

## Şanlıurfa'da Tüketime Sunulan Koyun Peynirlerinde İnek Sütü Varlığının Belirlenmesi

Serap Kılıç ALTUN<sup>1\*</sup>, Hisamettin DURMAZ<sup>1</sup>

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

Geliş Tarihi: 03.11.2017 Kabul Tarihi: 19.11.2017

**Özet:** Koyun peyniri ülkemizde tercih edilen peynir türlerindedir. Koyun sütünün gerek pahalı gerekse temin edilmesinin daha zor olması nedeniyle koyun peyniri üretiminde inek sütü ilavesi yapılmaktadır. Bu çalışmada, Şanlıurfa ilinde perakende satışa sunulan 45 adet ambalajlı, 45 adet ambalajsız olmak üzere toplam 90 adet koyun peynir örneğinde ELISA metodu ile inek sütü varlığının tespiti amaçlandı. ELISA metoduna göre koyun peynir örneklerinin içerdiği inek sütü oranları %0.1'in altında, % 1'in altında ve %1'in üzerinde olmak üzere sınıflandırıldı. İncelenen toplam 90 adet koyun peyniri örneğinin 7'sinde (% 7.7) % 0.1'in altında, 53'ünde (% 58.8) % 1'in altında ve 30'unda (% 33.3) ise % 1'in üzerinde inek sütü bulunduğu tespit edildi. Süt ve süt ürünlerinde hileyi önlemek için yanıltıcı etiketlemeden koruyabilecek analitik prosedürlerin yaygınlaştırılması gerektiği kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Koyun peyniri, İnek sütü, Sığır IgG, ELISA.

### Detection of Cow's Milk in Ovine Cheese Consumed in Sanliurfa Province

**Abstract:** Ovine cheese is a preferred type of cheese in our country. Because ovine milk is more expensive and difficult to obtain, cow milk is added in the production of ovine cheese. The aim of this study was to determine the presence of cow's milk by ELISA method in 90 ovine cheese samples including 45 packaged and 45 unpackaged samples which are offered for retail sale in Sanliurfa province. The proportion of cow's milk contained in ovine cheese samples was classified as below 0.1%, below 1% and over 1% according to the ELISA method. In 7 (7.7%) of 90 ovine cheese samples, it was below 0.1%, 53 (58.8%) in sample below 1% and in 30 (33.3%) over 1% cow milk was detected. To prevent adulteration in milk and dairy products, analytical procedures that can protect consumers from misleading labeling should be widespread.

**Keywords:** Ovine cheese, Cow milk, Bovine IgG, ELISA.

### Giriş

Günümüzde kendine özgü kompozisyona sahip geleneksel ürünlere karşı artan talepten dolayı, üreticiler saf koyun ve saf keçi sütünden peynir üretmeye yönelmişlerdir. Türkiye'de koyun peyniri, en sevilen peynir türlerinden biri olup tamamıyla koyun sütünden üretilmesi gerekmektedir (Çolak ve ark., 2006). Fakat üreticiler, inek sütünün daha ucuz ve daha yaygın olarak bulunmasından dolayı inek sütünü koyun sütüne ikame etmekte ve bu hile yaygın olarak kullanılmaktadır (Ferreira ve Cacote, 2003).

Süt ürünlerinde otantisite analizleri yalnızca ekonomik açıdan değil, aynı zamanda sağlık ve dinsel yönlerden de tüketici haklarını ilgilendiren önemli konulardan biridir (De la Fuente ve Juárez, 2005). Bu nedenle, peynirlerde süt türlerinin saptanması önemli bir işlem olup özellikle saf koyun peyniri gibi Menşe Adı Korunmuş (*Protected Designation of Origin*-PDO) olanlar bu konuda önem arz etmektedir. Türkiye'de koyun sütünün inek sütü ile ikame edilerek yapılan hileyi önlemek için, bu hileyi tespit edebilecek ve tüketicileri yanıltıcı etiketlemeden koruyabilecek analitik prosedürlerin uygulanması ve yaygınlaştırılması gerekmektedir. Aksi takdirde bu tür hileler sonucu tüketiciler;

maddi, manevi ve sağlık sorunları yaşayabilmektedirler. Örneğin; çeşitli hayvan sütleri bazı insanlarda alerjik reaksiyonlara neden olabileceği gibi, bazı sütünlerin tüketilmesi (at ve domuz sütü gibi) dinsel yönlerden de sakıncalı olabilmektedir (Çokuğraş ve Akçakaya, 1991; Koşum, 2013).

