T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

Keçi Sütlerinde İnek ve Koyun Sütü Varlığının Belirlenmesinde Yöntem Karşılaştırması

PROJE SONUÇ RAPORU



Proje No: TSA-2020-8901

Proje Türü **:** Bireysel Araştırma Projesi

Proje Yürütücüsü:

Ünvanı, Adı Soyadı	Birimi/Bölümü
Dr. Öğr. Üyesi Rabia Mehtap TUNCAY	Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Araştırmacı(lar):

Ünvanı, Adı Soyadı	Birimi/Bölümü
Prof. Dr. Yakup Can SANCAK	Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Ağustos 2021
Van

ÖNSÖZ

İnsan beslenmesi açısından çok değerli bir besin olması, sevilerek tüketilmesi ve satış fiyatlarının yüksek olması, özellikle keçi sütü ve ürünlerinde maliyeti düşürmek amacıyla yapılan hile ve tağşişleri de arttırmaktadır. Özellikle de keçi sütüne inek sütünün karıştırılması giderek artmaktadır. Bu durum eğer ürünün etiketinde bildirilmemiş ise tağşiş olarak kabul edilmektedir. Türk Gıda Kodeksi'nde piyasaya arz edilen inek sütü haricindeki sütlerin etiketinde ürün adıyla birlikte sütün elde edildiği hayvanın tür adının belirtilmesi gerektiği bildirilmiştir. Doğru etiketlemeyi sağlamak için süt türlerinin kökeni doğrulanmalıdır. Günümüzde farklı tür hayvanlara ait sütlerin karıştırılıp karıştırılmadığının tespit edilebilmesi için birçok yöntem gelitirilmiştir. Fakat tüm bu yöntemler zaman almakta ve ekonomik olmamaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction/PCR) ise mitokondriyal DNA'nın analizi ile orijinal sütün içine yabancı süt veya süt ürünlerinin ilave edilip edilmediğinin belirlenmesinde alternatif bir yöntem sağlamaktadır.

Yapılan bu araştırmada Van ilinde keçi, İnek ve koyun sütü satılan çiftliklerden 1 litre olacak şekilde süt alınmıştır. Keçi sütünün içerisine %1, %2, %5, %0.1 ve %0.5 oranında inek sütü ve aynı oranlarda koyun sütü ilave edilmiştir. Oluşturulan deneysel örneklerden multipleks konvansiyonel ve multipleks Real Time PCR yöntemi ile keçi, inek ve koyun türlerine özgü DNA varlığı araştırıldı ve tespit edilebilir limit belirlendi.

Çalışma bölgede bu konuyla ilgili olarak, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından verilen maddi destekle yapılan ilk münferit çalışma olup, elde edilen sonuçlar yayınlanarak daha sonra yapılacak olan piyasa analizlerinde tespit edilebilir limit için en ideal yöntemin kullanılmasına katkı sağlayacaktır.

Çalışmamızı maddi olarak destekleyen Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimizi sunarız.

Bu araştırma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TSA-2020-8901 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ 1
İÇİNDEKİLER 2
TABLOLAR LİSTESİ 3
ŞEKİLLER LİSTESİ 4
ÖZET 5
ABSTRACT 6
1. GİRİŞ 7
2. GENEL BİLGİLER 8
3. GEREÇ VE YÖNTEM 14
3.1. Gereç 14
3.2. Yöntem 14
4. BULGULAR 16
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 19
KAYNAKLAR 21

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Multipleks konvansiyonel PCR primerleri olarak kullanılan oligonükleotidler..... 14

Tablo 2. Keçi ve İnek sütü karışımlarında Real Time PCR Ct değerleri..... 17

Tablo 3. Keçi ve koyun sütü karışımlarında Real Time PCR Ct değerleri..... 18

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Deneysel olarak hazırlanmış keçi sütü içerisinde inek sütü varlığının multipleks konvansiyonel PCR görüntüsü..... 16

Şekil 2. Deneysel olarak hazırlanmış keçi sütü içerisinde inek sütü varlığının multipleks Real Time PCR görüntüsü..... 16

Şekil 3. Deneysel olarak hazırlanmış keçi sütü içerisinde koyun sütü varlığının multipleks konvansiyonel PCR görüntüsü..... 17

Şekil 4. Deneysel olarak hazırlanmış keçi sütü içerisinde koyun sütü varlığının multipleks Real Time PCR görüntüsü..... 17

ÖZET

Keçi sütü besleyici değeri yüksek olan ve son zamanlarda çok fazla tüketilen süt türlerinden biridir. Keçi yetiştiriciliğinin zor olması, keçi sütünün temin edilmesini zorlaştırdığı gibi pahalı olmasına da sebep olmaktadır. Bu nedenden dolayı keçi sütü ve ürünlerine inek ve/veya koyun sütü katılmaktadır.

Bu amaçla; çiftliklerden alınan keçi sütüne %0.1, %0,5, %1, %2, %5 oranında inek ve aynı oranlarda koyun sütü katıldı. Oluşturulan deneysel örneklerden DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra elde edilen ekstrakt içinde, multipleks konvansiyonel ve multipleks Real Time PCR yöntemi ile keçi, inek ve koyun türlerine özgü DNA varlığı araştırıldı.

Bu çalışmada, inek sütü ve koyun sütü denemelerinin multipleks konvansiyonel PCR sonucunda keçi sütüne ilave edilen %1, %2, %5 oranındaki inek ve koyun sütü varlığının tespit edilebildiği belirlendi. %0.5 oranında katılan süt karışımlarının jel görüntüsünün pozitifliğinin belirsiz olduğu, %0.1 oranındaki karışımların ise tespit edilemedikleri görüldü. Fakat multipleks Real Time PCR'da %1, %2, %5 %0.1 ve %0.5 oranlarındaki karışımların tamamında pozitif grafik belirlendi. Bu durum, piyasada satılan keçi sütlerinde %0.1 oranında bile inek veya koyun sütü varlığının tespitinde Real Time PCR'ın daha güvenilir olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak, multipleks Real Time PCR'ın çok küçük oranlarda katılmış olan inek ve koyun sütünü tespit edebildiği belirlendi. Ayrıca multipleks konvansiyonel PCR yönteminin sıcaklık ve sürelerinin optimize edilmesi sırasında birden fazla tekrara gidildiği, böylece hem zaman hem de sarf malzemenin defalarca kullanıldığı fakat multipleks Real Time PCR'ın tek seferde ve az malzeme ile sonuç verdiği tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Keçi sütü, tağşiş, multipleks Real Time PCR, multipleks konvansiyonel PCR

ABSTRACT

Goat milk is one of the milk types that has high nutritional value and has been consumed a lot recently. The difficulty of goat farming makes it difficult to obtain goat milk and also causes it to be expensive. For this reason, cow and/or sheep milk is added to goat milk and its products.

For this purpose, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 5% cow's milk and the same proportions of sheep's milk were added to the goat's milk taken from the farms. After DNA extraction from the experimental samples, the presence of DNA specific to goat, cow and sheep species was investigated in the extract obtained by multiplex conventional PCR and multiplex Real Time PCR methods.

In this study, it was determined that the presence of 1%, 2%, 5% cow and sheep milk added to goat milk could be detected as a result of multiplex conventional PCR of cow's milk and sheep's milk trials.

It was observed that the positivity of the gel image of the milk mixtures added at the rate of 0.5% was unclear, and the mixtures at the rate of 0.1% could not be detected. However, in multiplex Real Time PCR, positive graphics were determined in all mixtures at 1%, 2%, 5%, 0.1% and 0.5% ratios. This showed that Real Time PCR was more reliable in detecting the presence of cow or sheep milk even at the rate of 0.1% in commercially available goat milk.

In conclusion, it was determined that multiplex Real Time PCR could detect cow and sheep milk that was added in very small proportions. In addition, it was determined that more than one repetition was made during the optimization of the temperature and time of the multiplex conventional PCR method, so that both time and consumables were used repeatedly, but multiplex Real Time PCR gave results with less material.

Key words: Goat milk, adulteration, multiplex Real Time PCR, multiplex conventional PCR

1. GİRİŞ

Sağlıklı, yeterli ve dengeli beslenme; vücut hücrelerinin normal çalışabilmesi için protein, yağ, karbonhidrat, vitamin ve mineraller gibi besin elementlerinin vücudun günlük ihtiyacını karşılayacak miktarlarda alınmasını ifade etmektedir (Yangılar, 2013). İnsan sağlığının korunması, geliştirilmesi ve kaliteli bir hayatın sürdürebilmesi yeterli ve dengeli beslenme ile mümkün olmaktadır. Et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri, sebze ve meyveler ile tahıl grubu ürünler vücudun ihtiyacı olan yeterli ve dengeli beslenme için önemli besin gruplarındandır (Çom, 2008).

Son zamanlarda, keçi sütünün diğer hayvan türlerine ait sütlerden daha çok tercih edilmesinin nedenleri, sahip olduğu üstün besinsel özelliğinin ve protein, vitamin, mineral açısından zengin ve aynı zamanda daha az yağ molekülüne sahip olmasıdır (Golinelli ve ark., 2014).

