

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ETÇİ SIĞIR IRKLARINDA KALPASTATİN (CAST) GENİNDEKİ
POLİMORFİZMLERİN YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ**

Esin ÇALIK

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2020**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

ETÇİ SIĞIR IRKLARINDA KALPASTATİN (CAST) GENİNDEKİ POLİMORFİZMLERİN YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ

Esin ÇALIK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kezban CANDOĞAN

Çalışmada, Türkiye’de kesimi yaygın olan etçi sığır özellikleriyle Brangus ve Simmental ırklarına ait et örneklerinde, çok sayıda gen ya da gen bölgesini ve büyük DNA dizilerini aynı anda tarayabilen Yeni Nesil Dizileme (NGS) teknolojisi kullanılarak kalpastatin (CAST) geninin tüm gen dizi analiz yapılmıştır. Ayrıca, CAST genine ait belirlenen polimorfizmlerin duyusal özellikler (sertlik, sululuk, lezzet yoğunluğu) ve enstrümental sertlik arasındaki ilişki düzeyi değerlendirilmiştir. Çalışılan 52’şer Brangus ve Simmental ırkından toplam 104 hayvanda 13 varyasyon saptanmıştır. Bu 13 varyasyondan 5’i sadece Brangus’ta, 3’ü sadece Simmental’de, diğer 5 tanesi her iki ırkta da bulunmuştur. Sadece 2 Brangus’ta bulunan EKZON 8c.439C>G/p.L147LV ve 14 Simmental’de saptanan INTRON 18c.1335+6G>A önceden rapor edilmemiş olduğundan bu iki varyasyonun olası yeni varyantlar olarak literatüre kazandırılması mümkün olacaktır. Duyusal analizde, Simmental ırkına ait örneklerin Brangus örneklerine göre önemli ölçüde daha gevrek olduğu ($p<0.05$); sululuk ve lezzet yoğunluğu açısından Simmental örneklerinin Brangus gruptan daha yüksek puanlar ($p<0.05$) aldığı belirlenmiştir. Simmental ırkta 52’şer örnekten hesaplanan ortalama enstrümental sertlik değerinin (116.41 N), Brangus ırktan (196.97 N) önemli ölçüde daha düşük olduğu, yani Simmental et örneklerinin daha gevrek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Brangus ırka ait hiçbir hayvanda tespit edilmeyen, Simmental grupta ise 52 hayvandan 11’inde bulunan EKZON 26 c.1985G>C/p.S662T varyasyonunun, enstrümental ve duyusal gevrekliği iyileştirici etki gösterdiği saptanmıştır ($p<0.05$). Bu çalışmadan elde edilen bulgular, CAST geninde bugüne kadar belirlenmiş olan polimorfizmlerin dağılımları yanında, yeni polimorfizmlerin literatüre kazandırılması ve bu polimorfizmlerin et gevrekliği üzerinde öne sürülen etkisinin ortaya konulması açısından katkı sağlayacak, böylece etçi sığır yetiştiriciliğinde ırk ıslahı ve ırk tercihi rehber olacaktır.

Haziran 2020, 134 sayfa

Anahtar Kelimeler: Etçi sığır ırkı, polimorfizm, kalpastatin, genetik biyoişaretleyici, Yeni Nesil Dizileme teknolojisi

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINATION OF POLYMORPHISMS IN THE CALPASTATIN (CAST) GENE IN BEEF CATTLE BY NEXT GENERATION SEQUENCING TECHNOLOGY

Esin ÇALIK

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Kezban CANDOĞAN

In the current study, whole gene sequence analysis of the CAST gene for the samples of Brangus and Simmental beef cattle breeds that are widely slaughtered in Turkey, was carried out by using NGS (Next Generation Sequencing) technology which is capable of scanning multiple genes or regions and large DNA sequences simultaneously. In addition, the relationships between the polymorphisms detected in the CAST gene, and sensory characteristics (tenderness, juiciness, and flavor intensity) and instrumental hardness were evaluated. Thirteen variations were detected in a total of 104 animals, 52 from Brangus and 52 from Simmental cattle breeds. Among these 13 variations, 5 were found only in Brangus cattle breed, 3 only in the Simmental cattle breed while 5 of them were detected in both breeds. The variations, EXON 8c.439C>G/p.L147LV found in 2 Brangus cattle and INTRON18c.1335+6G>A in 14 Simmental cattle were not previously reported. Therefore, they could be brought to the literature as newly identified variants. In sensory evaluation, beef samples from Simmental cattle breed were significantly more tender, and received higher juiciness and flavor intensity scores in comparison to the beef samples from Brangus cattle breed ($p<0.05$). The average instrumental hardness value of samples from 52 Simmental cattle (116.41 N) was lower ($p<0.05$) than that of samples from 52 Brangus cattle breed (196.97 N), indicating that the beef samples of the Simmental cattle breed were more tender. EXON 26 c.1985G>C/p.S662T variation found in 11 animals of Simmental cattle breed, but not in Brangus cattle breed, exhibited tenderness increasing effect based on instrumental and sensory tenderness evaluations ($p<0.05$). The findings obtained in this study could contribute to justifying the polymorphisms in the CAST gene detected to date as well as introducing new polymorphisms to the literature. At the same time, by showing the influence of the stated polymorphisms on meat tenderness, these results could be a guide for eugenics and breed selection in beef cattle breeding.

June 2020, 134 pages

Key Words: Beef cattle breeds, polymorphism, calpastatin, genetic biomarkers, Next Generation Sequencing technology

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın yürütülmesi sırasında sahip olduğu bilgisini, tecrübesini, manevi desteğini esirgemeyen ve bilimsel anlamda her zaman örnek aldığım, bana gerek tezim gerekse akademik kariyerimde her zaman yol gösteren çok değerli danışmanım Prof. Dr. Kezban CANDOĞAN'a (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü) öncelikli olarak teşekkür ederim. Tez İzleme Komitemde yer alan Prof. Dr. Nuray KOLSARICI'ya (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü) ve Prof. Dr. Halil VURAL'a (Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü) değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca, çalışmamda ilgi ve yardımlarını gördüğüm Prof. Dr. Volkan BALTACI'ya, teşekkür ederim. Tezimde et örneklerinin duyusal değerlendirmeleri aşamasında katkı sağlayan Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü akademik, idari personel ve lisansüstü öğrencilerden oluşan 10 eğitimli paneliste samimi katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Hayatıma girdiklerinden beri yanımda olup benden desteğini ve sevgisini hiç esirgemeyen, giriştiğim her işte beni cesaretlendiren, her zaman arkamda olduklarını hissettiğim sevgili evlatlarım Irmak ÇALIK ve Çınar ÇALIK'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması hizmet aldığımız L.E.S. Mikrogen Genetik Tanı Merkezi tarafından desteklenmiştir.

Esin ÇALIK
Ankara, Haziran 2020

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ VE KURAMSAL TEMELLER.....	6
2.1 Taze Etin Kalite Özellikleri.....	10
2.2 Taze Et Tekstür Özelliklerine Etkili Faktörler	11
2.3 Taze Ette Gevrekliği Etkileyen Faktörler	14
2.3.1 Taze etin gevreklik özelliği üzerine etkili enzim sistemleri	16
2.4 DNA ve Yapıtaşları	18
2.4.1 DNA, gen ve gen ifadesinin düzenlenmesi	21
2.5 Varyasyonlar: Polimorfizm/Mutasyon İlişkisi	23
2.5.1 Tek Nükleotid polimorfizmleri (SNP)	23
2.5.2 Minisatelit/mikrosatelit DNA dizileri.....	24
2.6 DNA Analiz Teknolojileri.....	25
2.6.1 DNA izolasyonu	25
2.6.2 DNA ölçüm yöntemleri	26
2.7 PCR Teknolojileri	28
2.8 DNA Dizi Analiz Yöntemleri.....	29
2.8.1 Sanger dizileme yöntemi.....	30
2.8.2 Yeni nesil dizileme.....	31
2.8.2.1 NGS çıktılarının değerlendirilmesi ve biyoinformatik analiz prensipleri	33
2.9 CAST (Kalpastatin) Geni	35
2.9.1 Kalpastatin geninin moleküler yapısı.....	36
2.9.2 Kalpastatin gen ekspresyonu	36
2.10 Et Gevrekliği Üzerine Etki Eden Diğer Genler	37
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	38
3.1 Materyal.....	38
3.1.1 Et örneklerinin toplanması	38

3.1.2 Et örneklerinin sınıflandırılması ve analizler için hazırlanması	38
3.2 Yöntem	38
3.2.1 DNA testi için et örneklerin hazırlanması ve DNA izolasyonu	38
3.2.2 DNA ölçümü ve PCR uygulamaları	40
3.2.3 Spektrofotometre ile DNA konsantrasyon ve saflığının ölçümü.....	40
3.2.4 Yeni nesil dizi analizi (NGS) öncesi hazırlıklar	41
3.2.4.1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	42
3.2.4.2 ExoSAP bilgilerinin pürifikasyonu.....	48
3.2.4.3 İndeks primer amplifikasyonu.....	49
3.2.4.4 PCR clean-up.....	50
3.2.4.5 Kütüphane birleştirme ve örnek yükleme	51
3.3 Duyusal Analiz	52
3.4 Duyusal Analiz Öncesi Panelistlerin Eğitimi.....	53
3.5 Enstrümental Tekstür	54
3.6 İstatistiksel Analizler	54
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	55
4.1 DNA Konsantrasyon ve Saflık Düzeyleri.....	55
4.2 NGS Çıktılarının Klasifikasyonları.....	58
4.3 Varyasyonların Biyoinformatik Değerlendimesi	74
4.4 Brangus ve Simmental Sığır Irklarında NGS Analizi ile Belirlenen Varyasyonların Karşılaştırılması.....	77
4.5 Duyusal Analiz Sonuçları	83
4.6 Enstrümental Sertlik Değerleri.....	92
4.7 Enstrümental Sertlik Değerlerinin ve Duyusal Analiz Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	98
4.8 Enstrümental Sertlik ve Duyusal Özelliklerin Polimorfizm Durumuna Göre Karşılaştırılması	101
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	111
KAYNAKLAR	114
EKLER	122
EK 1 Brangus ırkına ait saptanan varyasyonların surveyor görüntüsü.....	123
EK 2 Simmental ırkına ait saptanan varyasyonların surveyor görüntüsü.....	128
EK 3 Duyusal değerlendirme formu	132
ÖZGEÇMİŞ.....	133

SİMGELER DİZİNİ

A	Adenin
C	Sitozin (İngilizce-cytosine)
G	Guanin
Kb	Kilobaz
N	A G C T (dördünden biri)
R	G veya A (pürin)
S	G veya C (kuvvetli bağlilar: İngilizce-strong bonds)
T	Timin
U	Uridin (RNA dizileri için kullanılır)
W	A veya T (zayıf bağlilar: İngilizce-weak bonds)
Y	T veya C (pirimidin: İngilizce- pyrimidine)

Kısaltmalar

BAM	(Binary Alignment Map Format)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ddNTP	dideoksiribonükleozid trifosfat
dNTP	deoksiribonükleozid trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FAO	(Food and Agriculture Organization of the United Nations) Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
HSP	(Heat Shock Proteins) Isı Şok Proteinleri
IBBA	(The International Brangus Breeders Association) Uluslararası Brangus Islahçılar Birliği
IUPAC	(International Union of Pure and Applied Chemistry) Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
MAF	(Minor Allel Frequency) Minör alel frekansı
MAS	(Marker Assisted Selection) Markır Destekli Seleksiyon
NCBI	(National Center for Biotechnology Information) Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NGS	(Next Generation Sequencing) Yeni Nesil Dizileme
OECD	(Organisation for Economic Co-operation and Development) Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
PCR	(Polymerase Chain Reaction) Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PSE	(PSE- Pale, Soft, Exudative) Soluk, Yumuşak ve Sulu Et Kusuru
RNA	Ribonükleik Asit
Rs numarası	(Reference SNP) Veri Bankaları Giriş Numarası
SNP	(Single Nucleotide Polymorphism) Tek Nükelotit Polimorfizmi
STR	(Short Tandem Repeats) Kısa Ardışık Tekrar Bölgeleri
TPA	(Texture Profile Analysis) Tekstür Profil Analizi
UTR	(Untranslated Region) Kodlanmayan Bölge
UV	Ultraviyole
VCF	(Variant Call Format)
VNTR	(Variable Number of Tandem Repeats) Değişken Sayılı Bitişik Tekrarlar
WBSF	(Warner–Bratzler Shear Force) Warner–Bratzler Kesme Kuvveti