Süt türlerinin belirlenmesinde farklı analitik yöntemler uygulanmaktadır. Bunlar arasında; gaz-likit kromatografi (Iverson ve Sheppard, 1989; Prager, 1989), yüksek performanslı likit kromatografi (Krause ve ark., 1982), jel elektroforez (Pierre ve Portmann, 1970; Ramos ve ark., 1977; Ramos ve ark., 1985) ve izoelektrik odaklanma (Addeo ve ark., 1989; Krause ve ark., 1982; Rispoli ve Saugues, 1989) gibi immünolojik olmayan yöntemler vardır. Bu yöntemler, otantisite analizlerinde etkili olmasına rağmen zaman alıcı ve test başına nispeten yüksek maliyetli olduklarından dolayı rutin analizlerde henüz kullanıma girmemişlerdir. Süt türlerinin tespitinde uygulanan diğer yöntemler ise; agar-jel immüno-difüzyon, (Durand ve ark., 1974; Gombocz ve ark., 1981), immüno-elektroforez (Elbertzhagen, 1987) ve Enzim Linked Immunosorbent Assay (Rodriguez ve ark., 1990) gibi immünolojik metotlar da

kullanılmaktadır. ELISA, tespit limitinin düşük olması ve analiz süresinin kısa olması nedeniyle gıda analizlerinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Borkova ve Snaselova, 2005). Bu metot, pahalı aparatlara ve yüksek vasıflı teknik elemanlara gereksinim duyulmadan spesifik ve güvenilir gıda analizi yapılmasını sağlar. Aynı zamanda bu analiz metodu kolay, spesifik ve ucuzdur.

Yapılan literatür taramasında Şanlıurfa ve yöresindeki koyun peynirlerinde inek sütü ilavesi ile ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada, Şanlıurfa ilinden temin edilen koyun peynirlerinde inek sütü varlığının, ELISA metodu kullanılarak tespiti amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

**Örneklerin Toplanması:** Bu çalışmada, 45'er adet ambalajlı ve ambalajsız olmak üzere toplam 90 adet koyun peyniri materyal olarak kullanıldı. Örnekler Mart-Temmuz 2016 tarihleri arasında Şanlıurfa ilinden temin edildi. Ambalajlı koyun peyniri örnekleri marketlerden orijinal ambalajında, ambalajsız koyun peyniri örnekleri (250 g) ise semt pazarlarından aseptik şartlarda plastik poşetlere alınıp derhal laboratuvara getirildi. Örnekler analiz edilinceye kadar +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi.

**Standart Peynir Örneklerinin Üretimi:** Standart peynir örneklerinin üretimi, Karaman (2007)'in beyaz peynir yapım yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla çiğ süt (+4°C) 42°C'de ön ısıtma işlemi takiben standardizasyon ve 63°C'de 30 dk. pastörizasyon işlemine tabi tutuldu. Mayalanma sıcaklığına (33°C) kadar soğutularak teknelere alındı. Bu aşamada tekneler numaralandırıldı. 1 numaralı tekneye %90 koyun sütü+%10 inek sütü, 2 numaralı tekneye %99 koyun sütü+%1 inek sütü, 3 numaralı tekneye %99.9 koyun sütü+%0.1 inek sütü alındı. Starter kültür ve %0.02 CaCl<sub>2</sub> ilave edildikten sonra 33°C'de ön olgunlaşmaya bırakıldı. Kuvveti 1/16000 olan maya ile mayalandıktan 70-80 dk. sonra peynir pıhtısı elde edildi. Oluşan teleme 1cm<sup>3</sup> boyutlarında kesilerek 30 dk. daha bekletildi ardından süzülerek kalıplandı. 15°C'de 5 saat %14 tuzlu salamura bekletilen peynir kalıpları analiz edilinceye kadar +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi. Hazırlanan standart peynir örnekleri ELISA kit standartları ile analiz edildi ve örnek bulgularıyla karşılaştırıldı.

**Peynir Örneklerinin ELISA Testi İçin Hazırlanması:** 1 g peynir örneği 10 mL distile su ile homojenize edildi. Homojenat 10 dk. süre ile 15°C'de 4000 devirde santrifüj edildi. ELISA testi için hazırlanan

her bir örnekten 100 µL plakanın herbir kuyucuğuna alındı.

