [23,24].

PZR sırasında yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlar görülebilmektedir. Bu sonuçlardan kurtulabilmek için metodun içinde kontrollerin kullanılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Yanlış negatif sonuçları önleyebilmek için internal standartlar kullanarak inhibitörlerin bulunmadığını kanıtlayan bir kontrol

PZR yapılması gerekmektedir. Genellikle analiz edilecek ürünün içinde bulunan hedef sekans kullanılarak ayrı bir PZR ile DNA kalitesi kontrol edilebilir. Yanlış negatif sonuçlar, PZR ajanlarının inaktivasyonu sonucunda da meydana gelebilir. PZR ajanlarının kalitesinin kontrol edilebilmesi amacıyla pozitif kontroller kullanılır. Bu işlem, saf hedef DNA ile yapılacak deteksiyon limitleri yakın bir PZR gerçekleştirerek, PZR ajanlarının kalitesinin test edilmesiyle şeklinde yapılmaktadır. PZR ajanlarının ve laboratuvarın kontaminasyonu sonucu olan yanlış negatif sonuçlar ise reaksiyon ortamında DNA olmadan PZR'nun gerçekleştirilmesi ile test edilebilir [12].

Yanlış pozitif reaksiyonlar, örneklerin birbirleriyle kontaminasyonu sonucu meydana gelebilmektedir fakat en önemli kontaminasyon kaynağı aynı hedefe ait bir önceki amplifikasyondan kalan DNA olmaktadır. Bu nedenle, PZR'nda kullanılan tüm ajanların hazırlanıp alikotlara ayrıldıktan sonra PZR amplifiye ürünlerinden ayrı bir alanda saklanmaları gerekmektedir [24].

Yanlış pozitif reaksiyonların önlenmesi için PZR'nun gerçekleştirildiği laboratuvarlarda anti kontaminasyon önlemlerinin alınması gerekmektedir. PZR öncesi yapılacak sterilizasyon işlemi bu açıdan oldukça önem taşımaktadır. Laboratuvar yüzeylerinin, rakların ve pipetlerin sterilizasyonu oldukça önemlidir. Bunun için çoğunlukla kısa dalga boyulu UV irradiasyon yönteminden yararlanılabilmektedir. Tüm bunlar ile birlikte aerosol pipet uçlarının, steril plastiklerin ve cam kapların kullanılması da dikkat edilmesi gereken önemli noktalardan biridir. Ayrıca ısıtma başlığı olan PZR makinelerinde çalışılırken çok hassas bir reaksiyonun gerçekleştirilebilmesi için reaksiyon karışımının üzerine bir tabaka mineral yağının kullanılması da kontaminasyon problemini azaltacak yöntemler arasında bulunmaktadır. Sodyum hipokloritlerin kullanılması hem nükleik asitlere hem de bakterilere zarar verebilmektedir. Ancak, etanol ve dettol gibi dezenfektanlar sadece bakterilerin kendilerine etki ederken nükleik asitlerine zarar vermezler [24].

GDO Analizi

Genetik modifiye gıdaların tespiti için PZR temelli metotlar, ticari kitler, biyosensörler ve mikroçipler ve diğer farklı metotlar bulunmaktadır [19]. Genellikle iki farklı tipte genetiği değiştirilmiş gıda bulunmaktadır: genetiği değiştirilmiş işlenmemiş gıdalar ve az miktarda genetiği değiştirilmiş ürün