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Brangus Sığırır Irkı (Sakarya-Türkiye)	8
Şekil 2.2 Simmental Sığırır Irkı (Sincan-Türkiye)	9
Şekil 2.3 Nükleotit yapısı ve nükleotit yapısına katılan bazlar	19
Şekil 2.4 Nükleik asitlerin moleköl yapısı	19
Şekil 2.5 DNA'nın "şeker ve fosfat belkemiği" ve bazlar arası "hidrojen bağları"	20
Şekil 2.6 DNA'nın çift zincir sarmal yapısı	20
Şekil 2.7 Protein sentezinde başlatma kompleksinin oluşmasının ardından zincir uzamasının ilk adımı olan ikinci amino asit eklenmesi (Fluitt vd. 2007))	22
Şekil 2.8 Sanger dizileme kromatogram çıktısı	31
Şekil 2.9 Köprü amplifikasyonu	32
Şekil 2.10 Flow cell üzerinde klonal grupların oluşturulması ve köprü formasyonu	32
Şekil 2.11 Kalpastatin polipeptit domainlerinin yapısı (Aali vd. 2014)	37
Şekil 3.1 NGS öncesi PCR ürünlerinin jel elektroforezle kontrolü	47
Şekil 3.2 Brangus sığırır ırkına ait CAST geni multipleks 1-33 örnek jel elektroforezi görüntüleme	48
Şekil 3.3 Simmental sığırır ırkına ait CAST geni multipleks 1-52 örnek jel elektroforezi görüntüsü	48
Şekil 4.1 Brangus ırkına ait 1 nolu hayvanda bulunan varyasyonun (B1-EKZON 20 c.1526T>C/p.V509A Heterozigot) surveyor görüntüsü	72
Şekil 4.2 Simmental ırkına ait 6 nolu hayvanda bulunan varyasyonun (S6- INTRON 18 c.1335+6G>A Homozigot) surveyor görüntüsü	73
Şekil 4.3 Simmental ve Brangus ırklarının duysal analiz parametrelerine göre skorlarının karşılaştırılması	91
Şekil 4.4 Brangus ve Simmental hayvan gruplarına ait ortalama enstrümental sertlik değeri (N)	97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 CAST primerleri (1-31 ekzonlu).....	43
Çizelge 4.1 Brangus ırkına ait doku DNA izolasyon konsantrasyonu ve saflık düzeyi	56
Çizelge 4.2 Simmental ırkına ait doku DNA izolasyon konsantrasyonu ve saflık düzeyi	57
Çizelge 4.3 Brangus sığır ırkına ait NGS (Yeni Nesil Dizileme) analiz sonuçları	59
Çizelge 4.4 Simmental sığır ırkına ait NGS (Yeni Nesil Dizileme) analiz sonuçları	64
Çizelge 4.5 Biyoinformatik değerlendirmelerle elde edilen varyasyonların sıklık değerleri ve veri giriş numaraları	76
Çizelge 4.6 Brangus ve Simmental ırklarına ait varyasyonların karşılaştırılması	78
Çizelge 4.7 Brangus sığır ırkına ait duyu sertlik, sululuk ve lezzet yoğunluğu puanları.....	84
Çizelge 4.8 Simmental sığır ırkına ait duyu sertlik, sululuk ve lezzet yoğunluğu puanları.....	86
Çizelge 4.9 Brangus ve Simmental hayvan gruplarına ait duyu özelliklerinin karşılaştırılması	90
Çizelge 4.10 Brangus sığır ırkına ait enstrümental sertlik değerleri.....	93
Çizelge 4.11 Simmental sığır ırkına ait enstrümental sertlik değerleri.....	95
Çizelge 4.12 Brangus ve Simmental hayvan gruplarına ait ortalama enstrümental sertlik değerleri (N).....	97
Çizelge 4.13 Brangus grupta duyu analiz sonuçları ile enstrümental sertlik değerlerinin Pearson korelasyon analizi sonuçları.....	99
Çizelge 4.14 Simmental grupta duyu analiz sonuçları ile enstrümental sertlik değerlerinin Pearson korelasyon analizi sonuçları.....	99
Çizelge 4.15 Brangus ırkında polimorfizm durumuna göre enstrümental sertlik (N) değeri, duyu sertlik, sululuk ve lezzet yoğunluğu puanlarının karşılaştırılması.....	102
Çizelge 4.16 Simmental ırkında polimorfizm durumuna göre enstrümental sertlik (N) değeri, duyu sertlik, sululuk ve lezzet yoğunluğu puanlarının karşılaştırılması.....	103

1. GİRİŞ

Et insanlığın evrimi boyunca, asırlardan beri yüksek biyolojik değere sahip protein, demir, B grubu vitaminler, çinko, selenyum ve fosfor açısından zengin bir gıda olması nedeniyle sağlıklı ve dengeli beslenmenin önemli bir parçası olmuştur. Günümüzde et tüketiminin kanser, kalp, damar ve metabolik hastalıklara karşı riskle ilişkilendirildiği epidemiyolojik verilere rağmen, kişilerin özellikle beyin ve entellektüel gelişimindeki rolü nedeniyle, hala tüm dünyada tüketimi belli oranlarda artış gösteren bir gıda maddesidir (Pereira ve Vicente 2013, Listrat vd. 2016).

Et tüketimi konusunda tüketici istek ve talepleri değişmekle birlikte, özellikle değerli kırmızı etler açısından değerlendirildiğinde pazar karakteristiklerini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Kırmızı etler içinde yüksek besin değerine sahip, aynı zamanda, ekonomik açıdan da büyük önem taşıyan sığır eti kalitesi et endüstrisinde oldukça önemli bir unsur olarak karşımıza çıkmaktadır (McNeill ve Van Elswyk 2012, Lee vd. 2014b). Günümüzde bilinçli tüketicinin tercih ettiği kaliteli ve güvenli kırmızı etin temel özelliklerinin başında görünüş, lezzet gibi duysal nitelikler gelmekle birlikte; renk, kas içi yağlanma, gevreklik veya sertlik, su tutma kapasitesi gibi fiziksel özellikler de ürün kalitesini etkileyen, sığır endüstrisinde bölgesel ve ülke koşullarına bağlı olan başlıca faktörler arasında yer almaktadır (Warner vd. 2010). Bu kalite özellikleri, başta hayvanın beslenme şekli ve koşulları, genetik faktörler, kesim öncesi ve kesim sonrası uygulamalar olmak üzere birçok faktörden etkilenmektedir (Listrat vd. 2016). Fakat, bu faktörlerin etkisini ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilen ölçümler, genellikle kesim sonrasında yapılabildiğinden oldukça zor ve ayrıca çoğunlukla yüksek maliyet gerektirmektedir (Lozano vd. 2016).

Özellikle günümüz otel ve restoranlarında servis ağı haline gelen zincir şirketler için tüketiciye güvenli ve kaliteli etin aynı standartlarda sunulabilmesi bakımından etin üretim aşamasından itibaren monitörizasyonu ve tüm beklenen özelliklerin etiketlenmesi hayati bir gerekliliktir. Tüketici memnuniyeti et endüstrisi için stratejik bir öneme sahiptir ve et endüstrisindeki son çalışmalar bilinçli tüketicilerin et kalitesine odaklandığını ortaya koymaktadır (Mateescu vd. 2017). Geliştirilen et üretim

teknolojileri sayesinde besin değeri ve duyuşsal karakteristikleri de içine alan özellikler, son ürün kalitesinin sürekliliğinin sağlanmasında iyileştirilebilir parametreler olarak değerlendirilmektedir (Pighin vd.2016).

Etin kalitesi çevresel faktörlerden olduğu kadar genetik kodlardan da etkilenmektedir. Kaliteyi belirleyen unsurlar içinde özellikle gevreklik veya sertlik, su tutma kapasitesi, renk, koku gibi nitelikler ise büyük ölçüde hayvanların genetik kodları tarafından belirlenmektedir (Warner vd. 2010). Kırmızı etin en önemli kalite kriterlerinden biri olan gevrekliğe etki eden genetik faktörlerin tespit edilerek, hayvan yetiştiriciliğinde planlama, iyileştirme ve hayvan seçiminde kriter olarak kullanılması girişimlerinin günümüzde yaygınlaştığı görülmektedir. Gevreklik, sululuk ve lezzet yoğunluğu et lezzetliliğinin temel belirteçlerinden olup, genel olarak tüketici memnuniyetinin bir yansımasıdır ve et kalitesinin değerlendirilmesinde öncelikle dikkate alınan duyuşsal özelliklerdendir. Yüksek et kalitesine sahip karkas özelliğı, başta gevreklik olmak üzere lezzet ölçütlerinin istenilen düzeyde olmasıyla değerlendirilir (Leevd. 2014b, Mateescu vd. 2017). Gevrekliğin kalıtsallığı kısmi olduğundan uygun hayvanların seçimi ve yetiştirilmesinde kullanılmak üzere genetik olan ve olmayan faktörlerin tespit edilerek birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir (Lozano vd. 2016).

Şüphesiz ki ideal genetik yapıya sahip bir hayvan eğer uygun koşullarda beslenmez ve yetiştirilmez ise bu hayvandan sadece genetik yapısına bağılı olarak kaliteli ve gevrek bir ürün elde edilmesi beklenemez. Bu nedenle, et kalitesinin arttırılmasında yadsınamaz ölçüde etkiye sahip genetik faktörlerle birlikte, diğeri etmenlerin de göz önünde bulundurulması ve birlikte değerlendirilmesi et verimini olumlu etkileyecek ve et kalitesini yükseltecektir (Lozano vd. 2016).

Genomik indikatörlerin keşfinin, geliştirilmesinin ve geçerliliğinin et tedarik zincirinde önemli etkileri bulunmaktadır. Günümüzde et endüstrisinde, hedeflenmiş olan et üretimini gerçekleştirmek için DNA (Deoksiribonükleik Asit) markır (DNA belirteci) bilgisi ve genetik seleksiyon yöntemleri kullanılarak uygun ve verimli hayvan yetiştiriciliğı yapılabilmektedir. Bu amaçla, nicel özellikleri etkileyen genlere ait biyoinformatik verilerin değerlendirilmesiyle etin nicel özellikleri ve bunları sağlayan

biyolojik mekanizmalar aydınlatılabilmektedir. Genomik veriler hayvan seleksiyonunda verimin artırmayı sağlayan önemli parametrelerdir (Dang vd. 2014).

Ayrıca, sığır eti üretiminde önemli bir faktör olan et kalitesi bakımından etin sağlıklı olma kriterleri (doymuş yağ asitleri ve kolesterol içeriği) ve beslenme değeri (elzem amino asitler, mineral ve vitamin içeriği) bilinçli tüketicilerin de önem verdiği niteliklerdir. Tüm bu değerlendirmelerin yanında, genellikle bilinçli tüketici etin kalitesini ön planda tutacağı için özellikle az yağlı ve gevrek eti tercih edeceğinden tüketileceği ete daha fazla ödeme yapmaya istekli olacaktır (Pighin vd. 2016).

Yeme kalitesini tanımlayan tüm unsurlar çok sayıda gen tarafından kontrol edilen ve ayrıca çevresel faktörlerin de sonuca etki ettiği, ölçülebilir niteliklerdir. Kuşkusuz bu çok sayıdaki unsuru ölçmek oldukça zor ve maliyetlidir. Ayrıca, hayvanın kesim öncesi veya kesime alındığı dönemlerine ait özelliklerin ölçülmesi de çoğu zaman mümkün olamamaktadır. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda, geleneksel fenotipik özelliklerin yanısıra, genişletilmiş genomik varyasyon ve markır bilgisinin bir seçim kriteri olarak kullanılmasının hayvan seçiminde ve ideal adayların belirlenmesinde ne kadar önemli parametreler olduğu ortaya konmaktadır (Dunner vd. 2013, Mateescu vd. 2017). Seleksiyona dayalı ıslah sayesinde belirli özelliklere sahip hayvanların çiftleştirilmesi sonucu, istenilen özelliklerde yavrunun oluşması da sağlanabilmektedir (Anonymous. 2018a).

Kesimden sonra etin olgunlaştırılmasında meydana gelen miyofibrillar proteinlerin degradasyonu son ürünün yapısal özellikleri üzerine önemli ölçüde etki sağlamaktadır. Miyofibrillar protein degradasyonu çeşitli endojen proteolitik enzimler tarafından gerçekleşmektedir. Kalpainler, miyofibrillar protein degradasyonundan sorumlu başlıca proteolitik enzimlerdendir. Kalpain, kalsiyum varlığında aktive olan, lizozomal olmayan sistein proteolitik enzim ailesine bağlı bir proteindir. Kalpain ailesinin endojen proteolitik enzimleri, sitoskeletal yapının yeniden şekillendirilmesi, hücresel sinyal iletimi, apoptoz ve hücrenin yaşamsal faaliyetlerini sürdürmesi gibi fizyolojik süreçlerde yer almaktadır (Leal-Gutiérrez vd. 2018). Yapılan çalışmalarda, kalpastatin geninin farklı dokularda kalpain aktivitesini önemli ölçüde inhibe ettiği ve dolayısıyla et

gevrekliğinde azalmaya neden olduğu da saptanmıştır (Li vd. 2013, Leal-Gutiérrez vd. 2018). Et kalitesiyle ilişkili farklı genler literatürde belirtilmiş olmakla birlikte, bunlar içinde öne çıkanlar CAPN1 (kalpain) ve CAST (kalpastatin) genleridir (Li vd. 2013). Sığırlarda CAST geninin et kalite özellikleri ile yakından ilişkili olduğu ve et kalitesinin iyileştirilmesine yönelik hayvan ıslahı çalışmalarında aday gen olarak göz önünde bulundurulduğu bildirilmiştir (Schenkel vd. 2006, Li vd. 2013). Et kalitesi üzerine etki eden genetik markırlardan yaygın olarak kullanılanlar arasında CAPN1 ve CAST (kalpastatin) genlerinde bulunan SNP'ler (Single Nucleotide Polymorphism- Tek Nükleotit Polimorfizmi) yer almaktadır (Lozano vd. 2016). Et kalite özelliklerinin, hayvan genetiğinin de içinde olduğu birçok faktörün etkileşiminden yola çıkarak Sun vd. (2018), bir veya daha fazla sayıda popülasyonda ölçülen SNP markırlarının etçi sığır üretiminde ve modern genetik proste hayvan yetiştiriciliği açısından önemli bir rol aldığını bildirmişlerdir.

Genlerin karakterizasyonunun etkilediği önemli ekonomik özellikler ve sığır genom dizilimi, araştırmacıları fenotiple ilişkili olan polimorfizmleri belirlemeye de yöneltmiştir. MAS (Marker-Assisted Selection- Markır Destekli Seleksiyon), sığır eti kalite özelliklerini geliştirmede geniş çaplı olarak kullanılmıştır (Sun vd. 2018). Gelişmekte olan ülkelerde etçi sığır yetiştiriciliğinde üretim maliyetlerinin genellikle tam olarak bilinmemesi, yetiştiricilerin olası harcamalarının, gelirin ve kâr oranının belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Ekonomik açıdan önem taşıyan özelliklerin genetik olarak iyileştirilmesinde, çiftçiler ve endüstriyel sektörün seçim kararlarını kolaylaştırmak için kârlılık üzerine en etkili özelliklerin bilinmesi gerekmektedir. Bu bakımdan, tropikal ve subtropikal alanlardaki etçi sığır üreticileri, deneysel göstergelerinin kullanıldığı hayvan yetiştiriciliğinde, kârlılık oranı üzerine etkili özelliklere odaklanıp, ekonomik değerin tahmini ve bu değerlerin seçim kararlarının alınmasında uygulanmasıyla kârlılığın artışının sağlanabileceği bildirilmektedir (Simões vd. 2020).

Bu çalışmada, Brangus ve Simmental sığır ırklarına ait et örneklerinde CAST genindeki polimorfizmlerin belirlenmesi ve et tekstürünün değerlendirilmesinde bir markır olarak kullanılabilmesi olanağının araştırılması, böylece etçi sığır yetiştiriciliğinde ırk ıslahı ve

ırk tercihin'e katkı sağlanması amaçlanmıştır. Bu bağlamda, NGS (Next Generation Sequencing-Yeni Nesil Dizileme) teknolojis'i ile CAST geninin tüm gen analizi yapılmıştır. Dokümante edilen polimorfizm dağılımları eş zamanlı olarak enstrümental (sertlik) ve duyusal özelliklerle (sertlik, sululuk ve lezzet yoğunluğu) karşılaştırılarak aralarındaki korelasyon ortaya konulmuştur.