Keçi sütü besleyici bir besin maddesi olarak kabul edilmekte ve tüketiciler için nutrasötik bir gıda olarak inek sütüne göre daha yüksek fiyatlarla satılmaktadır. Bu nedenle keçi sütüne inek sütü karıştırılması önemli bir sorun haline gelmiştir. Sadece görünümüne bakılarak keçi sütünü inek sütünden ayırt etmek kolay değildir. Keçi sütüne inek sütü karıştırılması hem tüketicinin ekonomik zarara uğratılması yönünden hem de özellikle inek sütü alerjisi olan insanların keçi sütü diye inek sütü ile karıştırılmış sütleri tüketmesi yönünden önemli bir risk oluşturmaktadır (Cheng ve ark., 2006).

Bu çalışma ile keçi sütlerinde koyun ve inek sütlerinin varlığının belirlenmesi için multipleks konvansiyonel PCR ve multipleks Real Time PCR yönteminden hangisinin daha uygun olduğunu belirlemek amac ile yapılmıştır. Kullanılan yöntemlerden en düşük miktardaki süt karışımları tespit eden ve en hızlı sonuç veren yöntem belirlenmiştir. Böylece daha sonraki çalışmalarda ticari olarak piyasada satışa sunulan çiğ, pastörize ve sterilize keçi sütleri ve ürünlerine inek ve koyun sütlerinin karıştırılıp karıştırılmadığı ortaya konularak, Türk Gıda Kodeksi Etiketleme ve Tüketicileri Bilgilendirme Yönetmeliği (2017)'ne aykırı olarak etikette bildirilmeden, böyle bir tağşişin yapılıp yapılmadığı belirlenmiş olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Süt ve süt ürünleri; büyüme ve gelişme için, vücudun ihtiyacı olan kalsiyum, fosfor, magnezyum, selenyum, A vitamini, B_1 vitamini, riboflavin (B_2 vitamini), niasin (B_3 vitamini), pantotenik asit (B_5 vitamini), B_6, B_{12} vitamini ve folik asit gibi mineral madde ve vitaminleri içeren önemli bir besin grubudur. Bunların yanı sıra süt ve süt ürünleri iyi bir protein ve yağ kaynağıdır (Anonymous, 2015; Anonim, 2016).

Türk Gıda Kodeksi'ne göre "süt, bir veya daha fazla inek, keçi, koyun veya mandanın sağılmasıyla elde edilen, 40 °C'nin üzerine ısıtılmamış veya eşdeğer etkiye sahip herhangi bir işlem görmemiş kolostrum dışındaki meme bezi salgısıdır" şeklinde tanımlanmaktadır (TGK, 2000).

Süt ve süt ürünleri insan gıdalarının temel bileşenlerindendir. Son zamanlarda, insan sağlığına olan yararlı yönlerinin keşfedilmesiyle keçi sütü ve ürünlerine gösterilen ilgi dünya çapında hızla artmaktadır. Kendine has tadı olan keçi sütünün kompoziyonuna bakıldığında; daha düşük oranda αs1-kazein içermesi, yağ moleküllerinin küçük çaplı olmaları, laktoz oranının az olması gibi nedenlerden dolayı diğer sütlerden ayrılmaktadır. Küçük yağ molekülleri, keçi sütünün sindirilebilirliğini ve absorbsiyonunu arttırmaktadır. Ayrıca, inek sütü alerjisi ve laktoz intoleransı olan kişiler için alternatif bir gıda maddesidir (Haenlein, 2004; Park, 2006; Yaralı ve ark., 2013; García ve ark., 2014; Altun ve Sarıcı, 2017).

Keçi sütü yağ, protein, laktoz, vitamin, enzim ve mineral tuzları bakımından oldukça zengin bir besin maddesidir. Keçi sütünün bileşenlerinin çoğu, diğer süt üreten hayvanların sütünden daha fazla miktardadır. Örneğin, keçi sütü % 25 daha fazla B6 vitamini, % 47 daha fazla A vitamini ve % 13 daha fazla kalsiyum içerir. Keçi sütü; C6, C8 ve C10 yağ asitleri, tiamin, B2 vitamini (riboflavin) ve niasinden zengindir. Keçi sütü, inek sütünden daha az B12 vitamini, folat ve pantotenat içerirmektedir (Anonymous, 2002). Keçi sütü; Ca, Na, Mg, P, K ve Zn, Mn, Se, Co, Cu, Fe gibi majör ve eser mineralleri de içeren doğal bir besindir (Anonymous, 2002; Haenlein, 2002; Lui, 2003; Yaralı ve ark., 2013; Getaneh ve ark., 2016; Altun ve Sarıcı, 2017).

Keçi sütü inek sütüne oranla daha az miktarda kazein, daha yüksek miktarda serum proteinleri içermektedir (Ceballos ve ark., 2009). İnek sütü, gastrointestinal ve kutanöz rahatsızlıklara neden olan besindir; bebeklerin yaklaşık %2.5'inde yaşamlarının ilk yıllarında inek sütü alerjisi görülmektedir (Crittenden ve Bennett, 2006). İnek sütü alerjisine genellikle laktoglobulinler ve kazeinler gibi ana proteinler neden olmaktadır. Keçi sütü, inek sütüne benzer miktarda laktoglobulin içerir, ancak α1-kazein olarak bilinen kazein miktarı ise daha azdır (Tomotake ve ark., 2006). Keçi sütü on esansiyel amino asitten altısını, inek sütüne göre daha yüksek seviyelerde içermektedir (Park, 1994). Keçi sütünde tirozin ve serotonin haricinde diğer tüm amino asitler yüksek miktarda bulunmaktadır. Sistein konsantrasyonu hariç, inek ve insan sütüne benzer bir amino asit profili içermektedir (Rutherfurd ve ark., 2008; Ceballos ve ark., 2009). Keçi sütü insan yeni doğanı ve

yetişkin için değerli bir taurin kaynağıdır. İçerisinde bulunan Nükleotidler yavrularda bağışıklığın gelişmesini kolaylaştırmaktadır. Keçi sütünden yapılan bebek formülünün nükleotid içeriği, başka nükleotidlere ihtiyaç duymadan insan sütü ile aynı seviyede bir gıda olmasını sağlayabilir (Silanikove ve ark., 2010; Prosser ve ark., 2008).

Sütün içindeki ortalama yağ içeriği, diğer ruminant türlerinin sütleri ile benzerdir; ancak, keçi sütündeki yağ yüzdesi inek sütünden daha fazla ve yağ globülleri inek sütünden daha küçüktür. Keçi sütündeki yağ globillerinin küçük olması keçi sütünün sindirilmesini kolaylaştırır. Yağ bileşiminde; ırk farklılıkları, yemlerin kalitesi ve miktarı, genetik, mevsim, laktasyon aşaması gibi faktörlerin rolü vardır. Kolesterol açısından da keçi sütünün inek sütü ile karşılaştırıldığında belirli bir ayrım sağladığı görülmüştür. İnek sütü tipik olarak 100 g süt başına yaklaşık 14 ila 17 mg kolesterol içerirken, keçi sütü daha çok 100 g başına 11 mg kolesterol içermekte, keçi sütü tüketiminin kolesterol üzerine etkisi daha düşüktür (Auld ve ark., 2000; Alférez ve ark., 2001; Tomotake ve ark., 2006).

Keçi sütünde tekli ve çoklu doymamış yağ asitleri ile orta zincirli trigliseridlerin miktarı inek sütünden daha fazladır. Kalp hastalığı için risk faktörü olduğu bilinen bazı trans yağlar keçi sütünde önemli ölçüde daha düşük oranlarda bulunmaktadır (Alonso ve ark., 1999). Keçi sütü bu özelliğinden dolayı insan sağlığı için, özellikle de kardiyovasküler hastalıklarda önemlidir (Haenlein, 2004).

Keçi sütünde bulunan oligosakkaritlerin bağırsak iltihaplanmasını azalttığı ve kolit iyileşmesine yardımcı olduğu bildirilmiştir (Lara-Villoslada ve ark., 2006). İnsan sütünde bulunan oligosakkaritler, prebiyotik ve antienfektif özelliklerinden dolayı yararlı bileşenler olarak kabul edilmektedir (Bohem ve Stahl, 2007). Keçi sütü, inek ve koyun sütünden çok daha yüksek, insan sütüne göre daha düşük miktarda oligosakkarit içermektedir. Ancak, keçi sütündeki oligosakkaritlerin yapısı, insan sütünde bulunan oligosakkritlerin profiline benzemektedir (Viverge ve ark., 2007).

Keçi sütü içinde küçük miktarlarda inositol bulunsa da serbest halde bulunan başlıca karbonhidrat çeşidi laktozdur (Auld ve ark., 2000).