içeren işlenmiş gıdalar. Amerika'daki marketlerde genetiği değiştirilmiş işlenmemiş gıdalar, geniş çeşitlilik göstermektedir. Elma, kuşkonmaz, arpa, pancar, havuç, üzüm, kivi, mısır, kavun, papaya, biber, patates, kanola, pirinç, soya, yerfıstığı, şeker kamışı, domates ve buğday bu gıdalar arasındadır. Dünya genelinde üretimi yapılan soya ve mısır bitkileri, oldukça büyük oranlarda genetik modifikasyonlar sonucunda elde edilmektedir. Genetiği değiştirilmiş soya içeren işlenmiş gıda örnekleri; ekmek, şekerlemeler, erişte, unlu mamül bileşenleri, bisküviler, tahıllar, dondurma, çikolata ürünleridir. Mısır, soya fasulyesi kadar geniş alanda kullanılan bir ürün değildir, ancak, işlenmiş mısır birçok ürünün içinde bulunabilmektedir [7]. GDO'lu ürünlerin tespit edilmesinde hedef DNA olarak kabul edilen promotör ve terminatör genleri markör gen olarak görev almaktadır. Başlangıçta GDO'lu ürünlerin tespit edilmesinde genellikle ticari olarak kullanılan karnabahar mozaik virüsüne ait 35S promotörü ve Agrobacterium'a ait NOS terminatöründen yararlanılmıştır. Genel taramada bu genetik elementler hedef sekans olarak kullanılmışlardır [15]. PZR sonunda bu amplifikasyon ürünlerine rastlanmaması transgenik sekansların ürün içinde bulunmadığının yani ürünün GDO'suz olduğunun göstergesi olmuştur. Bu genetik materyallere rastlanması ise ürünün GDO'lu olduğunu ya da ürünün karnabahar mozaik virüsü veya Agrobacterium tarafından kontamine olduğunu göstermektedir [14]. Bu hedef bölgelerin bulunmadığı ürünlerde GDO'nun tespit edilmesi zorlaşmakta hatta imkansız olabilmektedir. Çünkü, bu durumda aktarılan bölgeye veya yeni bölgenin entegre olduğu yakın bölgelerin sekanslarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bilginin de bulunmadığı durumlarda GDO varlığının tespit edilmesi imkansız olmaktadır [12,16].

Avrupa Birliği kapsamında getirilen bazı kısıtlamalar ile ürünlerin içinde % 0.9'luk bir GDO miktarına izin verilmektedir. Bu doğrultuda genetik materyalin kantitatif olarak tespit edilmesi ihtiyacı oluşmuştur. Kantitasyon amacıyla geliştirilen Gerçek Zamanlı PZR ile GDO varlığının tespit edilmesi ve kantitasyonu etkin bir şekilde yapılabilmektedir. Bu yöntem ile bir çok tarımsal ve gıda ürününde GDO varlığı analiz edilebilmektedir. Metodun doğruluk derecesi, GDO'nun cinsine, gıdanın yapısına ve geçirdiği proseslere göre değişiklik göstermektedir. Ayrıca, örneklerde düşük miktarda GDO'nun bulunması hatalı sonuçların elde edilmesine neden olabilmektedir [12,16].

Mikroorganizmaların Tespit Edilmesi

Gıda kaynaklı hastalıklar, gıdaların patojenik mikroorganizmalar ile kontamine olmasıyla ortaya çıkan özellikle gıda hijyeninin zayıf olduğu ülkelerde önemli problemlerden biridir. Moleküler metotlar ile tüketicilerin sağlığını riske atabilecek *C.jejuni*, *Y.enterocolitica*, *Salmonella*, *L.monocytogenes*, *E.coli*, *B.cereus*, *Shigella sp.* ve *S.aureus* gibi mikrobiyal kontaminantlardan hızlı bir şekilde tespit edilebilmektedir. Bu gıda patojenlerinin klasik metotlar ile tespit edilmesi oldukça zaman alıcıdır. İzolasyon, biyokimyasal tanımlama ve serolojik testlere ihtiyaç duyulabilmektedir. Bu nedenle, son yıllarda moleküler metotlar tercih edilmeye başlanmıştır. 1990 yılında ilk kez bakteriyel gıda patojenlerinin PZR bazlı metotlarla tespiti gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla piyasada ticari olarak bulunan birçok hızlı tespit kiti bulunmaktadır. Bu testler, antikor bağlı aglutinasyon metotlarından, DNA amplifikasyon metotlarına kadar değişim gösteren metot çeşitleridir. ELISA hızlı yöntemler arasında sayılan bir metot iken PZR bazlı metotların geliştirilmesiyle