2. KAYNAK ÖZETLERİ VE KURAMSAL TEMELLER

Eski zamanlardan beri et insanların en önemli besin kaynakları arasında yer almıştır. ABD, Kuzey Avrupa ve Okyanusya ülkelerinde et tüketiminin daha yüksek olduğu, ekonomik yönden az gelişmiş ülkelerde ise besin kaynağı olarak etin yerini tahıla dayalı beslenmenin aldığı dikkat çekmektedir. Diğer yandan, et yemenin dini inançlar tarafından sınırlandırıldığı ülkelerde de et tüketiminin az olduğu görülmektedir (Gökalp vd. 1999, Milford vd. 2019).

Dünyada 2018 yılında 335 milyon ton olarak tahmin edilen toplam et üretiminde en büyük payı %36'lık bir oranla kanatlı eti alırken, domuz eti %36, büyükbaş (sığır ve manda) eti %22 ve küçük baş eti %4 oranında bir paya sahip olmuştur. Toplam kırmızı et üretiminde en büyük payı %58'lik oranla domuz eti alırken, büyükbaş eti %35, küçük baş eti ise %7'lik bir orana sahiptir. 2018 yılında dünyada büyükbaş et üretimi 72.2 milyon ton olarak bildirilmiştir (Anonim 2018).

Kanatlı et üretimi 130.5 milyon tonla toplam et üretiminin %39'unu, domuz eti üretimi 110.5 milyon tonla %33'ünü, büyükbaş et üretimi 72.2 milyon tonla %21'ini ve küçükbaş et üretimi 15.4 milyon tonla %5'ini oluşturmaktadır. Toplam kırmızı et üretiminin %56'sını domuz eti, %36'sını büyükbaş eti, %8'ini ise küçükbaş eti oluşturmaktadır (Anonim 2019).

Dünya et üretiminin %53'ü Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Brezilya, Avrupa Birliği ve Çin tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu oranda ABD %17'lik payla en yüksek üretimi gerçekleştirmiş olup, onu %14 ile Brezilya, %11 ile AB ve %11 ile Çin izlemiştir. Büyükbaş et üretimine %47 oranında katkı sağlayan dünyanın diğer ülkelerinin 2018 yılı toplam et üretimi 34.301 bin ton olarak tespit edilmiştir. Bu ülkeler arasında yer alan Türkiye'de 2018 yılında bir önceki yıla göre büyükbaş hayvan varlığı % 6.9 oranında artış göstermiştir. 2018 yılı toplam et üretiminde kırmızı etin payı %33.44'tür (Anonim 2018).

OECD/FAO verilerine göre, dünyada 2018’de kişi başı yıllık toplam et tüketimi 34.7 kg, Türkiye’de ise yıllık kişi başı 32.5 kg olarak tahmin edilmiştir (Anonymous 2019a). 2019 yılında Türkiye’de kişi başı toplam et tüketimi bir önceki yıla göre % 1.44 oranında artış göstermiş ve 36.30 kg’a ulaşmıştır. Bu miktarın 14.51 kg’ını kırmızı et oluşturmaktadır. Bu artış, büyükbaş et tüketiminde % 0.49, küçükbaş et tüketiminde ise % 8.88 ve kanatlı eti tüketiminde % 1.54’tür. (Anonim 2019).

Günümüzde, sağlık ve çevre bilincinin artmasıyla birlikte, özellikle gelişmiş ülkelerde vegan ve vejetaryen beslenme şekillerinde, buna paralel olarak da et tüketimini sınırlandıran tüketici sayısında bir artış gözlenmiştir. Gelişmekte olan ülkelerde ise et tüketiminde artış olacağı tahmin edilmektedir (Anonymous 2019a).

Toplam et tüketimi bakımından ele alındığında 2019 TÜİK verileri, kişi başı et tüketimi payları %36 oranıyla 12.99 kg büyükbaş, %4 oranıyla 1.51 kg küçükbaş ve %60 oranıyla 21.79 kg kanatlı et olarak açıklanmıştır. Toplam et tüketiminin 2018 yılına göre % 1.44 oranında arttığı, bu payı oluşturan büyükbaş eti tüketiminin %0.49, küçükbaş eti tüketiminin %8.88, kanatlı eti tüketiminin ise %1.54 oranında artış gösterdiği bildirilmiştir (Anonim 2019).

Dünyada ve Türkiye’de önemli bir tüketim payına sahip olan etler, beslenme açısından değerlendirildiğinde, biyolojik değeri yüksek protein içeriği, B grubu vitaminler, mineral madde, özellikle demir, fosfor ve çinko içeriği bakımından zengin bir kaynak olmasının yanında, doyuruculuğu ve yüksek tat seviyesinde yeme hazzı oluşturmaları nedeniyle beslenmede önemli bir yer tutmaktadır (Williams 2007). Beslenme açısından üstün özelliklere sahip olan et ve et ürünlerinin kalitesini oluşturan etmenler ve kalite üzerine etkilerinin şekillenmesinde etkili faktörler gerek üreticiler ve gerekse tüketiciler açısından farklı açılardan değerlendirilmektedir.

Sığır eti kalitesi hayvanın kas yapısına ve genotipine bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. *Bos indicus* ırklarından elde edilen etlerin, *Bos taurus* ırkından elde edilen etlere göre daha az gevrek olduğu belirtilmiştir. Bunun nedeni, kas yapısı bakımından farklı bir öneme sahip olan *Bos indicus* ırkı hayvanların etlerinde daha

yüksek düzeydeki kalpastatin aktivitesi nedeniyle kas dokudaki miyofibrillar proteinlerde proteolizin düşük oranda gerçekleşmesidir (Hocquette vd. 2006).

Et kalitesi kapsamında özellikle bu tez çalışmasında spesifik olarak yer alan Brangus (*Bos indicus*) ve Simmental (*Bos taurus*) sığır ırkları ülkemizde son yıllarda kesimi yaygın olarak gerçekleştirilen sığır ırklarıdır. Brangus sığır ırkı Angus ve Brahman sığırlarının üstün özelliklerinin değerlendirilmesiyle geliştirilen 3/8 oranında Brahman ve 5/8 oranında Angus sığır ırklarının genetik olarak melezlenmesiyle üretilen bir ırktır (Anonymous 2003). Şekil 2.1’de bu çalışmada kullanılan Brangus sığır ırkına ait bir hayvanın fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 2.1 Brangus Sığırırkı (Sakarya-Türkiye)

Brahman (*Bos indicus*), doğal seleksiyon süresi boyunca hastalığa dirençli, güçlü ve dışa dönük, annelik iç güdüsüne sahip bir gelişme gösteren, üreme ve süt verimliliği ve dişilik fonksiyonları son derece iyi bir ırktır. Angus (*Bos taurus*) sığırı ile Brahman (*Bos indicus*) sığırı çaprazlanarak etin kalitesi ve dolayısıyla gevrekliğini arttırmak amacıyla seçilmiştir (Leal-Gutiérrez vd. 2018). Angus, daha üstün karkas kalitesiyle bilinmektedir. Brangus ırkının geliştirilmesiyle 1949 yılında Amerikan Brangus Üreticileri Birliği kurulmuştur. Bununla birlikte, o yıl kaydedilen Angus ve Brahman sığır ırklarının soyundan gelen Brangus da kayıt altına alınmıştır. ABD ve Kanada’da

özel deneysel üretim programları yürütülmektedir. Araştırmacılar Angus'un bilinen üstün kalite özellikleri ile olumsuz koşullar altında bile doğal olarak gücünü sürdürebilen Brahman'ın kombinasyonu ile istenilen düzeyde et elde edilen etçi sığır ırkı yetiştiriciliği çalışmalarına önem vermişlerdir. 1949'da kurulan Amerikan Brangus Üreticileri Birliği'nin adı 1973'den beri Uluslararası Brangus Üreticileri Birliği olarak değiştirilmiştir. Afrika'daki Güney Rhodézya, Arjantin, Avustralya, Meksika, Kanada ve ABD'nin neredeyse her eyaletinde birliğin üyeleri mevcuttur. Kayıt altına alınan Brangus'un 3/8'i Brahman ve 5/8'i ise Angus olup siyah ve boynuzsuzdur. Her iki erkek ve dişi ırk Uluslararası Brangus Islahçılar Birliği (The International Brangus Breeders Association-IBBA) ile kayıt altına alınmaktadır. 3/8-5/8 oranlarıyla çaprazlanma gerekliliği IBBA tarafından sertifikalandırılmıştır. Birleşmiş Milletler, yüksek sıcaklık ve nem koşullarına dayanıklı olan *Bos indicus* sığırının bilinen avantajının genel ticari sığır ırkını geliştirmek üzere Brahman üretiminin de gerekli ölçüde gerçekleştirildiğini duyurmuştur (Anonymous 2003). Sonuç olarak Brangus, kurucu üreticileri tarafından her iki Angus ve Brahman'ın daha üst karakterlerinin kombine edilmesiyle geliştirilmiş bir ırktır.

Simmental sığır ırkı dünyadaki tüm sığır ırkları içinde en geniş dağılım gösteren en eski ırktır. Şekil 2.2'de bu çalışmada kullanılan Simmental sığır ırkına ait bir hayvanın fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 2.2-Simmental Sığır Irkı (Sincan-Türkiye)

İsveç parlamentosu 1785 yılında sığır kıtlığı nedeniyle kendi ihtiyaçlarını karşılamak için hayvan ihracatını sınırlandırmıştır. İsveç “Kırmızı ve Beyaz Noktalı Simmental Irkı Birliği” 1890 yılında kurulmuştur. Menşei İsviçre olan Simmental ırkının yetiştiriciliği altı kıtaya da yayılmıştır. Avrupa’nın bölgesel olarak yarısından fazlasında, dünya çapında yaygın olan Simmental sığırının tahmini sayısı 40 ila 60 milyon kadardır. Avrupa’da kaslılık ve süt üretimi için tercih edilen bir ırktır. Simmental; Almanya’da "Fleckvieh"; Fransa’da "Pie Rouge", "Montbeliarde" ve "Abondance" ve İtalya’da "Pezzata Rosa" isimleri ile bilinir. Simmental, adını orijinal menşei olan İsviçre’nin Simme vadisinden almıştır. Almanya’da Thal veya Tal’in anlamı vadi demek olduğu için de gerçek anlamı "Simme Valley"dir (Anonymous 2019b).

2.1 Taze Etin Kalite Özellikleri

Et ve et ürünlerinin kalitesi; ürün tipi ve tüketici profiline bağlı olarak değişen gevreklik, sululuk, lezzet, su tutma kapasitesi, renk, besin değeri ve ürün güvenliğini de içeren birçok faktör tarafından belirlenmektedir (Leal-Gutiérrez ve Mateescu 2019). Bu faktörler; etin temin edildiği hayvanın genetik özelliklerine, beslenmesine, yetiştirilme koşullarına, kesim öncesi, kesim esnasındaki ve kasın ete dönüşümü sırasındaki süreçlere bağlı olarak değişim gösterebilmektedir (Pighin vd. 2016).

Taze etin en önemli kalite kriterlerinden biri olan renk, tüketici tarafından et kalitesi bazında önem taşıyan görünüş, tat ve tekstür gibi duyuşal özellikler arasında en önemli özellik olarak değerlendirilmektedir. Çünkü tüketiciye göre renk istenilen uygunlukta değilse diğer kriterler önemini yitirmektedir. Miyoglobinin, etin rengini etkileyen birincil pigment olması nedeniyle renkteki değişim, miyoglobinin oksidasyonundan kaynaklanmaktadır. Taze ette miyoglobin farklı formlarda bulunmaktadır. En önemlileri deoksimiyoglobin, oksimiyoglobin ve metmiyoglobindir. Oksimiyoglobin taze ete parlak cazip kırmızı rengini verirken, miyoglobinin yükseltgenmiş formu olan metmiyoglobin et renginin kahverengine dönüşmesine neden olmaktadır (Danijela vd. 2013).

Bir et ürünü mikrobiyolojik stabilite ve tüketici açısından önemli diğer özellikler bakımından iyi kalitede olsa bile lezzet özelliklerinin tüketici damak zevkini tatmin etmesi gerekmektedir (Liang vd. 2016). Duyusal özellikler içinde en önemlilerinden olan lezzet; tat, koku ve kimyasal algı özelliklerinin toplamı olarak ifade edilmektedir. Ağızda çözünen gıdaların tatma yoluyla algılanması olarak tanımlanan tat duyusu; gıdaların acılık, ekşilik, tatlılık, tuzluluk, metalik ve umami gibi özelliklerini içermektedir. Koku, ağıza alınan bir gıdadan çıkan uçucu bileşenlerin koklayarak algılanması, kimyasal algı ise ağız ve geniz boşluğundaki sinirlerin uyarılması sonucu algılanan yakıcılık, burukluk gibi kavramları içinde barındıran bir olgudur (Meilgaard vd. 2006). Hidrokarbonlar, aldehitler, ketonlar, esterler, alkoller, benzol bileşikler, furanlar, laktonlar, pirazinler gibi çok sayıda uçucu bileşiklerle, hidrofilik ve hidrofobik peptitler, inosinik asitler, hipoksantin, bazı amino asitler, laktik asit, aspartik asit gibi uçucu özellik göstermeyen bir kısım bileşikler etin lezzeti üzerine etkili olmaktadır (Serdaroğlu ve Değirmencioğlu 2002). Ete uygulanan ısı işlemlerle gerçekleşen kimyasal reaksiyonlara bağlı olarak ortaya çıkan çok sayıda uçucu bileşik etin kendine has lezzetini oluşturmaktadır (Fiems vd. 2000). Etlerin kalitesini etkileyen diğer önemli özellik ise gevreklik özelliğini önemli ölçüde etkileyen sululuktur. Sululuk düzeyinin yüksek olduğu etlerin daha gevrek olduğu vurgulanmaktadır (Liang vd. 2016).

2.2 Taze Et Tekstür Özelliklerine Etkili Faktörler

Taze etlerde ürün tekstürünün tanımlanmasında çiğnenebilirlik, adhesiflik, kohesiflik, zamlılık vb. özellikler önemli olsa da tekstür özellikleri öncelikle sertlik ve gevreklik karakteristikleri dikkate alınarak ölçülmekte ve ifade edilmektedir. Birincil mekanik tekstürel karakteristiklerden olan sertlik algısı, katı ve yarı katı gıda maddelerinin dişler arasında ve damakla dil arasındaki basınca direnç göstermesi için gerekli olan güçtür. Sertlik dokunma ile belirlenebilen bir kalite kriteridir ve sıklık özelliği ile ilişkilidir. Sertlik ile sululuk ilişkisi ters orantılı olarak değerlendirilir (Ertaş ve Doğruer 2010).