Keçi sütündeki alkali fosfataz seviyesi inek sütlerindekinden biraz daha azdır fakat her iki süt çeşidindeki enzim de aynı derecede ısı duyarlılığı göstermektedir. Bu nedenle inek sütüyle aynı şekilde pastörizasyon indikatörü olarak kullanılabilir. Her iki türün sütünün içindeki peroksidaz aktivitesi her bakımdan aynıdır. Keçi sütünde ksantin oksidaz seviyesi daha düşüktür. Keçi sütü, ribonükleaz ve lizozim için daha yüksek aktivite seviyelerine sahiptir (Bruhn ve Schutz, 1999).

Keçi sütü, nispi antimikrobiyal, immünmodülatör özellikleriyle anne sütüne diğer sütlerden daha fazla benzerlik göstermekte ve bebek, süt çocuğu ve çocuk beslenmesinde anne sütünün verilemediği durumlarda alternatif bir besin maddesi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, keçi sütü gastrointestinal rahatsızlıklar, kusma, kolik, ishal, kabızlık gibi sindirim problemleri ve astım gibi solunum problemleri ile egzama, nezle gibi önemli sağlık problemlerine karşı da tedavi amacıyla

kullanılmaktadır (Harden ve Hepburn, 2011; Yaralı ve ark., 2013; Getaneh ve ark., 2016; Altun ve Sarıcı, 2017).

Keçi sütü; koku ve lezzetinin güzel olması, daha az alerjik etkilerinin bulunması, yüksek sindirilebilirliği ve inek sütünden daha düşük trans C18:1 yağ asidi içermesi gibi nedenlerle son yıllarda tüketiciler tarafından daha çok talep edilmektedir. Keçi yetiştiriciliğinin kolay olması ve süt verimi yüksek keçi ırklarından istenilen miktarda süt elde edilebilmesi nedeniyle ülkemizde ve dünyada keçi sütü yetiştiriciliği ve üretimi giderek artmaktadır. Buna bağlı olarak da keçi sütü ile keçi sütünden elde edilen ürünlerin üretimi giderek fazlalaşmakta, tüketiciler keçi sütü ve ürünlerini daha fazla almaya eğilim göstermektedirler (Savran ve ark., 2011; Akan ve Kınık, 2015).

Üretiminin mevsime bağlı olması ve gelişmekte olan birçok ülkede hayvancılıkla uğraşan küçük ölçekli çiftçiler tarafından üretilmesi keçi sütü ve ürünlerinin, inek ve koyun sütünden daha yüksek fiyatlara sahip olmasına neden olmaktadır. Keçi sütü ve ürünlerinin tüketiciler tarafından daha fazla talep edilmeye başlanması ve bu grup ürünlerin inek sütü ve ürünlerine göre fiyatının daha yüksek olması, keçi sütlerine farklı tür hayvanların özellikle de daha ucuz ve bol bulunabilir olmasından dolayı inek sütlerinin karıştırılabileceği ihtimalini gündeme getirmiştir. Bu nedenle, çiğ keçi sütü ve ürünlerinin kalitesini kontrol etmek zordur. Özellikle de keçi sütüne inek sütünün karıştırılması giderek artmaktadır. Bu durum eğer ürünün etiketinde bildirilmemiş ise tağşiş olarak kabul edilmektedir ve birçok ülkenin mevzuatında yapılması yasaktır. Ciddi bir sorun olan bu durumun önlenmesi için yasal olmayan ticaretten kaçınılmalı ve doğru etiketlemeyi sağlamak için süt türlerinin kökeni doğrulanmalıdır (Ferreira ve Cacote, 2003; Moatsou ve Anifantakis, 2003; Hurley ve ark., 2004, Haenlein, 2004; Dias ve ark., 2009; Golinelli ve ark., 2014; TGK, 2017).

Dünya çapında, yanlış etiketlenmiş süt ürünleri geniş çapta rapor edilmekte, gıda bileşenlerinin kalitesi ve gıda güvenliği gıda üretiminde önemli konular arasında yer almaktadır (Di Pinto ve ark., 2017). Gıdaların tanımı ve etiketlenmesi, tüketicilerin satın aldıkları ürünler hakkında bilinçli seçimler yapabilmeleri için doğru ve zorunlu olmalıdır (Herman, 2001).

Bugüne kadar, çeşitli hayvanlara ait süt türlerinin farklılığının araştırılması için immünolojik yaklaşımlar dahil olmak üzere farklı analitik yöntemler geliştirilmiştir (Bottero ve ark., 2002; López-Calleja ve ark., 2007; Chàvez ve ark., 2008; Rodríguez ve ark., 2010; Mayer ve ark., 2012).

Günümüzde, keçi sütleri ve diğer tür hayvanlara ait sütlerin karıştırılıp karıştırılmadığının tespit edilebilmesi için, spesifik protein veya lipid profillerindeki farklılıklara dayalı çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. İmmünolojik olmayan yöntemler, gaz kromatografisi ile yağ asidi kompozisyonunun analizi veya HPLC, ureapolyacrylamide jel elektroforezi (CNS, 1998), poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile spesifik protein bileşenlerini saptama (Lee ve ark., 2004) ve izoelektrik odaklama bu durumu tespit etmek için kullanılan teknikler arasında yer almaktadır (Amigo ve ark., 1991; Kim ve Jimeez-Flores, 1993; Chen ve ark., 2004).

Tüm bu yöntemlerin zaman alıcı ve ekonomik olmaması gibi dezavantajları vardır (Anguita ve ark., 1996; Ritcher ve ark., 1997). Bu yöntemlerde meydana gelen yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların düzeltilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction/PCR) ise mitokondriyal DNA'nın analizi ile orijinal sütün içine yabancı süt veya süt ürünlerinin ilave edilip edilmediğinin belirlenmesinde alternatif bir yöntem sağlamaktadır (Bania ve ark., 2001; Maudet ve Taberlet, 2001; Bottero ve ark., 2003). Süt türüne özgü tespit ve doğrulama için geçerli olan hızlı, hassas ve hata payı düşük bir yöntemdir (Abdel-Rahman ve Ahmed, 2007).

Yapılan çalışmalarda; kromotografik, elektronik sensör sistemleri, immünolojik yöntemler ve DNA temelli PCR analizleri gibi farklı metotlar ile keçi sütlerinde diğer hayvan türlerine ait sütlerin varlığı araştırılmış ve bu çalışmalarda keçi sütlerine farklı tür hayvanların sütlerinin hile ve tağşiş amacıyla karıştırılabileceği ortaya konulmuştur (Bania ve ark., Chen et al, 2004; Cheng ve ark., 2006; Rodriques ve ark., 2012).

Yapılan bu çalışmada kullanılan yöntem ile ilgili daha önce herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Yapılan benzer çalışmalara ait bulgular aşağıda verilmiştir.

Bottero ve ark. (2003), süt ürünlerinde multipleks PCR kullanarak tür tayini ile ilgili yaptıkları çalışmalarında, keçi sütüne %1, % 0,5 ve % 0,1 oranında sığır sütü kattıktan sonra lor elde etmişlerdir. Bu deneysel lor peynirinde PCR tekniği ile tür tayini yapmışlar ve içeren süt karışımlarından elde edilen lor peynirlerini doğrulamışlardır. Çalışmada, multiplex PCR tekniğinde minimum tespit limitini %0.5 olarak tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, önerilen multipleks PCR'ın, rutin olarak uygulanabilen hızlı ve hassas bir yöntemi temsil ettiği, tek bir adımda, iyi bir hassasiyet eşiğine (% 0.5) sahip olduğu kanısına varmışlardır.

López-Calleja ve ark. (2004), koyun ve keçi sütünde inek sütünün PCR ile tespiti için yaptıkları deneysel çalışmada, koyun veya keçi sütüne %0.1, 0.5, 1.5, 10 ve 100 oranında inek sütü katmışlardır. Mitokondriyal 12S rRNA genini hedefleyen primerler kullanılarak farklı oranlarda inek sütü katılan sütleri PCR ile tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda çiğ ya da ısıl işlemi uygulanmış süt ve süt ürünlerinde farklı sütlerin %0.1 oranında bile tespit edildiğini belirtmişlerdir. Önerilen PCR testinin rutin analizlerde, geçerli, hızlı ve basit bir yöntemi temsil ettiği kanısına varmışlardır.

Cheng ve ark. (2006), daha önce ineklerin süt katkısının tanımlanması için kullanılan αS1-kazeinin farklı hareketliliğine sahip üre-poliakrilamid jel elektroforez deneyine alternatif hızlı ve hassas bir yöntem geliştirmeyi amaçladıklarını bildirmişlerdir. Bu amaçla keçi sütü tozu içerisine %0.1, 0.5, 1 ve 2 oranında inek sütü kattıktan sonra bu karışımdan fenol-kloroform *ve* chelex ile DNA izolasyonu yapmışlardır. Her iki yöntemde de benzer sonuçlar aldıklarını ve chelex hızlı DNA prosedürü uygulanan keçi sütü tozunda tespit edilme limiti %0.5-1 oranında bulduklarını belirtmişlerdir.