**ELISA Test Prosedürü:** Koyun peynirlerinde inek sütünün varlığını tespit etmek amacıyla RIDASCREEN CIS (Art. No.R4302) ELISA kiti kullanıldı. Kit, 48 kuyucuklu mikroplaka, %10, %1 ve %0.1 inek sütü içeren standartlar, konjugat, substrat, tetrametilbenzidin içeren kromojen, konjugat, dilüsyon tamponu ve durdurma reaktifi içermektedir. Bu amaçla, kuyucukları sığır IgG'sine karşı spesifik antikorlarla kaplı ELISA plakası kullanılmıştır. Plakanın ilk altı kuyucuğuna 3 standarttan çift tekrarlı, diğer kuyucuklara ise her bir örnekten bir kez 100 µL eklendi. Plaka 30 dk. oda ısısında inkübe edildikten sonra plakanın kuyucukları tamamen boşaltılarak tüm kuyucuklara 250 µL distile su doldurularak yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemi iki kez daha tekrarlandı. Her göze 100 µL seyreltilmiş enzim konjugat eklendi, plaka elle sallanarak hafifçe karıştırıldı ve 30 dk. oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyonu takiben plakanın tüm kuyucukları boşaltıldı ve yıkama işlemi distile su ile 3 kez tekrarlandı. Her kuyucuğa 50 µL substrat ve 50 µL kromojen eklendi ve plaka sallanarak karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edildi. Bu sürenin sonunda plakanın tüm kuyucuklarına 100 µL durdurma reaktifi eklendi. Plaka manuel olarak hafifçe sallanarak karıştırıldı ve 30 dk. içinde absorbanı 450 nm'de ELISA okuyucuda ölçüldü.

## Bulgular

Bu çalışmada analiz edilen 45 ambalajlı, 45 ambalajsız toplam 90 adet koyun peyniri örneği inek sütü varlığı açısından ELISA testi ile değerlendirildi. ELISA test kiti direktifine göre, %0.1 inek sütü içeren standardın 450 nm'de verdiği absorban değerinden düşük olan absorban değerine sahip peynir örneklerinin %0.1'den az inek sütü içerdiği, absorban değerleri %0.1 ile %1 olan standartların verdiği değerler arasında kalan peynir örneklerinin %1'den az inek sütü içerdiği, absorban değeri %1 inek sütü içeren standardın verdiği değerden yüksek olan peynir örneklerinin ise %1'den fazla inek sütü içerdiği kabul edildi. Laboratuvarda hazırlanan standart peynir örnekleri ile test kitinin standartlarının absorban değerlerinin benzer olduğu görüldü (Tablo 1). Ambalajlı koyun peyniri örneklerinin %6.6'sında %0.1'in altında, %53.3'ünde %1'in altında, %40'ında ise %1'in üzerinde inek sütü tespit edilirken, ambalajsız koyun peyniri örneklerinde ise %8.8'inde %0.1'in altında, %64.4'ünde %1'in altında, %26.6'sında ise %1'in üzerinde inek sütü tespit edildi. Toplam 90 adet koyun peyniri örneğinin %7.7'sinde %0.1'in altında,

%58.8'inde %1'in altında, %33.3'ünde ise %1'in üzerinde inek sütü tespit edildi (Tablo 2).

**Tablo 1.** Kit standartları ile peynir standartlarının absorbands değerleri.

Kit standardı	Absorbans değeri (450 nm)	Laboratuvar Standardı	Absorbans değeri (450 nm)
%10 inek sütü	2.741	%10 inek sütü	2.668
%1 inek sütü	2.628	%1 inek sütü	2.621
%0.1 inek sütü	1.333	%0.1 inek sütü	1.301

**Tablo 2.** Koyun peynir örneklerinde ELISA ile tespit edilen inek sütü oranları (%).

Örnek	<% 0.1	<% 1	>%1
Ambalajlı koyun peyniri	3	24	18
Ambalajsız koyun peyniri	4	29	12
<b>Toplam</b>	<b>7</b>	<b>53</b>	<b>30</b>