Etin kabul edilebilirliğini etkileyen kalite özellikleri içinde en önemlilerinden olan et gevrekliği; kaliteli son ürüne ulaşmada esas rol oynayan etkenlerden olan bağ doku miktarı ve çözünürlüğü, rigor gelişimi, sarkomer boyu ve kesim sonrası olgunlaştırmaya

bağlı olarak farklılık göstermesinin yanısıra miyofibrillar degradasyonuna ve intramüsküler yağ içeriğine de bağlıdır (Houbak vd. 2008, Warner vd. 2010).

Kaliteli et, çiğnendiğinde kolayca parçalanır ve dağılır. Dana, kuzu gibi genç kasaplık hayvanlardan elde edilen etler daha gevrek özellik göstermektedir. Kasaplık hayvanların yaşla doğru orantılı olarak bağ doku miktarındaki artış nedeniyle etin gevrekliği de azalmaktadır. Hareketli kaslarda fazla bağ dokunun bulunması etin daha sert olmasına, hareketsiz kaslarda ise daha az yoğunlukta bağ dokunun bulunması etin daha gevrek bir yapı kazanmasına neden olmaktadır. Kesim sonrası kasın ete dönüşüm (rigor-mortis) sürecinde et sert bir yapı kazanmaktadır. Rigor-mortis tamamlandıktan sonraki süreçte 0-4°C'de 3-4 gün bekletilmesi ile etin gevrekliğinde artış olmaktadır. Dokunulduğunda kadifemsi bir yapıda olan et kaliteli olarak değerlendirilmektedir. İnsan gıdası olarak etin çok sert, kaba bir yapıda olması tercih edilmediği gibi aşırı sulu çok esnek, aşırı yumuşak bir kıvamda olması da istenen bir durum değildir (Faucitano vd. 2008, Liang vd. 2016).

Etin gevrekliğini iyileştirmek suretiyle artan et kalitesini sürekli kılmak, böylece daha çok sayıda tüketiciye ulaşarak, daha çok miktarda et tüketimini sağlamak mümkün olacaktır. Bu nedenle, et gevrekliğinde kaydedilecek ilerlemeler et endüstrisi için oldukça fazla önem taşımaktadır (Weaber ve Lusk, 2010) Çiftlikte geçirilen süreç (üreme, beslenme ve nakliye), fizyolojik özellikler (genetik geçmiş, stres faktörü, kas tipi ve lokasyonu) ve proses koşulları (kesim sonrası sıcaklık uygulaması ve depolama) gibi et tekstürüne etki eden çeşitli faktörler sayısız çalışmada incelenmiştir. Gevrek et üretmek için gerekli bilgi ve işlemleri tanımlayan birçok yayın ve patent çalışması da bulunmaktadır (Bekhit vd. 2014).

Kasaplık hayvanların genetik yapısı, besi koşulları, türü, ırkı, yaşı gibi etkenler o hayvandan elde edilecek karkasın kalitesini ve buna bağlı olarak et kalitesini büyük ölçüde etkilemektedir. Hayvanların kesiminde kullanılan yöntemler ve kesim ortamının hijyen ve sanitasyon koşullarına uygunluğu da et kalitesinin korunmasında önemli katkılar sağlamaktadır. Kesimlik hayvanların kesimin yapılacağı tesislere taşınması sürecinde olumsuz koşullar ve bunun yanı sıra kesimden önce stresten uzaklaştırıp

yeterince dinlendirilmemesi de et kalitesinin düşmesine neden olmaktadır. Bu nedenle kesimden önce hayvanların 6-12 saat dinlendirilmesi etin kalitesinin korunmasında önemli rol oynamaktadır. Bayıltılarak yapılan kesime göre bayıltmadan yapılan kesimde karkastan uzaklaşan kan miktarı daha fazla olmaktadır. Kesim sonrası karkasta kalan kan miktarı arttıkça etin kalitesi düşmekte ve olası mikroorganizma yükü nedeniyle de bu etlerin raf ömrü kısalmaktadır. Kesimden hemen sonra etlerin dinlendirme odalarına (0-4°C'de) alınması et kalitesinin korunmasında önemli bir faktördür (Faucitano vd. 2008).

Bir karkasın herhangi bir kasındaki rigor mortis öncesi kas metabolizması; (i) hayvanın kesim öncesi kas glikojen seviyesini etkileyen beslenme şekli, (ii) kesimde kas metabolizmasını etkileyen kesim öncesi stres faktörü, (iii) kasın lif tipi, (iv) karkasa kesim sonrası uygulanan elektriksel uyarımlar, (v) genetik faktörler gibi unsurlara bağlı olarak önemli ölçüde değişkenlik gösterebilmektedir. Hayvanların kesim öncesi akut stres düzeyinin ve fiziksel tepki mekanizmaları sığır ve kuzu etinin sertliğini önemli ölçüde etkilemektedir (Warner vd. 2010). Olumsuz tepkileri yansıtan stres, davranışsal ve psikolojik değişikliklerle ilişkilendirilmiştir. Hayvan kendisini gerçek ya da hayali tehdit altında hissettiğinde strese girmekte ve bu psikolojik değişiklikler hayvanın potansiyel düzeyde tepki göstermesine yol açmaktadır. Daha gevrek et, kesim öncesi dönemde kastaki yüksek glikojen seviyesiyle ilişkilendirilmiştir (Reiche vd. 2019).

Et gevrekliğini artırıcı yöntemler su tutma kapasitesi, renk ve lezzet gibi diğer kalite özellikleri üzerinde önemli etkiler yaratabilecek hücrel ve yapısal değişiklikleri içermektedir. Kaslar kompleks bir dizi fizyolojik, biyofiziksel ve biyokimyasal değişimleri içeren kesim sonrası ölüm sertliği aşamasından geçerek ete dönüşmektedir. Et tekstürünü belirleyen temel iki faktör vardır. Birincisi, çizgili kası oluşturan kas lifleri ile ilişkilidir. Kesimden sonra kasılan kasta sarkomer boyunda meydana gelen değişimler et tekstürünü belirlemektedir (Kemp vd. 2010). İkinci faktör ise genellikle sertliği ifade eden etteki bağ doku ile ilişkilidir. Bağ dokunun et sertliğine etkisi, etteki elastin ve kollajenin yapı ve/veya miktarına bağlıdır; pişirme şekli ve sıcaklığıyla kısmen geliştirebilir (Lepetit 2008).

Pre-rigor fazda kollajen içeriği sertliğe katkıda bulunur. Daha sonra kasın kısalması nedeniyle sertlikte artış meydana gelir. Gevreklik veya dinlenme sürecinde rigorun çözülmesi aşamasında ise kaslar bir seri değişime uğrar ve gevreklikte dikkate değer bir artış gözlenir. Gevrekliği artırmak için en etkili uygulama, kas liflerinin degradasyonundan sorumlu olan kalpainler, katepsinler gibi endojen proteolitik enzimlerin uygun bir şekilde aktivasyonunun sağlanmasıdır (Bhat vd. 2018).

Taze etin gevrekleştirilmesi amacıyla uygulanan kesim sonrası yöntemler, fiziksel, kimyasal ve enzimatik olmak üzere üç temel kategoride sınıflandırılır. Fiziksel yöntemler, kuvvet uygulayarak ya da fiziksel uyarımlarla ette yapısal değişikliklere neden olmaktadır. Bu fiziksel müdahaleler; karkasları olgunlaştırma koşulları, dondurma-çözme döngüleri, ultrases ve yüksek hidrostatik basınç uygulamaları, mekanik yöntemlerle kasılmanın önlenmesi gibi uygulamalardır (Bekhit vd. 2014).

Tüketicilerin yeme alışkanlıklarındaki değişimler, endüstrideki büyümenin devamını sağlamaya katkısı bakımından gevrek et elde etmek için sığır eti yetiştiren çiftliklere olan ihtiyacın önemini vurgulamaktadır.

2.3 Taze Ette Gevrekliği Etkileyen Faktörler

Gevreklik taze etlerin en önemli kalite özelliklerinden birisidir (Casas vd. 2006). Özellikle, sığır etinde farklı nedenlerden ötürü değişkenlik gösterebildiğinden tüm dünyada et sektörü için özel öneme sahip bir konu olarak görölmektedir. Kesimden sonra kasın ete dönüşümü sürecinde birçok biyofizikokimyasal değişimler meydana gelir ve bu değişimler son ürünün kalite özelliklerini büyük ölçüde etkiler. Kesimden sonra ortaya çıkan bu olaylar üç fazda incelenebilir; (1) sertliğin kollajenden kaynaklandığı pre-rigor faz, (2) sertliğin kaslardaki kasılmadan kaynaklandığı rigor fazı ve (3) rigorun çözöldüğü, kasın bir seri değişime uğrayarak gevrekliğin belirgin bir şekilde iyileştiği olgunlaştırma fazıdır. Yani, kollajen içeriği ve çözünürlüğü, kas kasılma düzeyi ve olgunlaştırma etlerin son gevreklik karakteristiğini belirleyen üç önemli faktördür (Hopkins ve Geesink 2009, Bhat vd. 2018).

Daha iyi kalitede et için kesim sonrası uygulanan olgunlaştırmanın gevrekliğe etkisi, temel olarak kas liflerinin degradasyonundan sorumlu olan endojen proteolitik enzimlerin aktivasyonunu içeren doğal bir enzimatik süreçtir. Aynı zamanda, sıcaklık, pH ve oksidasyon gibi çeşitli faktörler de olgunlaştırma süresince kalpainlerin aktivitesinde, dolayısıyla etin gevreklik özelliği kazanmasında etkilidir. Rigor esnasında normalin üstündeki sıcaklıklar glikolizin artmasına, dolayısıyla pH'da hızlı düşüşe neden olmakta, protein denatürasyonu için gerekli koşullar sağlanmaktadır. Bu koşullar soluk, yumuşak ve sulu (PSE- Pale, Soft, Exudative) et kusuruna neden olabilir. Bu yüzden uygun olgunlaştırma sıcaklığının sağlanması ve olgunlaştırma sıcaklığının 0–4°C civarında olması gerekir (Bhat vd. 2018). Kas hücresinin proteolitik enzimlerinin stabilitesi ve aktivitesi pH'dan önemli ölçüde etkilenmektedir. Kesim sonrası süreç içindeki 3 saatlik dilimde etteki pH'nın düşük veya yüksek olması durumunda, orta dereceli pH'lı etten daha az gevrek bir ürün elde edildiği belirtilmiştir (Simmons vd. 2008). Gevrekleştirme işleminde diğer bir etkili faktör kas lifi tipidir. Yüksek oksidatif liflere sahip kaslar, hızlı dondurma esnasında sarkoplazmik retikulumun kalsiyum bağlama özelliğinin hızla kaybindan ötürü soğuk kasılmasına daha hassastırlar. Olgunlaşma, hızlı kasılan kaslarda yavaş kasılan oksidatif kaslara göre daha çabuk gerçekleşir. Bu durum, kalpainin inhibitörü olan kalpastatine oranının daha yüksek olmasıyla açıklanabilir (Totland vd 1988, Ouali ve Talmant 1990). Yağlı ve yumuşak yağlı kaslar, daha az bağ doku içerdikleri için daha gevrekler (Bhat vd. 2018).

Bununla birlikte, gevrekliğin iyileştirilmesinde asıl önemli olan, kalpainler, katepsinler ve kaspazlar gibi kas liflerinin degradasyonundan sorumlu olan endojen proteolitik enzimlerin uygun bir şekilde aktivasyonunun sağlanmasıdır (Bekhit vd. 2014). Kesim sonrasında proteolizde anahtar rol oynayan kas proteinlerinden en önemlileri desmin, titin, nebulin, troponin-T'dir. Olgunlaştırmanın ilk birkaç gününde sarkomer yapısında ve Z disklerinde degradasyon ortaya çıkar. Miyofibrillar proteinlerin kesim sonrası proteolizi sonucu gözlenen tüm bu yapısal değişimler etin olgunlaştırma esnasında gevrek yapı kazanmasında etkilidir (Wheeler ve Koohmaraie 1994, Taylor vd. 1995, Bhat vd. 2018).

2.3.1 Taze etin gevreklik özelliği üzerine etkili enzim sistemleri

Kesim sonrası proteoliz, hücre içi çeşitli proteolitik sistemleri içeren çoklu enzimatik etkilerle meydana gelir. Bunlar içinde olgunlaştırma sürecinde et gevrekliğini geliştirmede temel rol oynayan kalpainler, en yoğun araştırılmış ve en çok üzerinde durulan proteaz sistemidir. Mitokondride de bulunan, apoptotik ve nekrotik hücre ölümünü de içine alan patofizyolojik çeşitli olaylarda önemli rol oynayan kalpainler, iskelet kasındaki fizyolojik pH'da optimal aktif olan hücre içi kalsiyuma bağlı sistein proteazlarının geniş bir ailesidir (Bhat vd. 2018, Kim vd. 2018).

Kalpainlerin endojen inhibitörü olan kalpastatinin aktivitesinin yüksek olması çok düşük protein degradasyonu ve kesim sonrası kasların gevrekliğinin azalmasıyla ilişkilidir. In-vivo olarak canlı hücre ve hücre üremesi kapsamında değerlendirildiğinde, kalsiyuma bağlı spesifik proteaz inhibitörü olan kalpastatinin fazla miktarda eksprese olmasıyla kalp, nöral doku ve kaslardaki kalpain aktivitesini önemli ölçüde baskılandığı görülmüştür (Kim vd. 2018). Kalpastatin kesim sonrasında kasta indirgenmektedir (Huff-Lonergan vd. 2010).

Et gevrekliği, belirtilen özelliklere ek olarak birçok genetik faktörün etkilediği kompleks bir özelliktir ve hayvanın yaşamının ancak son döneminde ve kesim sonrası döneminde ölçülebilmektedir. Bu açıdan, sığır etinde gevreklik üzerine etkili özelliklere yönelik genetik çalışmalar yavaş bir seyirde devam etmektedir ve özellik-ilişkili SNP (Single Nucleotide Polymorphism-Tek Nükleotit Polimorfizmi) markırları için yapılan çalışmalara ağırlık verilmesi gerekmektedir (Braz vd. 2018).