Mašková ve Paulíčková (2006) keçi ve koyun peynirlerinde inek sütünü tespit etmek için PCR yöntemini kullanmışlardır. Hayvan kökenli numuneler için tasarlanmış Invitek Co tarafından

izolasyon kiti Invisorb Spin Food I kullanılarak peynirlerden DNA izole etmiilerdir. Uygulanan PCR yönteminde, 274 bp büyüklüğünde inek, 157 bp'lik keçi ve 331 bp'lik koyun DNA'sı kullanmışlardır. Araştırmacılar kullandıkları PCR yönteminde tespit limitini saf keçi peynirinden yapılan model numuneleri ile inek sütünden yapılan belirli bir peynir ilavesiyle %1 olarak belirlemişlerdir. Sonuç olarak, toplam 17 keçi peyniri örneğinin 3'ünde ve 7 koyun peyniri örneğinin ise1'inde inek sütü varlığını tespit etmişlerdir.

López-Calleja ve ark. (2007), koyun ve keçi sütü peynirlerinde inek sütü varlığını PCR ve ELISA yöntemi kullanarak araştırdıkları çalışmada, 16 adet peynir örneğinin 5'inin etikette yazılmış olan hayvan türünden farklı olduğunu belirtmişlerdir. Deneysel bir ön çalışma yaptıkları bu çalışmada her iki yöntemde de %1 oranında katılmış farklı hayvan sütlerinin tespit edilebildiğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada elde ettikleri sonuçların hem PCR hem de ELISA tekniğinin peynirdeki spesifik tespit sığır sütü için güvenilir bir yol sağlayabileceğini, ancak peynir altı suyu proteinlerinin süte hileli olarak dahil edilmesi durumunda kazeinlere karşı kullanılan antikorların ELISA tekniği için dezavantaj olabileceğini belirtmişlerdir. Öte yandan PCR'ın, özgüllük ve duyarlılığının daha fazla olduğunu ve direkt sığır DNA'sını tespit etiğini bildirmişlerdir.

Bobková ve ark. (2009), PCR yöntemi ile koyun ve keçi sütünde inek sütü varlığını tespit ettikleri çalışmalarında, deneysel olarak koyun sütüne %10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 ve 0.000001 oranlarında inek sütü ilave etmişlerdir. Toplam 8 adet deneysel olarak hazırladıkları süt karışımlarına uyguladıkları PCR yöntemi sonucunda, farklı süt oranının tespit limitini %0.01 olarak bulmuşlardır.

Rodrigues ve ark. (2012), duplex PCR'ın analitik duyarlılığını belirlemek için taze keçi sütüne %0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 ve 100 konsantrasyonlarında sığır sütü karıştırmışlardır. Çalışmada, d-PCR'ın tespit limitinin %0.5 oranında olduğunu bildirmişlerdir.

Khanzadi ve ark. (2013), koyun sütünde inek ve keçi sütünü multiplex PCR yöntemiyle belirledikleri çalışmada, 105 adet koyun sütü ve ürününün (35 yoğurt, 35 süt, 35 peynir) sadece 21'inin etiketle uyumlu olduğunu, 84'ünün ise etiketle uyumsuz olduğunu belirlemişlerdir.

Agrimonti ve ark. (2015), süt ürünlerinde hileleri belirlemek için quadruplex PCR (qxPCR) testi kullanarak yaptıkları çalışmada inek sütlerine %0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25 oranlarında manda, koyun, keçi sütleri katmışlardır. Yaptıkları çalışmada qxPCR tespit limitini %0.1 olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Di Pinto ve ark. (2017), end-point PCR sonuçlarına göre 80 adet keçi sütü ve ürünleri üzerinde yaptığı çalışmada 58'inin etiketle uyumlu olmadığını bildirmişlerdir. Analiz sonuçlarına göre 26 olgunlaşmış peynir örneğinin 24'ünün, 18 adet taze peynir örneğinden 14'ünün, 10 ricotta örneğinin 6'sının, 10 cacioricotta numunesinden 8'inin, 4 adet mavi peynir örneğinin tamamının, 4 adet yoğurt örneğinin ise 2'sinin etiket üzerindeki içerik ile eşleşmediğini; 4 adet UHT süt ve süt tozu örneğinin etiket üzerindeki içerik listesi ile tamamen eşleştiğini belirtmişlerdir. Real Time PCR sonuçlarının ise end-point PCR sonuçlarını doğruladığı fakat analiz edilen 80 keçi ürününden

64'ünün etiket ile uyumsuz olduğunu bildirmişlerdir. Real Time PCR'ın daha yüksek hassasiyeti olduğunu ve analiz sonuçlarındaki farkların 2 olgunlaşmış, 2 taze peynir ve 2 ricotta örneğine karşılık geldiğini belirtmişlerdir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu araştırmada Van ilinde keçi, İnek ve koyun sütü satılan çiftliklerden 1 litre olacak şekilde süt alınmıştır. Keçi sütünün içerisine %1, %2, %5, %0.1 ve %0.5 oranında inek sütü ve aynı oranlarda koyun sütü ilave edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. DNA ekstraksiyon prosedürü

Sütlerden DNA ekstrakte edebilmek amacıyla ticari kit (GeneAll, Exgene™ Cell SV) kullanılmıştır. Üretici firmanın önerdiği doğrultuda elde edilen saf DNA örnekleri analiz edileceği zamana kadar -20±1 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. PCR analiz

Bu çalışmada, 12 ve 16'lı mitokondriyal rRNA'yı hedef alan ve Bottero ve ark. (2003) tarafından tasarlanan keçi, koyun ve sığır türleri için spesifik primerler kullanılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Multipleks konvansiyonel PCR primerleri olarak kullanılan oligonükleotidler.

Türler ve genler	Oligonükleotid Primerler	Amplikon
Koyun (Ovis aries)	Sens 959 (F) (5' ATATCAACCACACGAGAGGAGAC 3')	172 bp
(12s sens ve 16s antisens) NC001941[a]	Antisens 1130 (R) (5' TAAACTGGAGAGTGGGAGAT 3')	
Keçi (Capra hircus)	Sens 144 (F) (5' CGCCCTCCAAATCAATAAG 3')	326 bp
(12s sens ve antisens)	Antisens 469 (R) (5' AGTGTATCAGCTGCAGTAGGGTT 3')	
M55541[a]		
İnek (Bos taurus)	Sens 916 (F) (5' GTACTACTAGCAACAGCTTA 3')	256 bp
(12s sens ve antisense)	Antisens 1171 (R) (5' GCTTGATTCTCTTGGTGTAGAG 3')	
NC001567[a]		

[a]GenBank erişim numarası

3.2.2.1. Multiplex konvansiyonel PCR

Türlere ait DNA'ların belirlenmesinde kullanılan multiplex konvansiyonel PCR analizi için hazır ticari master mix (abm 2X PCR Taq Plus Master Mix) kullanılmıştır. PCR karışımı hazırlanmasında 10 µl mastermiks içinde herbir primerden 1.5 µl ve 5 µl genomik DNA ilave edilerek toplam hacim PCR suyu ile 25 µl'ye tamamlanmıştır. Keçi sütünde inek ve koyun sütü aranması için oluşturulan PCR karışımı 95 ºC 5 dk ön denatürasyon işleme tabi tutulmuş ve amplifikasyon

aşamasında toplam 35 siklus 94 ºC 30 sn denatürasyon, 58 ºC 60 sn bağlanma, 72 ºC 60 sn uzama ve 72 ºC 5 dk final uzama protokolü uygulanmıştır.

Agaroz Jel Elektroforez

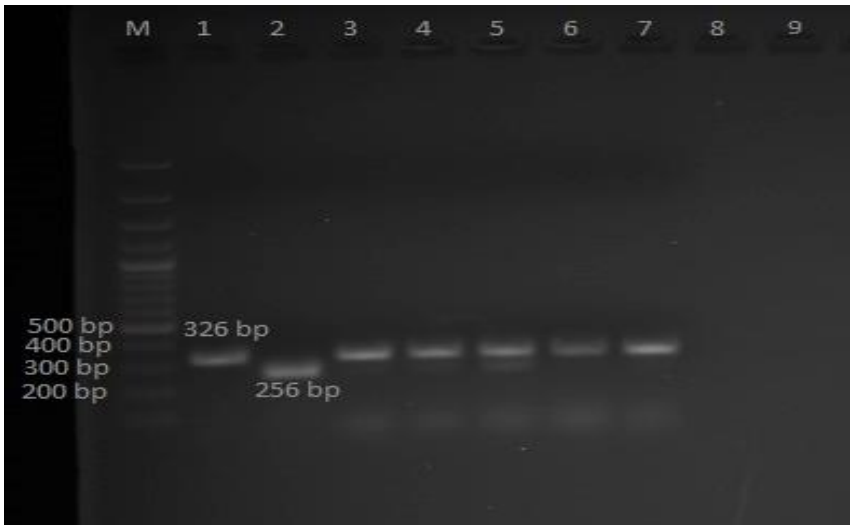
Multipleks konvansiyonel PCR işlemi sonucunda elde edilen amplikonların jel elektroforezi için gel-red (abm, Safe View Classic™ G108) ile boyanmış %1,5'lik agaroz jel (Vivantis, USA + Bioshop, TAE Buffer 50X Liquid concentrate) yatay (horizontal) tankta (Cleaver Scientific, multiSUB Midi, UK) hazırlanmış ve DNA Marker yardımıyla elde edilen spesifik DNA ve pozitif kontrol bantları jel görüntüleme cihazında (Genesis®) gözlemlenmiştir.