## Tartışma ve Sonuç

Avrupa Birliği standartlarına göre peynirde inek sütü tespit limitinin %1'in altında olması, karışık sütlerden (inek, koyun, keçi, manda) elde edilen peynirlerde üretimde kullanılan sütlerin oranlarının ürün etiketi üzerinde belirtilmesi gerektiği bildirilmektedir (Anonim, 2001). Koyun peynirlerinde inek sütü varlığının araştırılması için kullanılan elektroforez metodu ile yapılan araştırmalarda süt proteinleri ve özellikle kazeinin sınıflandırılması ayırıcı tanıda esas teşkil etmektedir. Poliakrilamid jel elektroforez ile Isparta ilinde Şimşek ve Uraz (2008) tarafından yapılan araştırmada koyun peynirlerinde %11.1 oranında kazein azotu tespit edilmiştir. Araştırmacılar SDS-PAGE ve native-PAGE ile koyun peynirlerinde inek  $\alpha_2$ -kazeini ile tespit limitini %5 olabileceği bildirilmiştir. Araştırmacıların kullandığı yöntem ile bu çalışmada kullanılan ELISA yöntemi kıyaslandığında, bu çalışmada kullanılan metodun tespit limitinin daha yüksek olduğu ve peynir örneklerinde inek sütünün belirlenmesinin daha kolay olduğu düşünülmektedir.

İzoelektrik odaklanma (IEF), Avrupa Birliği tarafından koyun, keçi ve bufalo sütlerinden üretilen peynirlerde inek sütü varlığını araştırmak için önerilen metotlardan biridir. Metodun temel prensibi  $\gamma_2$  ve  $\gamma_3$  kazeinlerinin tespitidir. Tespit limiti %1 olup bu çalışmada kullanılan ELISA metodunun tespit limitinden yüksektir (Anonim, 2001). Ayrıca analiz için daha uzun süre gerektiği ayrı bir dezavantaj olarak görülmektedir. PCR ile yapılan araştırmalarda tespit limitinin %0.1 olduğu ve sığır sütüne spesifik Bos taurus  $\beta$ -casein geninin kullanıldığı bir araştırmada koyun, keçi ve bufalo sütlerinde %5 oranında hilenin tespit edildiği bildirilmiştir (Klotz ve Einspanier, 2001).

Koyun peynirlerinde inek sütü varlığının araştırılması amacıyla immüno-kimyasal metotlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Temel prensip

spesifik mono veya poliklonal antikorların tespitidir. Reaksiyonlar, genellikle sığır IgG,  $\beta$ -Lg, k-Kazein, kazein ve  $\alpha_{s1}$ -kazein antikorları ile gerçekleştirilmektedir (Zeľeňáková ve ark., 2010). Bu metotların hassasiyeti %0.5'in altındadır. Bu araştırmada kullanılan ELISA metodunda sığır IgG antikorunu tespit etmek hedeflenmiştir. Testin hızlı, tespit limitinin düşük olması (%0.1), hassasiyeti ve peynir örneklerinde güvenli sonuç vermesi gibi avantajlarının yanı sıra; hilenin tespitinde IgG'lerin yüksek sıcaklıkta denatüre olması nedeniyle UHT süt örneklerinde doğru sonuç verememesi dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Song ve ark. (2010)'nın sığır  $\beta$ -kazeini temelli indirekt ELISA yöntemi ile yapmış oldukları araştırmada keçi sütlerinde %2-50 oranında inek sütü hilesini tespit edebildiklerini rapor etmişlerdir. Türkiye'de yapılan bir çalışmada, İstanbul ilindeki marketlerden toplamış oldukları 100 adet koyun peynir örneği ile yaptıkları çalışmada immüno-kromatografik metotla örneklerin %48'inde inek sütü tespit ettiklerini bildirilmiştir. Araştırmacılara ait bu veri göz önünde bulundurulduğunda, bu çalışmada %1'in üzerinde inek sütü hilesi tespit edilen peynir oranının (%33.3) daha düşük olduğu görülmektedir (Çolak ve ark., 2005).

Sonuç olarak, Şanlıurfa ilinden temin edilen toplam 90 adet koyun peynir örneğinin 30 (%33.3)'unda %1'in üzerinde inek sütü tespit edilmiş olup, süt ve süt ürünlerinde gerek halk sağlığı gerekse haksız kazancın ve dolayısıyla ülke ekonomisinin korunması amacıyla hilelerin önlenmesi ve bu amaçla analitik prosedürlerin rutin olarak uygulanması ve ürün etiketlerinde üretimde kullanılan farklı türlere ait sütlerin ve oranlarının belirtilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