Etçi özellik gösteren ırklar için ıslah programlarında ve hayvan seçiminde gevrekliğin ön planda tutulduğu durumlar için potansiyel biyoışaretleyicilerin belirlenmesinde biyoteknolojik uygulamaların kullanılmasına yönelik çalışmalar son yıllarda yaygınlaşmaktadır. Kalpain kompleksine ait genlerin (CAPN1, CAPN2 ve CAST) et gevrekliğinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Malheiros vd. 2018). Memeli dokularında bulunan ve kalpainlerin spesifik bir inhibitörü olan kalpastatin CAST geni tarafından kodlanan endojen bir proteindir (Bhat vd. 2018). Kalpastatin ve onun

kalsiyumla kontrol edilen dört izoformu (CAST, CAST1, CAST2, CAST3 ve CAST4) kalpainlerin proteolitik aktivitesinin endojen inhibitörleri olarak rol oynar. Bununla birlikte et gevrekliği, kalpainler ve onların inhibitörü olan kalpastatinlere ek olarak, yapısal proteinler, proteazlar ve HSP'nin (Heat shock proteins- Isı Şok Proteinleri) ortak etkileşim ağının oluşturduğu ve her birinin fonksiyonlarının hala tam olarak anlaşılmadığı kompleks bir özelliktir (Malheiros vd. 2018). Yani, HSP'in ilgili geninin ve protein ekspresyonunun da et gevrekliği ile ilgili olduğu söylenebilir. Malheiros vd. (2018), Nellore sığır ırkındaki et gevrekliği ile HSP'leri (HSP90AA1, DNAJA1 ve HSPB1) kodlayan genlerin ifadesi ve kalpain kompleks genlerinin (CAPN1, CAPN2 ve CAST) ifadesi arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada Nellore sığır ırkında et gevrekliğinin doğrudan CAPN1 ve CAPN2'in ifadesine bağlı olmadığı, bununla birlikte, CAST2, HSP90AA1, DNAJA1 ve HSPB1 diğer genlerin ifadesiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Leal-Gutiérrez vd. (2018), farklı sığır popülasyonlarındaki eti kalite özelliklerinden gevreklik ile μ -kalpain geni ve onun spesifik inhibitörü olan kalpastatinin ilişkisini incelemişlerdir. Bu iki gen çok sayıdaki polimorfizmle ilişkilendirilmesine rağmen fonksiyonel mutasyonlar tespit edilememiştir. CAST genindeki 4 markırın WB kesme kuvveti ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Lozano vd. (2016) Meksika menşeli 40 adeti *Bos taurus*, 95'i *Bos indicus* ve 61'i ise bunların çaprazlanmış olan *Bos indicus* x *Bos taurus* hayvan ırkları üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, *Bos indicus*, *Bos taurus* ve *Bos indicus* x *Bos taurus* çaprazlanmış genetik grupları değerlendirmek için ve kalpain (CAPN316 ve CAPN4751) ve kalpastatin (CAST-T1)'deki tek nükleotit polimorfizminin WB kesme kuvveti üzerine etkilerini doğrulamak için ticari koşullarda değerlendirilen 196 hayvan üzerinde analiz yapmışlardır. CAST geninin kesme kuvveti üzerine etkilerini değerlendiren son araştırmalara göre çaprazlanmış sığır ırkı ve Angus sığır ırkı; genotipik özellikleri ile markır destekli işletmelerde veya sert et riskinin önlenmesi bakımından sığır eti ürünlerinin pazarlanmasında tercih edilmektedir. CAPN ve CAST genlerinin birlikte etkileri ile değerli ekonomik dönüşler elde edilmiştir. Genotiplemede azalan maliyet ve elde edilen kârlılık et gevrekliği seçimi ve sınıflandırması bakımından

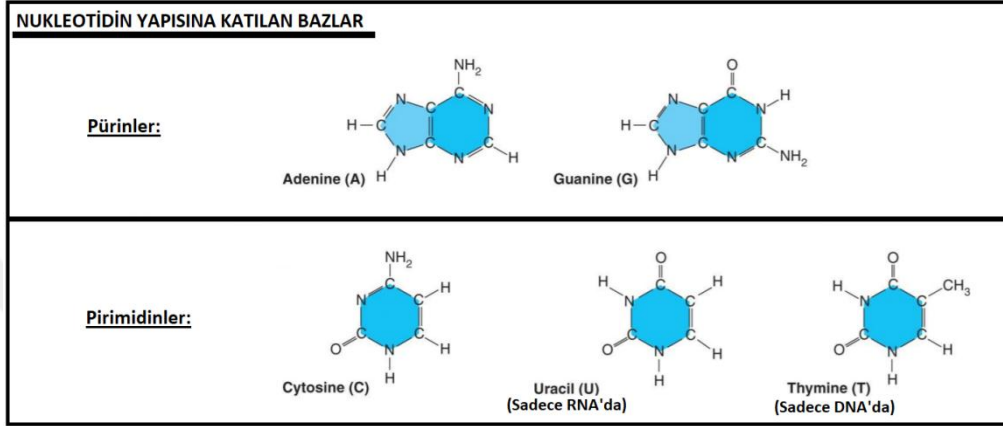
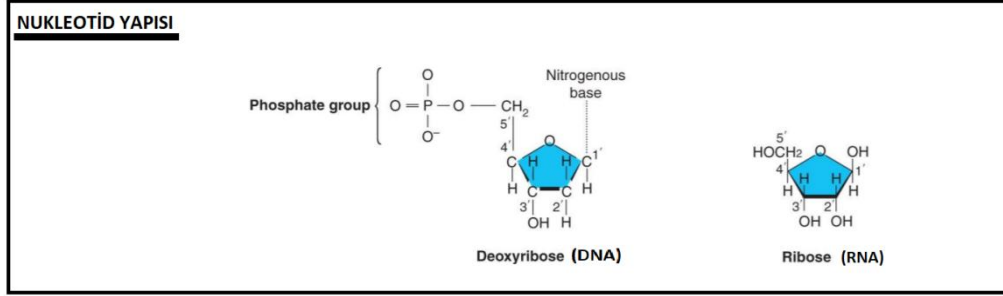
markır destekli seleksiyona (MAS) olarak sağlayabilmektedir. Ticari olarak sığır etinin sınıflandırılmasında markır destekli işletme için belirleyici bir kriter olarak CAPN ve CAST genlerinde tespit edilen polimorfizmler kombinasyonlarda kullanılabilmektedir (Lozano vd. 2016).

Dört farklı Çin sığır ırkından oluşan 367 hayvan kullanarak CAST ve CAPN1 genlerindeki tek nükleotit polimorfizmlerini araştırmak ve bu polimorfizmlerin et kalite özellikleri üzerindeki etkilerini gözlemlemek amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada (Sun vd. 2018), sığırlardaki CAPN1’de iki ve CAST’da bir SNP bulunmuştur. Genetik çeşitlilik analizleri sonucu dört ırktaki bir çok SNP’nin orta düzeyde genetik çeşitliliğe sebep olduğu öne sürülmüştür. Buna ek olarak, bireysel markırlar ve et kalite özellikleri arasındaki ilişki Çin Simmental ırkı üzerinden analiz edilmiştir. CAPN1 4558 A-G bölgesinin WB kesme kuvveti değeriyle ve mozaikleşme düzeyiyle önemli derecede ilişkili olduğu bulunmuştur. CAST genotipi, ölçülen özelliklerle anlamlı bir ilişki göstermezken CAPN1 4684 C-T’in kesme kuvveti değeri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Çalışma CAPN1’in et gevrekliği üzerindeki etkisini doğrulamakta ve gelecekteki sığır yetiştiriciliği için önemli buluşlar ortaya koymaktadır (Sun vd. 2018).

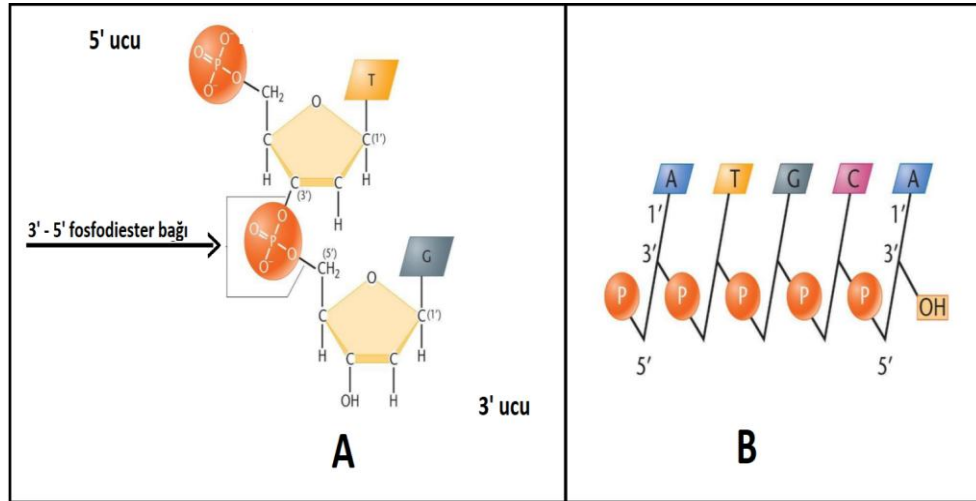
2.4 DNA ve Yapıtaşları

DNA’nın (Deoksiribonükleik Asit) yapıtaşı nükleotittir. Her nükleotit Pentoz (5-karbon) şeker deoksiriboz, fosfat molekülü ve azotlu bazdan oluşur. Azotlu bazlar nükleotitin değişken bileşenidir. Adenin (A) ve Guanin (G) pürin bazlarını oluştururken Timin (T), Sitozin (C) ve Urasil (U) pirimidin bazlarını oluşturur. Bunlardan Timin RNA’da (Ribonükleik Asit) bulunmazken, Urasil de DNA’da yer almaz (Şekil 2.3).

Nükleotitler uzun DNA molekülleri oluşturacak şekilde birleşmektedir ve her DNA molekülü birbirini üzerine sarmal oluşturacak şekilde dolanan iki zincirden oluşmaktadır. Bir zincirdeki nükleotitler birbirlerine fosfodiester bağı ile bağlıdır. Her zincirin polaritesi vardır, fosfodiester bağı iki nükleotitin 5' ucu ve 3' ucu arasında oluşmaktadır (Şekil 2.4).



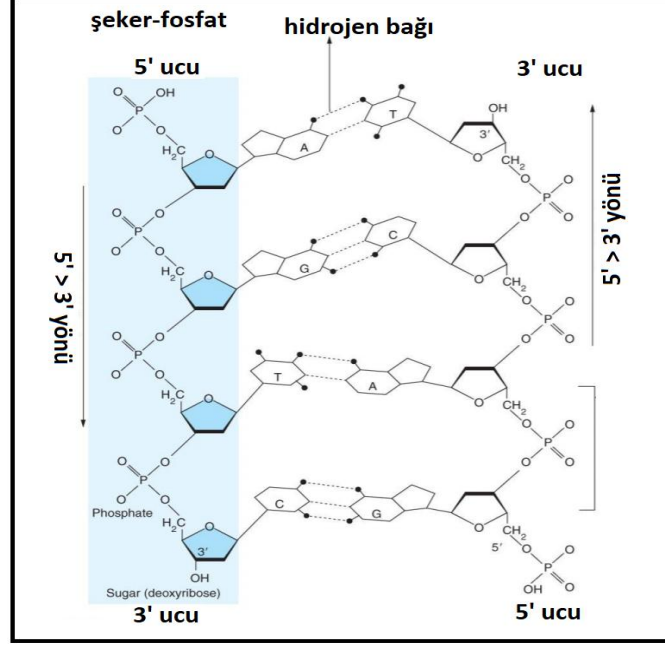
Şekil 2.3 Nükleotit yapısı ve nükleotit yapısına katılan bazlar



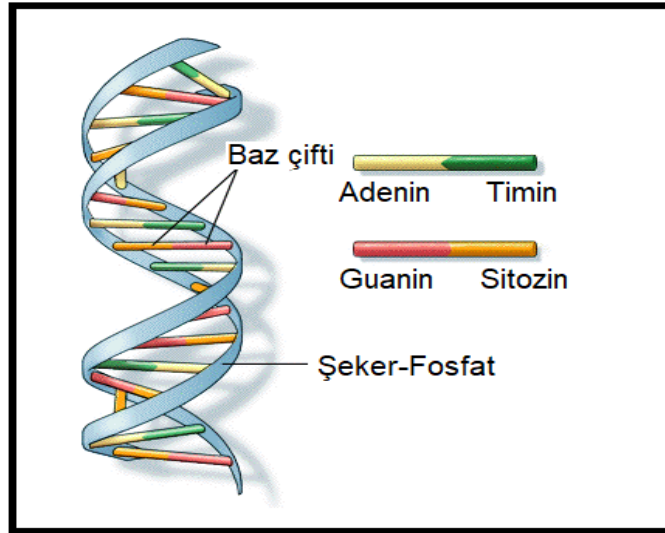
Şekil 2.4 Nükleik asitlerin molekül yapısı

İki DNA zinciri hidrojen bağları ile bir arada tutulur. Tamamlayıcı bazlar arasında hidrojen bağı oluşur. Adenin (A) Timinle (T) ve Guanin (G) ise Sitozinle (C) sırasıyla

iki ve üç adet hidrojen bağı ile bağlanmış olur (Şekil 2.5). Oluşan iki zincir birbirine zıt yönde antiparalel bir sarmal yapı oluşturmaktadır (Şekil 2.6).