3.2.2.2. Multiplex Real Time PCR

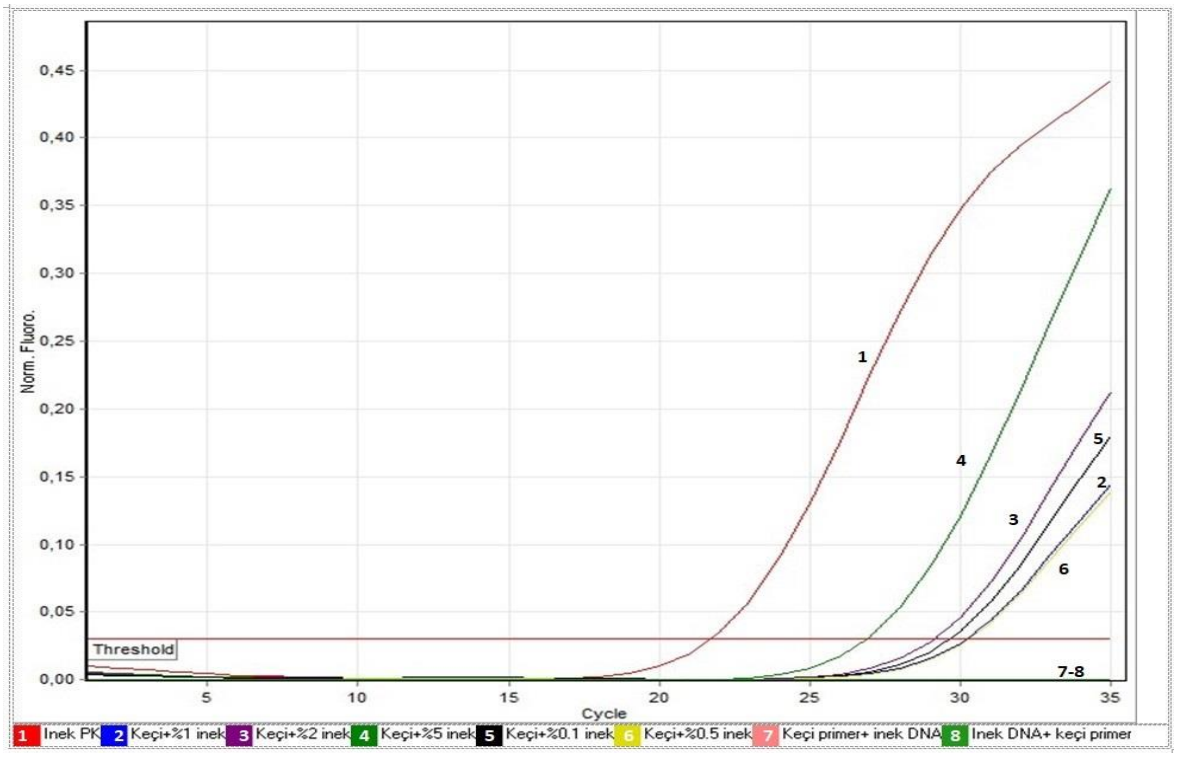
Türlere ait DNA'ların belirlenmesinde kullanılan multiplex Real Time PCR analizi için, hazır ticari kit (DİAGEN, 2103,2104,2110) kullanılmıştır. Bu amaçla üretici firmanın önerileri doğrultusunda her türe ait 10 µl mix A, 5 µl mix B ve 5 µl DNA dan oluşan ayrı ayrı PCR karışımı hazırlanmıştır. Oluşturulan PCR karışımı 95 ºC 5 dk ön denatürasyon işleme tabi tutulmuş ve amplifikasyon aşamasında toplam 35 siklus 95 ºC 10 sn denatürasyon, 59 ºC 30 sn bağlanma, 72 ºC 5 sn uzama ve 25 ºC 5 1 dk final uzama protokolü uygulanmıştır.

4. BULGULAR

Keçi sütünün içerisine %1, %2, %5, %0.1 ve %0.5, oranında inek sütü ve yine aynı oranlarda koyun sütü ilave edilmiş sütlerin analiz sonuçları Şeki 1, 2, 3 ve 4'te gösterilmiştir. Multipleks Real Time PCR sonuçlarına ait Ct değerleri ise Tabla 2 ve 3'te verilmiştir.



Şekil 1. Deneysel olarak hazırlanmış keçi sütü içerisinde inek sütü varlığının multipleks konvansiyonel PCR görüntüsü. M: 100 bp marker; 1: Keçi sütü (%100); 2: İnek sütü (%100); 3: Keçi ve inek sütü (%1) karışımı; 4: Keçi ve inek sütü (%2) karışımı; 5: Keçi ve inek sütü (%5) karışımı; 6: Keçi ve inek sütü (%0.1) karışımı; 7: Keçi ve inek sütü (%0.5) karışımı; 8: Keçi primer+inek DNA; 9: İnek Primer+keçi DNA

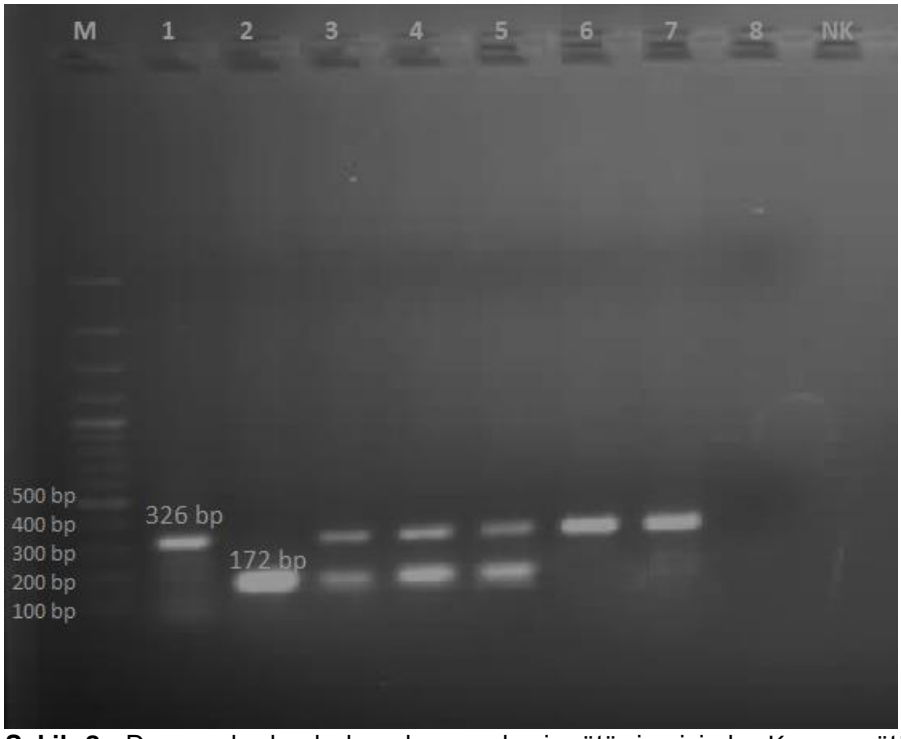


Şekil 2. Deneysel olarak hazırlanmış keçi sütü içerisinde inek sütü varlığının multipleks Real Time