## Kaynaklar

- Addeo F, Moio L, Chianese L, Nota G, 1989: Evaluation of bovine and water buffalo milk in mixtures of liquid milk and Mozzarella cheese by gel isoelectric focusing. *Italian J Food Sci*, 1, 71-80.
- Anonim, 2001: European Commission, 2001: EC 213/2001 Methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products. *Official Journal of the European Communities*, 44, L37/1-L37/99.
- Borkova M, Snaselova J, 2005: Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products—a review. *Czech J Food Sci*, 23(2), 41-50.
- Çokuğraş H, Akçakaya N, 1991: Besin Allerjileri, "Temel Allerji". V. *Ulusal Allerji Kongresi*, 203-213, Ankara.
- Çolak H, Aydın A, Nazlı B, Ergun O, 2006: Detection of presence of cow's milk in sheep's cheeses by immunochromatography. *Food Control*, 17(11), 905-908.
- De la Fuente MA, Juárez M, 2005: Authenticity assessment of dairy products. *Crit Rev Food Sci*, 45, 563-585.
- Durand MM, Meusnier M, Delahaye J, Prunet P, 1974: Detection of l'addition frauduleuse de lait de vache dans les laits de chevre et de brebis par la metode de l'immunodiffusion en gelose. *Bull Acad Vet*, 47, 247-258.
- Elbertzhagen H, 1987: Detection of bovine casein in sheep and goat milk cheese by means of immunoelectrophoresis. *Z Lebensm Unters Forsch*, 185, 357-361.
- Ferreira I, 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 beta-lactoglobulins. *J Chromatogr A*, 1015, 111-118.
- Gombocz E, Hellwing E, Petuely F, 1981: Immunological estimation of bovine casein in sheep cheese products. *Z Lebensm Unters Forsch* 172, 178-181.
- Iverson JL, Sheppard J, 1989: Detection of adulteration in cow, goat, and sheep cheeses utilizing gas-liquid chromatographic fatty acid data. *J Dairy Sci*, 72, 1707-1712.
- Karaman AD, 2007: Yağı azaltılmış beyaz peynir üretimi ve özelliklerine homojenizasyonun etkisi. Doktora tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Klotz A, Einspanier R, 2001: Development of a DNA based screening method to detect cow milk in ewe, goat and buffalo milk and dairy products using PCR-LCREIA-technique. *Milchwissenschaft*, 56, 67-70.
- Koşum A, 2013: Hayvansal ürünlerin üretiminde besleme ve helallik. *Journal of Islamic Law Studies*, 22, 11-18.
- Krause I, Belitz HD, Kaiser KP, 1982: Detection of cow's milk in sheep's and goat's milk and cheese by isoelectric focusing on thin layers of polyacrylamide gels containing urea. *Z Lebensm Unters Forsch*, 174, 195-199.
- Pierre A, Portmann A, 1970: Emploi de l'electrophorese en gel de polyacrylamide pour mettre en evidence et doser le lait de vache ajoute au lait de chevre. Application au cas de fromages. *Ann Technol Agr*, 19, 107-130.
- Prager MJ, 1989: Differential characteristics of fatty acids in cheese from milk of various animal species by capillary gas chromatography. *J Assoc Off Anal Chem*, 72, 418-421.
- Ramos M, Martinez-Castro I, Juarez M, 1977: Detection of cow's milk in manchego cheese. *J Dairy Sci*, 60, 87-877.
- Ramos M, Sanchez RM, Olano A, 1985: Studies on quantitative determination of caseins using polyacrylamide gel electrophoresis. *Chem Mikrobiol Technol Lebensm*, 9, 24-27.
- Rispoli S, Saugues R, 1989: Isoelectrofocalisation des lactoserum de fromages de melange brebis-vache sur gel de polyacrylamide. Application a la recherche et au dosage du lait de vache dans les fromages de brebis. *Lait*, 69, 211-222.
- Rodríguez E, Martín R, García T, Hernández PE, Sanz B, 1990: Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Dairy Res*, 57(2), 197-205.
- Song H, Xue H, Han Y, 2011: Detection of cow's milk in Shaanxi goat's milk with an ELISA assay. *Food Control*, 22(6), 883-887.
- Şimşek B, Uraz T, 2008: Koyun ve inek sütü karışımından yapılan beyaz peynirlerde süt türü oranının belirlenmesi. *Gıda Dergisi*, 33(2), 75-82.
- Zeleňáková L, Židek R, Čanigová M, 2010: Reliability of cow casein quantitation in sheep milk and cheese by ELISA method. *Journal of Food Physics*, 23, 22-26.

\*Yazışma Adresi: Serap Kılıç ALTUN

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

e-mail: vetserapaltun@hotmail.com