Şekil 2.5 DNA'nın “şeker ve fosfat belkemiği” ve bazlar arası “hidrojen bağları”

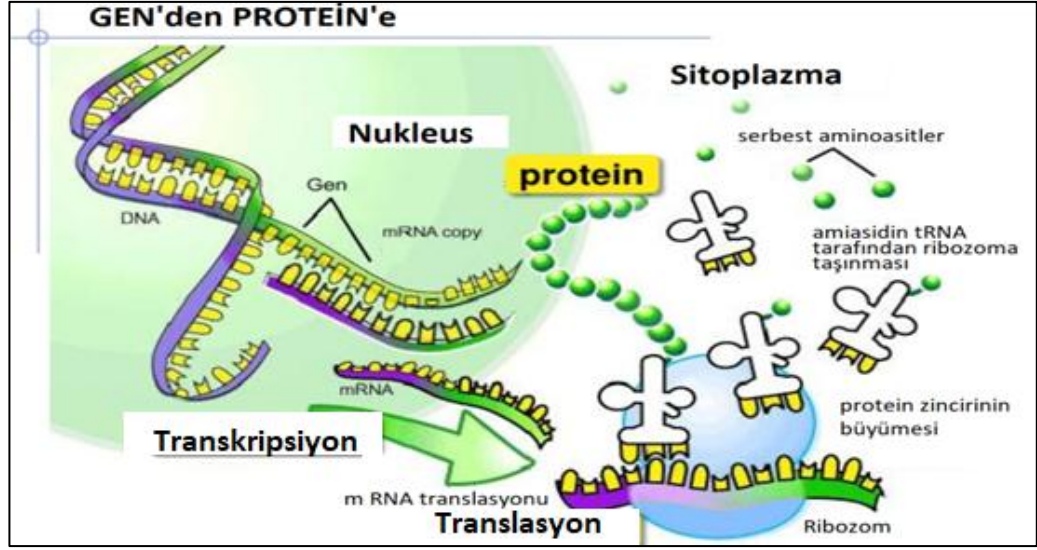


Şekil 2.6 DNA'nın çift zincir sarmal yapısı

2.4.1 DNA, gen ve gen ifadesinin düzenlenmesi

Bir kromozomdaki belirli bir nükleotit dizisi gen olarak adlandırılmaktadır. Ortalama 1000–4000 nükleotitden oluşan genler farklı büyüklüklerde olabilmektedir ve hücre içindeki fonsiyonları farklılık göstermektedir. Buna ek olarak, genlerin boyutlarının ve işlevlerinin doğru orantılı olmadığını gösteren örnekler mevcuttur (Pearson 2006). Genlerin, genom dizisinde yeri bilinen, transkripsiyonu gerçekleştirilebilen regüle edici ve fonksiyonel DNA bölgeleri olduğu şeklinde tanımlamalar da yapılmaktadır (Pennisi 2007, Gerstein vd. 2007). Gen 5' ucundan başlanarak 3' ucuna doğru okunmaktadır ve gende sırasıyla UTR (Untranslated Region- Kodlanmayan Bölge) olarak adlandırılan translasyona uğramayan bölge ve açık okuma çerçevesi bulunmaktadır. Genin 5' ucundaki UTR bölgesinde geni aktive eden ve transkripsiyonu regüle eden düzenleyici bölge, ayrıca genin tanınmasını sağlayan promoter kısmı mevcuttur (Coverley vd. 1994).

Genden polipeptit üretiminin gerçekleştirilmesinde birçok basamak bulunmaktadır. Regülatör elemanları, promoter ve dizideki ilişkili bölgelere bağlanan transkripsiyon faktörleri bir genin transkripsiyonunun başlamasında rol oynamaktadır. 5' ucundaki transkripsiyon başlangıç bölgesiyle ekzon ve intronlar dahilindeki kodlayan bölgeleri takip eden birkaç yüz ila bir milyondan fazla nükleotit arasında transkripsiyon gerçekleşmektedir. "Splicing" aşamasında ise primer RNA'nın 5' ve 3' uçlarındaki modifikasyonlar gerçekleştirilmektedir ve intron bölgeleri çıkartılıp kalan ekzonlar birleştirilmektedir. Oluşturulan mRNA'nın stoplazmaya taşınmasıyla translasyon sonucunda protein elde edilmektedir. Ökaryotlarda transkripsiyon, translasyon ve translokasyon aşamaları (Şekil 2.7) mevcuttur (Fairall vd. 1986, Rajkowicsch vd. 2004).



Şekil 2.7 Protein sentezinde başlatma kompleksinin oluşmasının ardından zincir uzamasının ilk adımı olan ikinci amino asit eklenmesi (Fluitt vd. 2007)

Bir DNA dizisinin RNA polimeraz aracılığıyla mRNA şeklinde kopyalanması transkripsiyon (yazılma-yazılım) olarak adlandırılmaktadır ve bu süreç DNA'da bulunan bilginin protein zincirine dönüştürülmesinin ilk basamağıdır. "Transkripsiyon Birimi" RNA'nın sentezinde görevli olan DNA üzerindeki dizi şeklinde tanımlanmaktadır. RNA polimeraz II ve genel transkripsiyon faktörleri transkripsiyonun başlamasından sorumlu proteinlerdir (Fairall vd. 1986, Nabel ve Baltimore 1987).

Translasyon, oluşturulan mRNA'ların ribozomda üçlü üniteler halinde okunmasıyla gerçekleştirilen amino asit dizisinin sentezlenmesidir ve protein üretiminin ilk aşamasıdır. Daha sonra amino asit veya polipeptit zincirinde meydana gelen katlanmalarla etkin bir protein elde edilmektedir (Zouridis ve Hatzimanikatis 2007).

Sitoplazmada bulunan büyük ve küçük olmak üzere ribozomun iki alt birimlerinden küçük alt birimi translasyon sırasında mRNA zincirinin 5' ucuna bağlanmaktadır. mRNA'daki kodonlar ribozomdaki bölgelere entegre olan tRNA'ların antikodonları tarafından tanınmaktadır, ilişkili amino asitlere bağlı olan tRNA'ların ribozom üzerinde art arda eklenmesiyle tRNA'ların 3' ucundaki amino asitler bağlanarak polipeptit zincirini oluşturmaktadır (Whitford vd. 2013).

Kodon tanıma, mRNA üzerinde üçerli gruplar halinde değerlendirilen kodonlar ilgili amino asitlerle birleşen tRNA'ların komplementer antikodonları tarafından tanınmaktadır (Thompson ve Karim 1986).

2.5 Varyasyonlar: Polimorfizm/Mutasyon İlişkisi

Mutasyon bir popülasyondaki görülme sıklığı %1'den daha düşük olan varyantlar şeklinde tanımlanmaktadır. Polimorfizm ise iki veya daha fazla sayıda farklı dizinin bir türün farklı bireylerinde görülmesi olarak açıklanmaktadır ve replikasyon sırasında meydana gelen hatalardan kaynaklandığı varsayılmaktadır. En sık gözlenen polimorfizmler arasında tek nükleotit polimorfizmleri, minisatellit/mikrosatellit tekrarları ve insersiyon/delesyonlar yer almaktadır (Dadi vd. 2012).

2.5.1 Tek Nükleotit polimorfizmleri (SNP)

DNA üzerindeki konumu belli olan bir bazda meydana gelen tek nükleotit değişiklikleridir. Tüm genetik varyasyonların %90'ını oluşturur. SNP'ler transisyon (Pürin-Pürin ve Primidin-Primidin baz değişimleri) veya transversiyon (Pürin-Primidin baz değişimleri) şeklindedir. İnsan genomu kapsamında 10-30 milyon SNP'nin bulunduğu düşünülmektedir. Damızlık sığır ırklarında gerçekleştirilen genomik sekans analizleri sonucu otozomal ve seks kromozomal lokalizasyonlu toplam SNP sayısı 52.678 olarak tespit edilmiştir. Yine bu çalışmalarda farklı SNP'lere ait MAF (Minor Allele Frequency- Minör Alel Frekansı) değerleri birbirinden anlamlı ölçüde farklı bulunmuştur (Dadi vd. 2012).

Gen kodlayan bölgelerdeki SNP varyantlarının bir proteindeki amino asit sekansında değişime neden olabileceği ve protein fonksiyonunu doğrudan etkileyebileceği vurgulanmaktadır. Bunların belirli bir popülasyonda görülme sıklıkları %1'in altında olabilmektedir. Bazı SNP'ler, regülatör sekanslarında değişime neden olabilmekte ve böylece dolaylı bir şekilde gen ekspresyonunu etkileyebilmektedir. Popülasyonlar arasında görülen genetik farklılıklar fenotipik farklılıklara sebep olabilmektedir. Epidemiyolojik ve biyomedikal araştırmalar farklı popülasyonlarda hasta bireyler ve

sağlıklı kontroller arasındaki SNP farklılıklarını ortaya koymaktadır (Dadi vd. 2012). Bazen hastalıklara karşı duyarlılık veya direnç şeklinde olduğu gibi damızlık hayvan ırkı için etin gevrekliği ve duyuşal özellikleriyle ilgili farklılıklar olarak da kendini göstermektedir (Leal-Gutiérrez vd. 2018, Sun vd. 2018).

SNP belirlemede farklı yöntemler kullanılabilmektedir. Bu yöntemler bilinen SNP'lerin analizine yönelik olarak veya yeni SNP'lerin identifikasyonuna yönelik olarak değişmektedir. Bilinen SNP'nin analizi için PCR (Polymerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu), restriksiyon enzimleri ile PCR analizi, ARMS (Amplification Refractory Mutation System-Alele Özgü Amplifikasyon). Oligonükleotit Ligasyon Testleri, Minisekanslama, FRET (Flüoresan Rezonans Enerji Transferi-TaqMan Genotipleme) sistemi, Çip Teknolojisi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Yeni SNP identifikasyonu için ise yine yukarıdaki yöntemler kullanılabilmekle birlikte, günümüzde bunun için en uygun yöntem aynı anda çok sayıda geni ya da geniş gen bölgelerinin aynı anda daha hızlı ve daha kolay taranmasını sağlayan Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing-NGS) teknolojisidir. Ancak, yeni tanımlanan SNP'lerin mutlaka Sanger Sekanslama tekniği ile konfirmasyonlarının (sağlamalarının) yapılması gerekmektedir (Wright 2005).

2.5.2 Minisatelit/mikrosatelit DNA dizileri

Minisatelit DNA Dizileri, 9-65 baz çifti uzunluğundaki değişken sayılarda tekrarlayan dizilerdir ve VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) olarak da adlandırılmaktadır. DNA üzerinde 1-20 kilobaz arasında değişim gösteren yaklaşık 1000 adet blok oluşturmaktadırlar. Polimorfik özelliklerinden dolayı DNA analizlerinde tanı amaçlı kullanılabilmektedirler. Mikrosatelit DNA dizileri ise 2-10 baz çifti uzunluğundaki tekrar dizilerinden oluşmaktadır ve genomda 100.000'den fazla dizi mevcuttur. Mikrosatelit değişimleri "Short Tandem Repeats" (STR) olarak adlandırılmaktadır. Bu diziler de minisatelitler gibi polimorfik özelliklere sahip olduklarından benzer amaçlara yönelik değerlendirilebilmektedir. Mikrosatelitler, genetik materyal üzerinde dağılım göstermiş olduklarından dolayı genlerin kromozomlarda bulundukları bölgelerin belirlenmesi için yararlanılan bağlantı (linkage)

analiz çalışmalarında markır görevi görmektedir. İnsan genomunun yaklaşık 1/3'ünde genomda dağılım gösteren hareketli DNA dizileri bulunmaktadır. Bu diziler kararsız olduklarından dolayı genom içinde yer değiştirebilmektedirler. Hareketli diziler DNA'ların transpozisyonu ile oluşan transpozonlar ve cDNA aracılığıyla DNA'ya aktarılmış olan retropozonlar olmak üzere iki grup halinde incelenmektedir (Knight ve Landweber 2000).

Hem polimorfizm hem de mutasyon DNA'daki en sık ve en önemli değişikliklerdir. Belirli bir DNA bölgesinde bulunan bir değişikliğin polimorfizm şeklinde değerlendirilebilmesi için popülasyondaki öznelerin en az %1'inde bulunması gerekmektedir. Mutasyonların polimorfizmlerden daha nadir olmasından dolayı görülme sıklığındaki bu fark polimorfizmi mutasyondan ayırmaktadır ve polimorfizm sıklığı popülasyonlara göre farklılık göstermektedir. Polimorfizmler, hastalığa yakalanma riskinde artışa ya da azalmaya, ilaçlara ve dış etkenlere karşı organizmanın verdiği cevabın değişmesine ya da çeşitli yan etkilerin görülmesi gibi birçok farklılaşmalara neden olabilmektedir. Mutasyon ise gen ya da kromozomda meydana gelen kalıcı nitelikte olan, alt kuşaklara aktarılan ve genellikle hastalık, kanser vb gibi olumsuz sonuçlara sebebiyet veren değişimlerdir. Mutasyonlar kromozom düzeyinde (örneğin translokasyonlar) veya gen düzeyinde baz değişimleri (örneğin nokta mutasyonları) şeklinde olabilmektedir. Bunun yanında polimorfik bölgeler "genetik markır" olarak DNA'nın test edilmesi amacıyla da (örneğin, fingerprint analizi gibi) kullanılabilmektedir (Cargill vd. 1999).

2.6 DNA Analiz Teknolojileri

2.6.1 DNA izolasyonu

DNA izolasyon yöntemleri hücrelerin ve hücre zarına bağlı olan organelerin parçalanmasını, DNA'nın yıkımından sorumlu enzimlerin inaktive edilmesini, DNA'daki proteinlerin denatüre edilmesini ve DNA'nın solventlerle çöktürülmesini kapsayan dört temel adımdan oluşmaktadır. Nükleik asitler polar olduklarından dolayı polar solventlerde çözünürken apolar solventlere maruz kaldıklarında çökmektedirler.

Ökaryot hücrelerde çift zincirli lineer DNA çekirdeğin içinde, mitokondride ve kloroplastta mevcutken prokaryotlarda sitoplazmada bulunmaktadır ve çift zincirli, halkasaldır. Ökaryotların aksine prokaryotların DNA'sı histon proteinleri tarafından sarılı değildir. Nükleik asitlerdeki N-glikozidik pürin ve pirimidin bağları asidik ve bazik koşullara toleranslıdır ve RNA'daki fosfodiester bağları 0.3 M derişimli KOH varlığında 37°C'de denatüre olmaktadır. DNA'daki primerler ise bu şartlar altında stabildir. 0.1N TCA, HCl ya da HClO₄ gibi asitler DNA ve RNA'yı çöktürmektedir. Nükleik asit verimini etkileyen en önemli aşamalardan biri olan hücre denatürasyonu sırasında, bağ doku gibi katı dokular dışındaki büyük parçaların bütünlüğünün bozulması gerekmektedir. İzolasyonda proteinlerin ve RNA'nın ayrılmasının sağlanması gerekir. Proteinler SDS (sodyum dodesil sülfat), proteinaz K, fenol, organik çözücüler veya SDS gibi deterjanlarla denatüre edilerek, RNA ise RNaz ile parçalanarak ortamdan uzaklaştırılır. EDTA'nın (Etilendiamin tetraasetik asit), magnezyum iyonlarıyla diğer iyonların etrafında şelat oluşturmasıyla DNaz'ın aktivasyonu sonlandırılmaktadır. Etkili bir deterjan olan SDS, DNA'daki protein parçalanmasında görev almaktadır. Proteinaz K ise SDS varlığında 65°C'de aktive olan ve proteinleri denatüre eden bir enzimdir. DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallardan kloroform ile fenol, DNA ve RNA'daki proteinlerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Köpük önleyici işlevi gören izoamil alkol kloroform ile birlikte kullanılmaktadır. Ortamın pH'ı ise Tris buffer ile yükseltilmektedir ve böylece pH=8'in üzerinde DNaz'ın inaktivasyonu gerçekleştirilmektedir. Bu sayede lipit ve polisakkaritler de ortamdan uzaklaştırılmış olmaktadır. İzopropanol, DNA'nın çöktürülmesi işleminden sorumludur. Buna ek olarak sodyum ve amonyum tuzları da bu amaca yönelik kullanılabilir. Etanol ya da diyalizden ise DNA'nın son aşamada çöktürölüp saflaştırılması işleminde yararlanılmaktadır (Göl ve Yıldırım 2018).