daha hızlı olmalarından dolayı ELISA yönteminin yerini almaya başlamışlardır. Doğal olarak bulunan mikroorganizma ile test mikroorganizmaları arasındaki yarışma seviyesi kullanılan ortamın seçiciliğine bağlı olmaktadır [2]. *Salmonella* bakterisinin PZR ile tespit edilebilecek sayıya ulaşabilmesi için inkübasyon süresinin 16-20 saat olması yeterlidir, ancak *L.monocytogenes* için klasik yöntemde yapıldığı gibi inkübasyon süresinin kısaltılması her örnek tipinde önerilmemektedir, özellikle de yumuşak peynir grubunda bu şekilde olmaktadır [2,12]. Gıda kaynaklı hastalıklara neden olan üç bakteriden biri olan *Staphylococcus aureus* bakterilerine ait enterotoksin genlerinin belirlenmesi üzerine çok fazla sayıda çalışma yapılmış olup serolojik yöntemlere göre daha yüksek başarı elde edilmiştir [2,10,13]. *Bacillus cereus* bakterileri de *S.aureus* gibi enterotosijeniktir. Bu toksinlerin üretiminden sorumlu genlerin tespit edilmesi üzerine birçok çalışma yapılmış olup faklı PZR yöntemleri denenmiştir [5,6]. Romero ve ark. (1995) yaptıkları çalışmada gram negatif aerobik bir bakteri olan, insan ve hayvanlarda enfeksiyona neden olan *Brucella* türlerinin PZR ile hızlı olarak tespit edilebilmesi için farklı primer kombinasyonlarını deneyerek uygun olanlarını belirlemeye çalışmışlardır [25].

Gıdalardaki bakteriyel patojenler PZR ile direkt olarak tespit edilebilmektedir ancak hassas bir yöntemin kullanılması gerekmektedir. Bu şekilde gösterilen hassasiyetler özellikle büyük laboratuvarlarda kontaminasyondan kaynaklanan problemlerin önlenmesini sağlamaktadır [24].

Kültürlerin konfirmasyonunda PZR tanımlayıcı bir araç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, karışık kültürleri içeren seçici agar ortamında veya ön zenginleştirme yapılmış ortamların kullanılması da gıda ürünlerinde bulunan bakterilerin konvensiyonel yöntemlere göre daha kısa süre de tespit edilmesini sağlamaktadır. Tekrar eden genetik elementler spesifik PZR'larında hedef olarak kullanılmaktadır. Örneğin, *Brucella* türlerinde IS711 ve *Salmonella* türlerinde IS200 bölgeleri gibi. Flagellin genleri de *Campylobacter* türleri için hedef bölge olarak kullanılabilir [8]. Bakterilerin tespit edilmesinde 16S rDNA'nın hedef gen olarak seçilmesi başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. Birçok bakteride çok sayıda bulunması ve uzunluğu (yaklaşık 1500 bp) nedeniyle 16S rDNA çoğunlukla hedef gen olarak seçilmektedir [3].