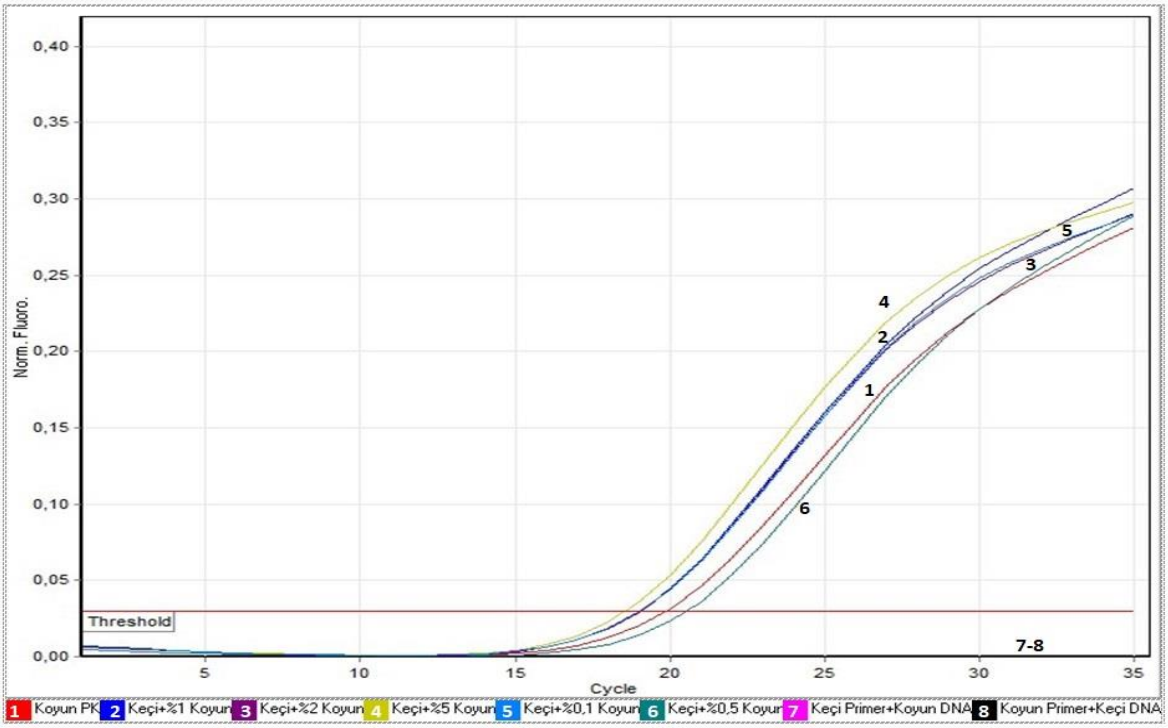
PCR görüntüsü. 1: DNA Mix (Keçi+inek); 2: Keçi ve inek sütü (%1) karışımı; 3: Keçi ve inek sütü (%2) karışımı; 4: Keçi ve inek sütü (%5) karışımı; 5: Keçi ve inek sütü (%0.1) karışımı; 6: Keçi ve inek sütü (%0.5) karışımı; 7: Keçi Primer+ inek DNA +; 8: İnek DNA+keçi primer

Tablo 2. Keçi ve inek sütü karışımlarında Real Time PCR Ct değerleri

No.	Colour	Name	Type	Ct
1		Inek PK	Positive Control	21,73
2		Keçi+%1 inek	Unknown	30,20
3		Keçi+%2 inek	Unknown	29,15
4		Keçi+%5 inek	Unknown	26,90
5		Keçi+%0.1 inek	Unknown	29,68
6		Keçi+%0.5 inek	Unknown	30,29
7		Keçi primer+ inek DNA	Negative Control	
8		Inek DNA+ keçi primer	Negative Control	



Şekil 3. Deneysel olarak hazırlanmış keçi sütü içerisinde Koyun sütü varlığının multipleks konvansiyonel PCR görüntüsü. M: 100 bp marker; 1: Keçi sütü (%100); 2: Koyun sütü (%100); 3: Keçi ve koyun sütü (%1) karışımı; 4: Keçi ve koyun sütü (%2) karışımı; 5: Keçi ve koyun sütü (%5) karışımı; 6: Keçi ve koyun sütü (%0.1) karışımı; 7: Keçi ve koyun sütü (%0.5) karışımı; 8: Keçi primer+Koyun DNA; 9: Koyun Primer+Keçi DNA



Şekil 4. Deneysel olarak hazırlanmış keçi sütü içerisinde koyun sütü varlığının multipleks Real Time PCR görüntüsü 1: DNA Mix (Keçi+koyun); 2: Keçi ve koyun sütü (%1) karışımı; 3: Keçi ve koyun sütü (%2) karışımı; 4: Keçi ve koyun sütü (%5) karışımı; 5: Keçi ve koyun sütü (%0.1) karışımı; 6: Keçi ve koyun sütü (%0.5) karışımı; 7: Keçi Primer+ koyun DNA +; 8: Koyun DNA+keçi primer

Tablo 3. Keçi ve koyun sütü karışımlarında Real Time PCR Ct değerleri

No.	Colour	Name	Type	Ct
1		Koyun PK	Positive Control	19,87
2		Keçi+%1 Koyun	Unknown	19,05
3		Keçi+%2 Koyun	Unknown	19,05
4		Keçi+%5 Koyun	Unknown	18,57
5		Keçi+%0,1 Koyun	Unknown	19,02
6		Keçi+%0,5 Koyun	Unknown	20,54
7		Keçi Primer+Koyun DNA	Negative Control	
8		Koyun Primer+Keçi DNA	Negative Control	

Multipleks konvansiyonel PCR işlemine ait jel elektroforez sonucunda (Şekil 1, Şekil 3) inek sütü ve koyun sütü DNA'sına ait en iyi bant %5'lik karışımda belirlenmiştir. Keçi sütüne %1 ve % 2 karıştırılmış inek sütü karışımına ait görüntü daha belirsiz iken aynı oranlardaki koyun sütü karışımlarında görüntü daha belirgin olarak tespit edilmiştir. Her iki türe ait %0.1 ve %0.5'lik karışımda ise görüntü belirlenememiştir.

Multipleks Real Time PCR işlemine ait sonuçlarda (Şekil 2, Şekil 4) keçi sütüne %0.1 oranında ilave edilmiş inek ve koyun sütünün tespit edilebildiği görülmüştür.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Süt, mükemmele en yakın gıda olarak kabul edilmektedir. Protein, mineral, vitamin gibi birçok bileşeni içerdiğinden yetişkinler için olduğu kadar çocuklar için de büyük önemi vardır (FDA, 1995).

Keçi sütünün toplum sağlığı ve beslenmesinde özel bir yeri vardır. Keçi sütünün yağ ve proteinlerinin sindirilebilirliğinin diğer sütlere oranla daha kolay olması bebek beslenmesinde ve sindirim hastalıklarının sağaltımında önem taşımaktadır. Aynı zamanda yüksek fosfor içeriğine sahip olmasından dolayı yeterince et ve balık tüketmeyen toplumların beslenmesine katkı sağlar. Kolay sindirilebilir ve düşük laktoz içeriğine sahip olan keçi sütü, inek sütü alerjisine yatkın kişiler için inek sütüne iyi bir alternatiftir (Güney ve Aşkın, 1997).

Süt ve süt ürünlerinin gıda alerjilerinin en çok görülen nedeni olduğu bilinmektedir. Düşük konsantrasyonlarda bile mevcut olan süt proteinlerinin çoğunun potansiyel alerjenler olduğu bildirilmiştir. Ayrıca inek sütü, insan advers reaksiyonundan sorumlu ana süt ürünü olarak rapor edilmiştir (Sampson 2003 ; Rance ve ark . 2005). Bu nedenle, keçi sütü ile inek sütü sahteciliği, mevcut gıda güvenliği gereksiniminde tür tanımlamasını önemli bir konu haline getiren bir sağlık riski olarak değerlendirilebilir. Bununla birlikte, süt üretim hattında daha pahalı olan sütün yerine daha ucuz bir süt türünün kullanılması yaygın olarak görülen ve tüketicinin dolandırılmasına neden olan bir uygulamadır (Addeo ve ark., 1995; Pesic ve ark., 2011; Osman ve ark., 2013). Bu nedenle, yeterli kontrol önlemlerinin alındığından ve gıda analistinin süt katkısının tespiti için uygun yöntemlere sahip olduğundan emin olarak tüketiciyi korumak önemlidir (Dennis, 1998).

Son zamanlarda, süt ürünlerinde tür tespiti büyük ilgi görmektedir. Devlet düzenlemeleri ve halk sağlığı ile ilgili çeşitli nedenlerle dikkate değer bir öneme sahiptir. Süt ürünlerinde tür ikamesine veya karışıma karşı koruma büyük önem taşımaktadır (Bottero ve ark., 2003). Ülkemizde de “Türk Gıda Kodeksi İçme Sütleri Tebliği” piyasaya arz edilen inek sütü haricindeki sütlerin etiketinde ürün adıyla birlikte sütün elde edildiği hayvanın tür adının belirtilmesi gerektiği bildirilmiştir (TGK, 2019).

Günümüzde süt ve süt ürünlerinde tür tanımlaması için immünolojik dahil olmak üzere farklı yöntemler kullanılmaktadır (Addeo et al, 1995). Başlarda Avrupa Birliği proteinlerin saptanmasına dair yöntemler önerse de (CR, 2001) son zamanlarda özellikle hayvansal kaynaklı gıdalarda tür tanımlaması için protein yerine nükleik asit temelli teknikleri kullanmaya başlanmıştır (Woolfe ve Primrose, 2004; Kumari ve ark., 2015). PCR, multipleks PCR, PCR-Kısıtlama Fragment Uzunluğu Polimorfizmi (PCR-RFLP) ve Real-Time PCR olmak üzere en yaygın kullanılan moleküler tekniklerdir (Bottero ve ark., 2003; Sakaridis ve ark., 2013; Jiang ve ark., 2013).