2.6.2 DNA ölçüm yöntemleri

Nükleik asit miktarının belirlenmesi bazı moleküler yöntemler sırasında önem arz etmektedir ve spektrofotometreyle ultraviyole (UV) absorbansı üzerinden ölçülebilmektedir. Nükleik asitler, proteinler, organik maddeler, deterjanlar ve lipidler UV dalgaları absorbe eden halkasal bir yapıya sahiptir. DNA, RNA, proteinler ve bazı

amino asitler için ~ 260 nm ve ~280 nm değerlerinde optimal absorbans ölçülmektedir. pH değerindeki değişikliklerin absorbans değerini etkilemesinden dolayı TE tamponuyla DNA dilüsyonu yapılmaktadır. A260/A280 oranı nükleik asitlerin saflığını vermektedir. Saflığın istenilen düzeyde olduğu değerler DNA için ~1.8, RNA için ise ~2.0 olarak belirlenmiştir ve bunlara yakın değerler bulunduğu nükleik asit kantitasyonu gerçekleştirilebilmektedir. Bu oranın 1.8'in altında bulunmasıyla protein veya fenol kontaminasyonunun olduğu varsayılmaktadır. Nükleik asit miktarının belirlenmesi için 260nm'de ulaşılan absorbans değeri DNA g/ml ile çarpılmaktadır. Ticari kitler ve otomatize sistemler, diğer sistemlerde olduğu gibi genetik materyalin ekstraksiyonunu, stabilizasyonunu ve inhibitörlerin etkisiz hale getirilmesini kapsamaktadır. Kitlerde nükleik asitlerin kimyasal yöntemlerle ekstraksiyonu için kullanılmak üzere guanodin tiosiyanat, lizozim, proteinaz K, SDS bulunmaktadır. Saflaştırma ve inhibitörlerin etkisiz hale getirilmesi süreçlerinde kimyasal yöntemlerin yanı sıra vakum, spin-kolon ve nükleik asidin silica veya manyetik boncuklara yapıştırılması gibi fiziksel yöntemler de kullanılabilir. Ticari manuel kitlerden IsoQuick nükleik asit izolasyon kiti (Orca), Puregene izolasyon kiti (Gentra) ve Master Pure ekstraksiyon kiti (Epicentre) kapsamında kimyasal yöntemler kullanılırken, QIAmp (QIAGEN) ve High Pure saflaştırma kitleri (Roche) spin-kolon, Nuclisens izolasyon kiti (bioMerieux Suisse) silika boncuklara yapıştırma yöntemlerini kullanmaktadır. Spin-kolon tekniğiyle yapılan saflaştırmada nükleik asitler santrifüj sırasında bir membran filtreye takılmakta ve Boom silica yönteminde ise aynı işlem silika boncuklar tarafından yürütülmektedir. Manuel kitler 1 saat 55 dakika ile 4 saat 39 dakika arasında işlem süresine sahiptir. Bu kitlerin uygulanabilirliğinin kolay olması ve hassasiyetinin yüksek olmasının yanı sıra otomatize sistemlerle kıyaslandığında zahmetlidir ve kontaminasyon ihtimali daha yüksektir. ABI 6700 (PE Biosystems Genomics), BioRobot (QIAGEN), Nuclisens Extractor (bioMerieux Suisse), XTractor Gene (Sigma-Aldrich) gibi mevcut otomatize cihazlarda örnekteki nükleik asit vakuma maruz kaldığında membran ya da silika ortama bağlanmaktadır. MagNa Pure (Roche), BioRobot (QIAGEN) ve Nuclisens miniMag (bioMerieux Suisse) cihazlarında ise manyetik boncuklar kullanılmaktadır. MagNa Pure LC cihazında (Roche) 1-32 farklı örnek eşzamanlı olarak 50-180 dakika içerisinde çalışılabilmektedir ve çapraz kontaminasyon ihtimali ihmal edilebilecek boyuttadır.

QIAGEN otomatize sistemleri ise Bio Robot M48 manyetik boncukla saflaştırma yöntemini kullanmakta ve 6-48 örneğin aynı anda çalışılmasını mümkün kılmakta ve RNA hücre-doku, DNA kan-doku ve viral nükleik asit izolasyonu hizmeti sunmaktadır. Çapraz kontaminasyon Hepa filtrasyonu ve UV sterilizasyonu sayesinde önlenmektedir. BioRobotMDx'de (QIAGEN) ise 2.5 saatte 96 örnek çalışabilmek mümkündür. Cobas Ampli Prep Cihazı (Roche) ise 72 örnek çalışabilme, 4 farklı testi aynı anda uygulayabilme ve kalitatif-kantitatif sonuç verebilme özelliği ile kolay örnek hazırlanabilen, güvenilir, kapalı otomatize bir sistemdir. Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında örnek hazırlamada kullanılan otomatize sistemlerde işlem süresi 20 dakika ile 2 saat arasında değişmektedir. Otomatize örnekleme sistemleri, uygulamada meşakatli olmamaları ve kontaminasyon riskini en aza indiren kapalı sistemler olmaları gibi avantajlara sahiptir. Bu nedenle, pahalı sistemler olmalarına rağmen yoğun iş yüküne sahip tanı laboratuvarlarında kullanılmaları güvenilirlik ve hızlı tanı açısından önem taşımaktadır (Vanek vd. 2011).

2.7 PCR Teknolojileri

İlk olarak mikrobiyoloji alanında kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), geleneksel yöntemlerle saptanamayan mikroorganizmaların belirlenmesinde etkilidir, duyarlılığı yüksektir ve hızlı sonuç vermektedir. Bu yöntemle hastalardan alınan örneklerdeki mikroorganizmaların nükleik asitleri in vitro olarak çoğaltılmakta ve bulunmaktadır. PCR kapsamında bakterideki DNA replikasyonunun bir tüp içinde gerçekleştirilmesi için ilgili enzimlerin çalıştığı sıcaklık ve ortam koşulları sağlanmaktadır. Buna bağlı olarak yüksek sıcaklığa dayanıklı Taq polimeraz enzimi kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra örneğe ait izole edilmiş genetik materyal, spesifik primer dizileri, nükleotitler, kofaktör görevi gören Mg iyonları ve enzim tamponu eklenmektedir. Üç sıcaklık basamağından oluşan PCR işlemi "Thermal Cycler" isimli otomatize ısı kontrol cihazlarında gerçekleştirilmektedir. DNA zincirlerinin 94°C sıcaklığa maruz bırakılarak birbirinden ayrılması ilk aşamadır. Sıcaklığın 50-70°C'ye düşürülmesi sonucu primerlerin spesifik dizilerle hidrojen bağı oluşturmaları ikinci basamak olan birleşme kapsamındadır. Üçüncü basamak olan polimerizasyonda ise sıcaklığın 74°C'ye yükseltilmesiyle primerlere bağlanan Taq polimerazlar dizinin

3' ucuna nükleotitleri ekleyerek DNA sentezini gerçekleştirmektedir. Her döngünün sonunda kopyalanan bölgenin miktarının geometrik olarak çoğaltılması sağlanmaktadır. Elde edilen DNA parçaları amplikon olarak adlandırılmaktadır ve etidiyum bromürle boyanarak uzunlukları mor ötesi ışık altında agaroz ya da poliakrilamid jel elektroforeziyle (PAGE) belirlenmektedir. Geleneksel PCR yöntemi duyarlılığının yüksek olması, maliyetinin az olması ve kolay bir uygulama olması açısından avantajlıdır. Ayrıca duyarlılık ve özgüllüğünün artırıldığı “nested PCR” ve hot-start PCR”, RNA parçasını çoğaltmada kullanılan “rt-PCR”, birden fazla mikroorganizmanın çalışılabilirdiğı “multipleks PCR” ve genel enfeksiyon varlığının saptanmasında kullanılan “broad-range PCR” gibi versiyonları mevcuttur. Kontaminasyon riskinin yüksek olması, uzun zaman alması, meşakatli bir işlem olması, analitik özgüllüğünün düşük olması ve sınırlı sayıda örneğin çalışılabilmesi ise dezavantajlarındandır (Shah 2019).

Real-time PCR yöntemi, kantitasyonun güvenilirliğini artırmak, kontaminasyon riskini azaltmak, süreci hızlandırmak, özgüllüğü yükseltmek ve çalışılan örnek sayısını arttırmak amacıyla geliştirilmiştir. Real-time PCR’da amplifikasyonla eş zamanlı olarak floresan sinyali artış göstermekte ve bu sinyallerin ölçülmesiyle kantitatif bir sonuca ulaşılmaktadır. Böylece aynı cihaz içerisinde çoğaltma ve çoğaltılan ürünleri saptama işlemi gerçekleştirilebilmektedir. SYBR Green I çoğaltılan bölgelerin saptanmasında en sık kullanılan çift zincirli DNA boyalarından biridir. Üçüncü basamakta kopyaların çift zincirli hale gelmesiyle DNA boyalarla işaretlenmekte ve saptanan floresan miktarında artışa sebep olmaktadır. Elde edilen sonuçlar “Melting Curve” (erime eğrisi) analiziyle değerlendirilmektedir (Shah 2019).

2.8 DNA Dizi Analiz Yöntemleri

DNA dizi analizleri ya da sekanslama DNA birincil (temel) yapılarının belirlenmesinde kullanılan yöntemlerdir ve DNA’nın nükleotit dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir. DNA dizi analizi, gen yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında çok sayıda bilgi edinmemizi sağlamıştır. Özellikle kalıtsal hastalıkların meydana gelme ve tedavi süreçleriyle ilgili mekanizmaların anlaşılması için araştırma

yapılan konuya etki eden gen bölgelerinin belirlenmesi gereklidir. Bu bakımdan DNA dizi analizlerinin yapılması tedavi sürecinin başlangıcı ve devamında izlenecek yolu belirleyen en önemli faktördür. DNA dizi analizi ile birçok organizmanın genlerinin yapısı ve organizasyonu hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. Birçok canlı türünün tüm genom haritaları tanımlanmıştır. Sıklıkla gen mutasyonlarının (delesyon, insersiyon vb) tespiti ya da rekombinant DNA oluşum yapılarının tayininde kullanılmaktadır (Bisht ve Panda 2014).

Maxam-Gillbert kimyasal degradesyon yöntemi, Shotgun, Pyrosequencing ve Sanger yöntemi geleneksel DNA dizileme yöntemleridir. Bunlar içinde en yaygın olarak kullanılan Sanger dizileme yöntemidir (França vd. 2002).

2.8.1 Sanger dizileme yöntemi

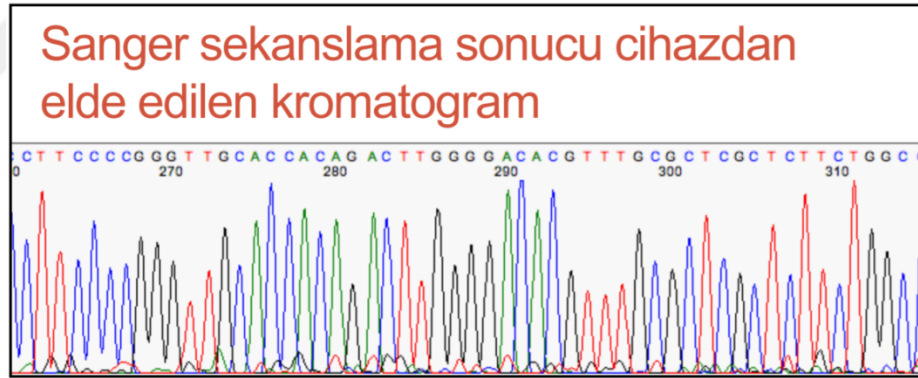
Bu yöntem enzimatik DNA sentezine dayanır ve en yaygın kullanılan dizi analiz tekniğidir. Yöntemde dizisi saptanacak olan DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılır. DNA sentezi sağlamak için Klenov, Taq DNA polimeraz, ters transkriptaz ya da sequenaz enzimlerinden birisi kullanılabilir.

Yöntemin temeli DNA polimerazın dNTP (deoksiribonükleozid trifosfat) ve ddNTP'leri (dideoksiribonükleozid trifosfat) de substrat olarak kullanabilmesi esasına dayanmaktadır. Teknik olarak dizi analizi a) polimeraz zincir reaksiyonu b) dizileme reaksiyonu c) jel elektroforezi ve bilgisayarda değerlendirme olmak üzere üç basamaktan oluşmaktadır.

Reaksiyonun gerçekleşeceği karışım dört tüp halinde hazırlanmaktadır. Her bir tüpte dATP, dGTP, dCTP ve dTTP nükleotitleri, dizinin rastgele sonlandırılmasından sorumlu renkli floresan kimyasallarla işaretlenmiş ddATP, ddGTP, ddCTP ve ddTTP olmak üzere dört çeşit dideoksinükleotit ve zincir uzamasını gerçekleştirecek olan DNA polimeraz I bulunmaktadır. dNTP ve ddNTP moleküllerinin aynı bölgelere bağlanma

eğilimiden dolayı eklenen ddNTP'lerin konsantrasyonu diğer bileşenlerin konsantrasyonundan daha düşük olmalıdır (Kahya vd. 2013).