Gıdalar ve hayvan yemleri fungal organizmalar tarafından kontamine olabilmektedir. Hayvan yemi ve gıda kaynaklı filamentli küfler bir veya daha fazla mikotoksin üretme kapasitesindedirler. Bu küfler hem insanlar hem de hayvanlar üzerinde toksik ve kansinojenik etkiye sahiptir. Bu nedenle hızlı ve spesifik metotlara ihtiyaç duyulmaktadır. Mikotoksinler değişim gösterebilen farklı kimyasal yapılara sahiptirler. Bu nedenle tek bir metotla tüm mikotoksinlerin tespit edilmesi mümkün değildir. Mikotoksinlerin moleküler metotlar ile tespit edilmesi son yıllarda en çok tercih edilen teknikler arasındadır. Örneğin, aflatoksin, patulin, okratoksin, trikotisin ve fümösün PZR metodu ile tespit edilebilmektedir. Ancak, mikotoksinler PZR bazlı metotlar ile direkt olarak tespit edilememektedirler. Mikotoksinlerin biyosentez yolakında yer alan genlerin belirlenmesi ile doğru ve hızlı bir şekilde tespitleri gerçekleştirilebilmektedir. Negatif sonuçların elde edilmesi analiz edilen üründe her hangi bir mikotoksinin bulunmadığını gösterir. Bu durumda, sadece pozitif sonuç elde edilen örneklerde analiz fizikokimyasal metotların kullanılmasıyla neticelendirilmelidir. Son yıllarda sensör yüzeyine immobilize edilmiş spesifik antikorlar kullanılarak mikotoksinlerin veya

mikotoksijenik fungusların tespit edilmesine çalışılmaktadır. Özellikle dokuz farklı tipteki toksinin aynı anda tespit edilmesi üzerine çalışmalar sürdürülmektedir [27,28,29].

Türlerin, Gıda Bileşenlerinin ve Kontaminantların Tanımlanması

Birçok ülkede farklı türlere ait etlerin birbirine karıştırılması durumuna rastlanabilmektedir. Özellikle, ucuz etler ile yapılmış olgunlaştırma veya dini açıdan oluşan spesifikasyonların (Örneğin, Yahudiler için koşer, Müslümanlar için helal durumu gibi) tespit edilmesi önemli konular arasındadır. Bu nedenle bu tip gıdalarda türlerin hızlı ve güvenilir bir şekilde tespit edilebilmesine ihtiyaç duyulabilmektedir. Türlerin aydınlatılmasında kullanılan protein bazlı metotlar spesifik ve hassaslardır ancak çok yakın türlerin çapraz reaksiyonu nedeniyle kesin sonuçlar elde edilememektedir. Ayrıca, etlerin ısısal işlem görmesi sonucunda proteinlerin denatüre olması da protein bazlı metotlar ile tespiti güçleştirmektedir. Bu nedenle günümüzde PZR bazlı metotların kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. Genellikle iki farklı yaklaşımdan yola çıkılmaktadır. Birincisi türe spesifik primerlerin kullanılmasıyla, ikincisi ise tüm türlerde bulunan korunmuş bölgeyi tespit edecek primerlerin kullanılması ile aranan türün tespit edilme şeklinde olabilmektedir. PZR bazlı metotlar değişik çeşitte hayvan türlerine ait et ürünlerinin tanımlanmasında güvenilir şekilde kullanılmaktadır [12,21,27].

PZR bazlı metotlar gıda bileşenlerinin de tespit edilmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin, et ürünlerinde soyanın, buğdaydan elde edilmeyen ürünlerde buğday varlığının veya alerjenlerin tespit edilmesi bu kapsamda sayılabilir. Tespit amacıyla araştırılan türe spesifik primerler kullanılmaktadır. Alerjen maddelerin tespit edilmesinde ELISA metodu halen tercih edilen bir metot konumundadır. Ancak, bazı durumlarda bu immünojenik testler hassaslık ve spesifiklik açısından yeterli olamayabilmektedir. Bu durumda PZR bazlı metotlara başvurulmaktadır [11,20,27].

SONUÇ

Gıda mühendisliğinin neredeyse hemen her alanında uygulanma noktası bulan moleküler metotlar bazı klasik metotların yerini almaya başlamıştır. Hızlı olmaları açısından büyük kazanç sağlarlarken aynı zamanda klasik yöntemlere göre daha hassastırlar. Böylelikle tespit sırasında oluşabilecek hatalarında önüne geçilmesi sağlanmaktadır. Moleküler tekniklerin özellikle tıp alanında uzun zamandır kullanılmalarından dolayı birçok mikroorganizmanın tespit metodu moleküler bazda geliştirilmiş durumdadır. Bu durum gıdalarda bulunan benzer mikroorganizmalarında tespitinin kolaylaştırılmasını sağlamıştır.