DNA tabanlı teknolojiler arasında PCR, ağır gıda işlemeden sonra bile küçük DNA miktarlarını hızlı ve spesifik bir şekilde çoğaltabilmektedir (Mafra ve ark., 2007; Rodríguez-Ramírez, ve ark., 2011). Ayrıca, hedeflenen gen bölgeleri nispeten küçük olduğundan gıdanın hazırlandığı

termal, kimyasal ve/veya fiziksel işlemlerle bozulan DNA molekülleri bile tespit edilebilir (Durummond ve ark., 2013).

Multipleks PCR ile, spesifik amplikonların farklı uzunlukta olması ve agaroz jel elektroforezi ile kolayca çözülmesi şartıyla, kompleks karışımlar tek bir adımda tespit edilebilir. Süt ürünleri ile ilgili olarak, genellikle sadece birkaç tür (inek, keçi, koyun ve manda) dahil olduğundan ve diğer bilinmeyen türlerin bulunması pek olası olmadığından, multipleks PCR avantajlı bir şekilde uygulanabilir (Bottero ve ark. 2003). Fakat konvansiyonel teknikler, tanımlanmış bir tespit limiti ile farklı türlerin kalitatif tespitine izin verirken Real Time PCR genellikle daha fazla duyarlılık ve özgüllük sunar ve türlerin tanımlanması için nicel bir yöntemdir (Walker ve ark., 2013).

Yapılan çalışmada multipleks konvansiyonel PCR'da tespit limiti %1 olarak belirlenmiştir. Çalışmada belirlenen tespit limiti Cheng ve ark. (2006), Mašková ve Paulíčková (2006) ile López-Calleja ve ark.'nın (2007) belirlediği limite benzer, Bottero ve ark. (2003), López-Calleja ve ark. (2004) ve Rodrigues ve ark.'nın (2012) belirlediği limitten yüksek bulunmuştur. Bu durum konvansiyonel tekniklerin tanımlanmış bir tespit limiti ile farklı türlerin kalitatif tespitine izin vermesine bağlanabilir.

Yapılan çalışmanın multipleks Real Time PCR sonucunda tespit limiti %0.1 olarak belirlenmiştir. Çalışmada belirtilen bu limit Agrimonti ve ark.'nın (2015) belirlediği limit ile benzer, Bobková ve ark.'nın (2009) belirlediği limitten daha yüksek bulunmuştur. Real Time PCR'da tespit limitinin daha düşük olması duyarlılığının ve özgüllüğünün daha fazla olmasına bağlanabilir. Aynı zamanda yapılan bazı çalışmalar da Real Time PCR'ın daha yüksek hassasiyete sahip olduğunu bildirmişlerdir (Di Pinto ve ark. 2017).

Sonuç olarak; Jel elektroforeze dayalı multipleks konvansiyonel PCR'ın tespit limitinin yüksek olması çok küçük miktarlarda karıştırılmış sütlerin belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Ayrıca bu yöntemde sıcaklık ve sürelerinin optimize edilmesi sırasında birden fazla tekrara gidildiği, böylece hem zaman hem de sarf malzemenin defalarca kullanıldığı tespit edilmiştir. Multipleks Real Time PCR tek seferde ve az malzeme ile hem küçük miktarların tespiti hem de kısa sürede ve hızlı sonuç verdiği için rutin uygulamalarda alternatif bir yöntem olarak tercih edilebilir. Bu çalışmada önerilen multipleks PCR, keçi, sığır ve koyun sütünün tespit edilmesi gereken süt ürünlerinin kontrolü için rutin olarak uygulanabilen hızlı ve etkili bir alternatif yöntemi temsil etmektedir.

KAYNAKLAR

Abdel- Rahman S M, Ahmed MMM (2007). Rapid and sensitive identification of buffalo's, cattle's and sheep's milk using species-specific PCR and PCR–RFLP techniques. Food Control, 18, 1246-1249.

Addeo FMA, Nicolai L, Chianese L, Moio S, Musso S, Bocca A, Del Giovine A (1995). A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting. *Milchwissenachaft* 50: 83-85.

Agrimonti C, Pirondini A, Marmiroli M, Marmiroli N (2015). A quadruplex PCR (qxPCR) assay for adulteration in dairy products, *Food Chemistry*, 187, 58-64.

Alférez MJM, Barrionuevo M, Aliaga IL, Sanz-Sampelayo MR, Lisbona F, Robles JC, Campos MS (2001). Digestive utilisation of goat and cow's milk fat in malabsorption syndrome. J Dairy Res; 68:451-461.

Alonso L, Fontecha J, Lozada L, Fraga MJ, Juárez M (1999). Fatty acid composition of caprine milk: major, branched-chain, and trans fatty acids. *J Dairy Sci,* 82, 878-84.

Altun D, Sarıcı SÜ (2017). Keçi sütü: Bebek beslenmesinde ilk tercih mi olmalı?. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 60, 22-33.

Amigo L, Ramos M Martin-Alvarez PJ, Barbosa M (1991). Effect of technological parameters on electrophoresis detection of cow's milk in ewe milk cheeses. *J Dairy Sci*, 74, 1482-1490.

Anguita G, Martin R, Garcia T, Morales P, Haza AI, Gonzalez I, Sanz B, Hernandez PE (1996). Immunostick ELISA for detection of cow's milk in ewe milk and cheese using a monoclonal antibody against bovine β-casein. *J FoodProt*, 59, 436-437.

Anonim (2016). Sütün Önemi ve Faydaları. https://tekirdag.tarim.gov.tr/Sayfalar/Detay.aspx?OgeId=81&Liste=Duyuru. Erişim tarihi: 16.07.2018

Anonymous (2002). McCance and Widdowson's The Composition of Foods. Sixth Summary Edition, Food Standards Agency, Cambridge, Royal Society of Chemistry.

Anonymous (2015). The role of milk and dairy products in human nutrition. http://theorganicfarmer.org/Articles/role-milk-and-dairy-products-human-nutrition, Erişim tarihi: 16.07.2018.

Auld GW, Bruhn CM, Mcnulty J, Bock MA, Gabel K, Lauritzen G, Medeiros D, Newman R, Nitzke S, Ortiz M, Read M, Schutz H, Sheehan ET (2000) Reported adoption of dietary fat and fiber recommendations among consumers. J Ame Dietetic Assoc 100: 52-58.

Bania J, Ugorski M, Polanowski A, Adamczyk E (2001). Application of polymerase chain reaction for detection of goats' milk adulteration by milk of cow. *J Dairy Res,* 68,333-336.

Bobková, A., Židek, R., Flimelová, E., Bobko, M., Fiková, M. (2009): Application of PCR method for milk adulteration and milk products identification. Potravinárstvo 3 (1), 1-3.

Boehm G, Stahl B (2007). Oligosaccharides from milk. Journal of Nutrition, 137, 847–849.

Bottero MT, Civera T, Nucera D, Rosati S, Sacchi P, Turi R M (2003). A multiplex polymerase chain reaction for identification of cow's, goat's and sheep's milk in dairy products. International Dairy Journal, 13, 277-282.

Bruhn CM, Schutz HG (1999). Consumer food safety knowledge and practices. *J Food Safety*, 19, 73-87.

Ceballos LS, Morales ER, Adarve GT, Castro JD, Martinez LP, Sampelayo MRS (2009). Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analysed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 322-329.

Chàvez NA, Salinas E, Jauregui J, Palomares LA, Macas K (2008). Detection of bovine milk adulterated with cheese whey by western blot immunoassay. *Food and Agricultural Immunology*, 19, 265-272.

Chen RK, Chang LW, Chung YY, Lee MH, Ling YC (2004). Quantification of cows' milk adulteration in goats' milk using high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom, 18, 1167-1171.

Cheng YH, Chen SD, Weng CF (2006). Investigation of Goats' Milk Adulteration with Cows' Milk by PCR. Asian-Aust J Anim Sci 19, 10, 1503-1507.

Chinese National Standard (CNS)(1998). Method of test for milk and milk products-detection of cow's milk in goat's milk. Chinese National Standard, No.14117, N6304, 1-3.

Commission Regulation (CR), 2001. Commission Regulation No. 213/01 of 9 January, 2001 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (E.C.) No. 1255/1999 as regards methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products and amending Regulations (E.C.) No.2771/1999 and (E.C.) No. 2799/1999. Official Journal of the European Communities, L037, 1-99.

Crittenden RG, Bennett (2006). Cow's milk allergy: A complex disorder. *Journal of the American College of Nutrition*, 24,6, 582-591.

Çom S (2008). Beslenmede Sütün Önemi. Ed: Ünal RN, Besler H. Hacetepe Üniversites, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Beslenme ve Dietetik Bölümü, Kısmet Matb, Ankara.

Dennis MJ (1998). Recent developments in food authentication. *Analyst*. 123: 151R-156R.

Di Pinto A, Terio V, Marchetti P, Bottaro M, Mottola A, Bozzo G, Bonerba E, Ceci E, Tantillo G (2017). DNA-based approach for species identification of goat-milk products. Food chemistry, *229*, 93-97.

Dias LA, Peres AM, Veloso ACA, Reis FS, Vilas-Boas M, Machado AASC (2009). An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk. *Sensors and Actuators B*, 136, 209-217.