Ayrıca gümrüklerde denetimlerin artırılması ile birlikte bir gıda ürününün serbest dolaşıma geçmeden önce birçok analize tabii tutulması gerekmektedir. Özellikle dünya genelinde bazı salgın hastalıklardaki artış ve GDO'lu ürünler ile ilgili yasal düzenlemeler gümrüklerde bu kontrollerin sıklaşmasına neden olmuştur. Bu doğrultuda yurt dışından gelen gıda ürününün uzun süre beklemeden gerekli analizlerinin hızlı bir şekilde yapılabilmesi için hızlı moleküler teknikler kullanılmaya başlanmıştır. Tüm bu uygulamalar moleküler metotların gıda kontrollerinde geniş bir uygulama alanı bulduğunu ve önümüzdeki yıllarda da konu ile ilgili birçok çalışmanın ortaya konulacağını göstermektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Ampe, F., ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C. and Guyot, J., 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivationin dependent methods to investigate traditional fermentations. *Applied Environmental Microbiology* (65): 5464-5473.
- [2] Bania, J., Dabrowsk A., Byston, J., Korzekwa, K., Chrzanowska, J. And Molenda, J., 2006. Distribution of Newly Described Enterotoxin-like Genes in *Staphylococcus aureus* From Food, *International Journal of Food Microbiology*, 108, 36-41.
- [3] Beneduce, L., Fiocco, D. And Spano, G., 2007. Development of PCR-based Molecular Tools For The Detection of Emerging Food and Water Born Pathogenic Bacteria, *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, p.569-576.
- [4] Bricker, B.J., 2011. Past, Present and Future of Molecular Technology Applications for the Epidemiology of Bacterial Diseases, *Analytical and Bioanalytical Techniques*, S10.
- [5] Colavita, G., Rotili, M., Leone, A., Vergara, A., Sammarco, M. L. and Ripabelli, G., 2010. Identification of Emesis-causing *Bacillus cereus* Strains by Polymerase Chain Reaction: Preliminary Results, *International Journal of Food Science & Technology*, 45(6): 1310-1315.
- [6] Das, S., Surendran, P.K. and Thampuran, N., 2009. PCR-based detection of enterotoxigenic isolates of *Bacillus cereus* from tropical seafood, *Indian J Med Res* 129, 316-320.
- [7] Deisingh, A.K. and Badrie, N., 2005. Detection Approaches for Genetically Modified Organisms in Foods, *Food Research International*, 38: 639-649.
- [8] Dorak, M.T., 2006. Real-Time PCR, 1. Baskı, *BIOS Advance Methods*, Taylor and Francis, New York.
- [9] Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G. and Coppola, S., 2001. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of important lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Current Microbiology* (42): 199-202.
- [10] Fueyo, J.M., Martin, M.C., Gonzales-Hevia, M.A., and Mendoza, M.C., 2001. Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relation between genetic types and enterotoxins, *International Journal of Food Microbiology*, 67, 139-145.
- [11] Furet, J.P., Quenee, P. and Tailliez, P., 2004. Molecular Quantification of Lactic Acid Bacteria in Fermented Milk Products Using Real-Time Quantitative PCR, *International Journal of Food Microbiology*, 97, 197-207.
- [12] Greiner, R. and Konietzny, U., 2007. Modern Molecular Methods (PCR) in Food Control: GMO, Pathogens, Species Identification, Allergens, *The World of Food Science*, 7th Simposio Latino Americano de Ciencia de Alimentos, 4-7 November, Brazil.
- [13] Johnson, W.M., Tyler, S.D., Ewan, E.P., Ashton F.E., Pollard, D.R., and Rozee, K.R.,1991. Detection of Genes for Enterotoxins, Exfoliative Toxins, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the Polymerase Chain Reaction, *Journal of Clinical Microbiology*, Mar. P.426-430.

- [14] König, A., Cockburn, A., Crevel, R. W. R., Debruyne, E., Grafstroem, R., Hammerling, U., Kimber, I., Knudsen, I., Kuiper, H.A., Peijnenburg, A. A. C. M., Penninks, A. H., Poulsen, M., Schauzu, M. and Wal, J. M., 2004. Assessment of the Safety of Foods Derived from Genetically Modified (GM) Crops , *Food and Chemical Toxicology*, 42: 1047-1088.
- [15] Kuiper, H.A. and Kleter, G.A., 2003. The Scientific Basis for Risk Assessment and Regulation of Genetically Modified Foods , *Trends in Food Science and technology*, 14: 277-293.
- [16] Miraglia, M., Berdal, K.G, Brera, C., Corbisier, P., Holst-Jensen, A., Kok, E.J., Marvin, H.J.P., Schimmel, H., Rentsch, J., Van Rie, J.P.P.F. and Zagon, J., 2004. Detection and Traceability of Genetically Modified Organisms, in the Food Production Chain , *Food and Chemical Toxicology*, 42: 1157-1180.
- [17] Moter, A. and Gobel, U.B., 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbial Methods* (41): 85-112.
- [18] Muyzer, G. and Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* (73): 127-141.
- [19] Özertan, G. ve Bölek, Y., 2001. Bitki Biyoteknolojisi II (Genetik Mühendisli i ve Uygulamalar), Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınlar , Konya, 421-437.
- [20] Pepe, O., Blaiotta, G., Moschetti, G., Greco, T. and Villani, F., 2003. Rope-producing strains of *Bacillus* spp. from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria, *Applied Environmental Microbiology* (69): 2321-2329.
- [21] Pinto, B., Chenoll, E. and Aznar, R., 2005. Identification and Typing of Food-Borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based Techniques, *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 340-352.
- [22] Pinto AD, Forte VT, Guastadisegni MC, Martino C, Schena FP, Tantillo G, 2007. A comparison of DNA extraction methods for food analysis, *Food Control*, 18: 76–80.
- [23] Rall, V.L.M., Vieira, F.P., Rall, R., Vietis, R.L., Fernandes, A, Candeias, J.M.G., Cardosa, K.F.G. and Araujo, J. P., 2008. PCR Detection of Staphylococcal Enterotoxin Genes in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Raw and Pasteurized Milk, *Veterinary Microbiology*, 132, 408-413.
- [24] Rijpens, N.P. and Herman, L.M.F., 2002. Molecular Methods for Identification and Detection of Bacterial Food Pathogens, *Journal of AOAC International*, Vol.85, No.4.
- [25] Romero, C., Gamazo, C., Pardo, M. and Lopez-Goni, I, 1995. Specific Detection of *Brucella* DNA by PCR, *Journal of Clinical Microbiology* (33):3, 615-617.
- [26] Schneegurt, M.A. and Kulpa, C.F., 1998. The application of molecular techniques environmental biotechnology for monitoring microbial systems, *Biotechnology and Applied Biochemistry* (27): 73-79.
- [27] Terry C, Harris N and Parkes HC, 2002. Detection of Genetically Modified Crops and Their Derivatives: Critical Steps in Sample Preparation and Extraction, *Journal Of AOAC International*, 85(3):768-774.
- [28] Ünlütürk, A. ve Turantaş, F., 1999. Hızlı Mikrobiyolojik Yöntemler, Gıda Mikrobiyolojisi, Mengi Tan Basımevi, İzmir.
- [29] Wilson, K. and Walker, J., 2005. *Molecular Biology, Bioinformatics and Basic Techniques*, Biochemistry and Molecular Biology, p. 166-225.