Drummond MG, Brasil BSAF, Dalsecco LS, Brasil RSAF, Teixeira LV, Oliveira DAA (2013). A versatile real-time PCR method to quantify bovine contamination in buffalo products.*Food Control*, *29*(1), 131-137.

Ferreira IM, Caçote H (2003). Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of betalactoglobulins*. Journal of Chromatography A*, 1015, 111–118.

Food and Drug Administration (FDA) (1995). Center for Food Safety and Applied Nutrition. Defect Action Level Handbook. Washington Printing Office, Washington, DC.

fraud. Trends Biotechnol, 22: 222-226.

Garcia V, Rovira S, Boutoial K, Lopez MB (2014). Improvements in goat milk quality: A review. Small Rumin Res, 121: 51-57.

Getaneh G, Mebrat A, Wubie A, Kendie H (2016). Review on goat milk composition and its nutritive value. Journal of Nutrition and Health Sciences, 3,4.

Golinelli LP, Carvalho AC, Casaes R S, López CSC, Deliza R, Paschoalin VMF, Silva JT (2014). Sensory analysis and species-specific PCR detect bovine milk adulteration of frescal (fresh) goat cheese. *Journal of Dairy Science*, 97, 6693-6699.

Güney O, Kaymakçı M (1997) Keçi Yetiştiriciliği. Ed: Kaymakçı M, Aşkın Y. Baran Ofset, Ankara.

Haenlein GFW (2002). Composition of goat milk and factors affecting it. Small Rumi Res 51: 155-63.

Haenlein GFW (2004). Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Res*, 51(2):155-163.

Harden CJ, Hepburn NJ (2011). The benefits of consuming goat's milk. Centre for food innovation; a fresh prospective on food. Shiffield Hallam University, 1-14.

Herman L (2001). Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. *Journal of Dairy Research*, 68 429-436.

Hurley IP, Ireland HE, Coleman RC, Williams JHH (2004). Application of immunological methods for the detection of species adulteration in dairy products. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 873–878.

Jiang YB, Wang H, Hou DJ, Yin J, Li T, Tian XL, Li XN, Yu L (2013). Identification of bovine, buffalo and yak milk with polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism. *J Food Agriculture and Environment*, 11: 455-457

Khanzadi S, Jamshidi A, Razmyar J, Mohsenzadeh M (2013). PCR-based detection of cow and goat milk in sheep milk and dairy products marketed in Mashhad city of Iran. *IJVM*, 7, 4, 257-262.

Kim HH, Jimeez-Flores R (1993). Two dimensional analysis of skim milk proteins using preparative isoelectric focusing followed by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Food Biochem,* 16,307-321.

Kumari R, Rank DN, Kumar S, Joshi CG, Lal SV (2015). Real time PCR an approach to detect meat adulteration, *Buffalo Bulletin*, 34: 124-129.

Lara-Villoslada F, Debras E, Nieto A , Concha A , Ga´lvez J, Lo´pez-Huertas E , Boza J, Obled C, Xaus J (2006). Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis. *Clinical Nutrition,* 25, 477-488.

LeeCC, Chang HS, Sheen HS (2004). A quick novel method to detect the adulteration of cow milk in goat milk. Asian-Aust J Anim Sci, 17,420-422.

López-Calleja I, González I, Fajardo V, Rodríguez MA, Hernández P E, García T (2007). Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goats' milk cheeses. International Dairy Journal, 17, 87-93.

López-Calleja I, González I, Fajardo V, Rodríguez MA, Hernández PE, García T, Martín R (2004). Rapid detection of cows' milk in sheeps' and goats' milk by a species-specific polymerase chain reaction technique. J Dairy Sci, 87, 9, 2839-45.

Lui RH (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Nutrition*, 78(3):5175-5205.

Mafra I, Ferreira I, Oliveira B (2007). Food authentication by PCR-based methods. European *Food Research and Technology*, 227(3), 649-665.

Mašková, E., Paulíčková, I. (2006): PCR-based detection of cow's milk in goat and sheep cheeses marketed in the Czech Republic. Czech J. Food Sci. 24, 127-132.

Maudet C, Taberlet P(2001). Detection of cows' milk in goats' cheese inferred from mitochondria DNA polymorphism. *J Dairy Res,* 68, 229-235.

Mayer HK, Bürger J, Kaar N (2012). Quantification of cow's milk percentage in dairy products- A myth?. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, 3031-3040.

Moatsou G, Anifantakis E (2003) Recent developments in antibody-based analytical methods for the differentiation of milk from different species. *Int J Dairy Technol*, 56, 133-138.

Osman AA, Aradaib IE, Musa OA (2013). Detection of caprine specific nucleic acid sequences in goat milk using polymerase chain reaction. Materia Socio-Medica, 25, 105-108.

Park YW (1994). Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat's milk. *Small Ruminant Res*, 14, 115-159.

Park YW (2006). Goat milk. Chemistry and nutrition. Eds: Park YW, Haenlein, GFW In: "Handbook of Milk of Non-bovine Mammals". Blackwell Publishing, Oxford.

Pesic M, Barac M, Vrvic M, Ristic N, Macej O, Stanojevic S (2011). Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and ovine milks using native-PAGE. *Food Chemistry* 125, 1443-1449.

Prosser CG, McLaren RD, Frost D, Agnew M, Lowry DJ (2008). Composition of the non-proteİn nitrogen fraction of goat whole milk powder and goat milk-based infant and follow-on formulae. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59, 2, 123-133.

Rance F, Grandmottet X, Grandjean H (2005). Prevalence and main characteristics of school children diagnosed with food allergies in France. *Clinical Experimental Allergy*. 35 167-172.

Ritcher W, Krause I, Graf C, Sperrer I, Schwarza C, Klostermeyer H (1997). An indirect competitive ELISA for the detection of cows' milk and casein in goat's and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine γ-caseins. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 204, 21-26.

Rodrigues NPA,Givisiez PEN, Queiroga RCRE, Azevedo PS, Gebreyes WA, Oliveira CJB (2012). Milk adulteration: Detection of bovine milk in bulk goat milk produced by smallholders in northeastern Brazil by a duplex PCR assay. Journal of Dairy Science, 95, 5, 2749-2752.

Rodríguez N, Ortiz MC, Sarabia L, Gredilla E (2010). Analysis of protein chromatographic profiles joint to partial least squares to detect adulterations in milk mixtures and cheeses. *Talanta*, 81, 255-264.

Rodríguez-Ramírez R, González-Córdova AF, Vallejo-Cordoba B (2011). Review: authentication and traceability of foods from animal origin by polymerase chain reaction-based capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 685(2), 120-126.

Rutherfurd SM, Moughan PJ, Lowry D, Prosser CG (2008). Amino acid composition determined using multiple hydrolysis times for three goat milk formulations. International Journal of Food Science and Nutrition, 59, 679-690.

Sakaridis L, Ganopoulos L, Argiriou A, Tsaftaris A (2013). High resolution melting analysis for quantitative detection of bovine milk in püre water buffalo mozzarella and other buffalo dairy products. *International Dairy Journal*, 28: 32-35.

Sampson HA (2003). Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*.111,S540-S547

Savran F, Aktürk D, Dellal İ, Tatlıdil F, Dellal G, Pehlivan E (2011). Türkiye'de seçilmiş bazı illerde keçi sütü ve ürünleri tüketimine etkili faktörler. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi,17(2), 251-256.

Silanikove N, Leitner G, Merin U, Prosser CG (2010). Recent advances in exploiting goat's milk: quality, safety and production aspects. *Small Ruminant Research*, 89, 110-124.

Tomotake H, Okuyama R, Katagiri M, Fuzita M, Yamato M, Ota F (2006). Comparsion between Holstein cow's milk and Japanese-Saanen goat's milk in fatty acid composition, lipid digestibility and protein profile. Biosci Biotechnol Biochem , 70, 2771-2774.

Türk Gıda Kodeksi (TGK) (2017). Gıda etiketleme ve tüketicileri bilgilendirme yönetmeliği. Resmî Gazete, 26 Ocak 2017, Sayı: 29960.

Türk Gıda Kodeksi (TGK) (2019). Türk Gıda Kodeksi İçme Sütleri Tebliği. Resmi Gazete, 27 Şubat 2019, Tebliğ No: 2019/12

Viverge D, Grimmonprez L, Solere M (2007). Chemical characterization of sialyl oligosaccharides isolated from goat (Capra hircus) milk. Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects, 1336, 157–164.

Walker JM, Burns M, Burns DT (2013). Horse meat in beef products species substitution. *J Assoc Public Analysis*, 41: 67-106.

Woolfe M, Primrose S (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and

Yangılar F (2013). As a potentially functional food: goats' milk and products. *Journal of Food and Nutrition Research,* 1, 4, 68-81.

Yaralı E, Atay O, Gökdal Ö, Çetiner Ş (2013). Keçi sütünün insan beslenmesş açısından önemi ve Türkiye'de ve dünyada keçi sütü üretimi. *Agrotime*, 1, 1, 100-109.