DNA'nın tek zincirli bir yapı haline getirilmesinin ardından işaretlenmiş nükleotitler DNA polimeraz, primer ve kalıp DNA varlığında yapıya katılmaktadır. dNTP'lerin sentezin yapı taşı olarak kullanılması halinde uzama devam etmektedir. Dideoksinükleotidin zincire eklenmesi ise ddNTP'lerin 3' ucunda OH grubunun olmamasından dolayı reaksiyonun durmasına sebep olmaktadır. Tüplerde gerçekleşen reaksiyonlar sonucu çeşitli uzunlukta DNA parçaları oluşturulmuştur. Dizileme işlemi üç ana basamakta ve 30-40 döngüde gerçekleşmektedir. Elde edilen DNA dizilerinin görüntülenmesinde jel elektroforezi ya da otomatik dizi analizi cihazları kullanılabilir. Jel elektroforezinde DNA molekülleri elektriksel alanda uzunluklarına göre sıralanmaktadır (Şekil 2.8). Dizilerin uzunlukları jel görüntüleri üzerinden saptanmaktadır (Kahya vd. 2013).

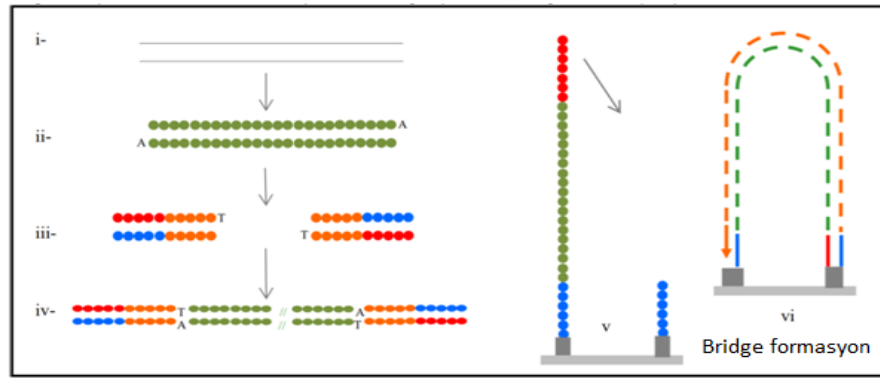


Şekil 2.8 Sanger dizileme kromatogram çıktısı

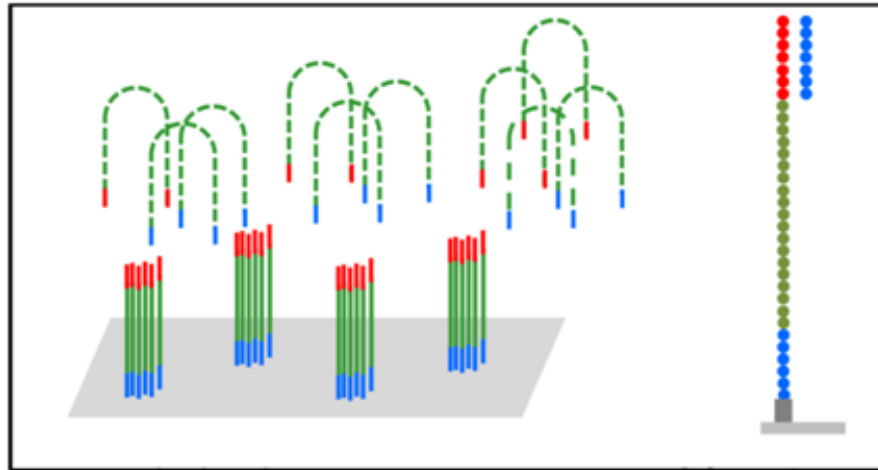
2.8.2 Yeni nesil dizileme

Eski yöntemlerin geliştirilmesi ve yeni yöntemlerin bulunması, daha ucuz ve hızlı yöntemlere duyulan bir ihtiyacın sonucudur. Yeni nesil dizileme yöntemleri sayesinde tek seferde binlerce hatta milyonlarca dizilerin üretilebilir hale gelmesi sağlanabilmektedir. Sanger dizileme tekniği ile genom dizileme uygulamaları uzun zaman alırken yeni nesil dizileme yaklaşımları sayesinde çok kısa bir sürede (örneğin

tüm genomun dizilenmesi birkaç gün sürmekte) tamamlanabilmektedir. Biyokimyasal reaksiyonlar açısından bakıldığında yeni nesil dizileme yaklaşımlarının, Sanger dizilemeden farklı biyokimyasal temelleri bulunmaktadır. Örneğin, Illumina tabanlı yeni nesil dizilemede izotermal köprü amplifikasyonu dizileme işleminin hem hızlı hem de yüksek miktarlarda gerçekleştirilmesini sağlayan bir basamaktır (Şekil 2.9, Şekil 2.10).



Şekil 2.9 Köprü amplifikasyonu



Şekil 2.10 Flow cell üzerinde klonal grupların oluşturulması ve köprü formasyonu

Kalıp DNA parçaları adaptör oligonükleotit dizilere bağlandıktan sonra (turuncu ve kırmızı) denatüre edilerek tek zincir DNA oluşturulmaktadır. Flow cell yüzeyine kovalent olarak tutturulan yakalayıcı oligonükleotitler sayesinde kalıp DNA'ya eklenen

adaptör oligonükleotitler primer olarak kullanılarak kalıp DNA kopyalanmakta ve daha sonra tekrar denatüre edilmektedir. Yeni sentezlenen DNA zinciri yakalayıcı oligonükleotide doğru bükülerek hibridize olmakta ve köprü yapısını oluşturmaktadır. Yakalayıcı oligonükleotit primer görevi görerek DNA zincirini tekrar çoğaltmaktadır. Bu oluşumun binlercesi eş zamanlı ve çok sayıda bridge amplifikasyonun ve dizilemenin gerçekleşmesini sağlamakta ve ortaya muazzam büyüklükte DNA sekans verisi çıkmaktadır (Shendure ve Ji 2008).

2.8.2.1 NGS çıktılarının değerlendirilmesi ve biyoinformatik analiz prensipleri

Biyoinformatiğin temel amacı, genomu analiz edilen bir canlının fonksiyonlarının değerlendirilerek yaşam kalitesinin artırılmasıdır. Bu amacın gerçekleştirilmesi için DNA şifresinin ve bu şifredeki her değişimin anlamının ortaya konulması gerekmektedir. Organik bir beden inşasında kullanılan ve uzun terimsel bilgiyi saklayabilen DNA, hemen hemen tüm canlılarda bulunmaktadır. DNA dizisi veya genetik dizi, DNA ipliğinin birincil yapısından elde edilen harfler dizisidir. Bazı özel durumları ifade etmek için A, T, G ve C harflerinin dışında farklı harflerden de bahsedilir. DNA dizisindeki belirsizlikleri vurgulamak için bu özel harfler kullanılmaktadır. Bu amaçla IUPAC (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği)'nin belirlediği N, R ve Y sembolleri kullanılmaktadır (Cornish-Bowden 1985).

Bir diziyi ifade eden harfler aralarında boşluk olmaksızın yazılmaktadır. Örnek olarak GTAACGTTAC dizisi aralarında boşluk olmadan yazılmıştır. Bu dizi soldan sağa 3' (5 üssü, 3 üssü) doğrultusuna karşılık gelmektedir. 5' nükleik asit sarmalını meydana getiren nükleotitlerin uç uca eklenme yönünü ifade etmektedir. Kimyasal adlandırmadaki belli kurallara göre bir nükleotitin şeker halkasındaki karbon atomları 1', 2', 3', 4' ve 5' şeklinde adlandırılmaktadır (3 üssü, 5 üssü olarak okunur). Nükleik asitlerin bir ucundaki şeker grubunun serbest bir 3' hidroksil (-OH) grubu, öbür ucundaki şekerin ise serbest bir 5'-OH grubu bulunmaktadır. Bu iki uca, sırayla 3' ve 5' uçları denilmektedir. Sarmallı DNA veya RNA dizileri yazılırken bazlar 5'→3' doğrultusu şeklinde yazılmaktadır. DNA ve RNA dizilerinin biyoinformatik programları

ile okunabilmesi için standart bazı formatlar oluşturulmuştur. Bunlardan en çok kullanılanı FASTA formatıdır. FASTA formatında birinci satır ">" sembolüyle başlayan bir başlık içerir, sonraki satırlarda DNA dizisi yer almaktadır. Fasta formatı biyoinformatiğin her alanında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Veri tabanları genelde sekans bilgilerini FASTA olarak sunmaktadır. Yine veri tabanlarında sekans üzerinde bir işlem yapmak istenirse FASTA formatında veri girilmesi gerekmektedir. Aşağıda bir FASTA formatı örneği mevcuttur;

```
>BTBSCRYC
```

```
tgcaaagcgctttaagtgaagccttatattcggcgtaatgaacaaataaccccggttaaaggcaataaatagtgaagcct  
tatattcggcgtaatgaacatgcgctttaagtgaagccttatattcggcgtaatgaacaaataaccccggttaaaggcaat  
aaatagtgaagccttatattcggcgtaatgctaaataggcaataaatagtgaaggccttatattcggcgtaatgaacaaataa  
cccggttaaaggcaataaatagtgaagccttatattcggcgtaatgctaaataggca
```

DNA dizisi incelenecek olan genin seçilmesi gereklidir. Gen seçildikten sonra bu genin aranacağı veri tabanı belirlenmektedir. Moleküler biyolojide aramaların çoğu ABD kökenli Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI)'nin veri tabanı üzerinden gerçekleştirilmektedir. Bu merkezin resmi web sitesi adresi "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>"dır. Siteye girildiğinde sayfanın sağında "Popular Resources (Popüler Kaynaklar)" başlığı altındaki "Nucleotide (Nükleotit)" linkinden araştırılacak gen ile ilgili veri tabanına girilebilir. Bu veri tabanı kullanılarak seçilmek istenen genin nükleotit dizisi öğrenilebilir. Ancak, aranan gen yalnızca bir organizmaya has değilse arama sonuçları çok fazla çıkacaktır. Bu nedenle, gelişmiş (advanced) arama alanında genin hangi organizmadan olduğunun belirtilmesi gerekmektedir. Bunun sebebi aynı genin başka organizmalarda farklı dizilime sahip olabilme ihtimalidir. Bundan dolayı baz dizisi araştırılacak olan gen veya gen bölgesinin analiz edilmesi sırasında ilgili organizmadan da bahsedilmelidir.

Listedeki her bir arama sonucunun aşağısında FASTA, GenBank, Graphics ve Related Sequences linkleri bulunmaktadır. Aranan genin nükleotit dizisini almak için buradaki FASTA linki kullanılmaktadır. FASTA bağlantısı kullanıldığında, ilgili genin FASTA formatında nükleotit dizisi görülecektir. Buradan görüldüğü gibi elde edilen dizi

formatı “>” karakteri ile başlamaktadır ve sonrasında gen “ID” numarası, genin adı ve genin kromozom numarası bilgileri ve bu bilgilerden sonra ise nükleotit dizisi görülmektedir.

NGS dizileme ile elde edilen geniş DNA bölgelerinin veya tüm ekzom çıktıların hatta tüm genom çıktıların biyoinformatik analizleri oldukça karmaşık bir süreçtir . Örneğin, insan genomunun protein kodlayan ve %1’lik kısmını oluşturan ekzom dizilemesi sonucunda yaklaşık 20.000 varyant elde edilmektedir. Bu kadar varyanttan hastalık etmeni olan mutasyonu bulmak zor bir süreçtir. Bu noktada ailenin detaylı klinik bilgisine sahip olmak çok önemlidir. Etkin bir biyoinformatik filtreleme için temelde varyantın popülasyon frekansı düşük olanlarının seçilmesi ile varyant sayısı azaltılabilmektedir ve sonrasında kalıtım paterni ve fenotipik bulguların eklenmesi ile hastalık etmeni olan mutasyona ulaşılabilir. Analiz sonucu klinik tanı ile ilişkili ancak literatürde daha önceden hiç bildirilmemiş yeni varyantlar tespit edilebilmektedir. Bu varyantların değerlendirilebilmesi ve sınıflandırılabilmesi için dünya üzerinde pek çok klinik raporun dayanağı olan American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) kılavuzu kriterlerine göre mutasyon skorlamasından bahsetmemiz gerekmektedir. Bu skorlama sonucunda varyasyonlar patojen (class1), muhtemel patojen (class2), patojenitesi bilinmeyen (class3), muhtemel patojenik değil (class4) ve patojenik değil (class5) olarak 5 gruba ayrılmıştır. Tüm bunları gerçekleştirirken varyasyonların dökümü, tespit edilen varyasyonların DNA içinde bulunduğu bölge (ekzon/intron), in silico parametrelere göre protein zincirinde değişime yol açıp açmadığı, frekansı, birden farklı veri tabanlarında ne şekilde sınıflandırıldığı ve nihayet önceki literatür bilgilerine göre ne şekilde klasifiye edildiği gibi çeşitli filtrelemelere tabi tutulur. Tüm bunlar oldukça uzun ve karmaşık işlemler bütünüdür (Fortuno vd. 2018).

2.9 CAST (Kalpastatin) Geni

Evcilleştirilmiş sığır olarak değerlendirilen ve iki temel grup olan *Bos taurus* (Avrupa) ve *Bos indicus* (Hindistan ve Afrika); orijinal yaban sığırları, yaban öküzü veya Avrupa

bizonu olan *B. Primigenius* soyundan gelmektedir (Lawrie ve Ledward 2006). 29. ve 7. sığır kromozomlarında lokalize olan μ -kalpain (CAPN1) ve kalpastatin (CAST)'ı kodlayan genler, hayvan yetiştiriciliğinde et gevrekliği için güçlü ve fonksiyonel adaylar olarak gözönünde bulundurulmaktadır (Curi vd. 2009).

Tezde çalışılan CAST geni; *Bos taurus* (sığır)'da tanımlanmış olup ve 7. kromozomda lokalizedir. Bu transkript 31 ekzonludur. CAST geni tarafından kodlanan bir protein olan kalpastatinin spesifik inhibitörü olan kalpain enziminin üretimindeki bozukluklar et sertliğine neden olmaktadır. Bir başka deyişle, kalpastatin (CAST) genindeki polimorfizmlerin et gevrekliği üzerine önemli rol oynadığı belirtilmekle birlikte, bu gen üzerindeki polimorfizmlerin tayini et gevrekliğini belirlemede bir markır olarak kullanılabilmesi açısından da önem arz etmektedir.

2.9.1 Kalpastatin geninin moleküler yapısı

CAST genine ait burada verilen künye bilgileri 14 Haziran 2019 tarihi itibarıyla yenilenmiş olan NCBI web sayfasından elde edilmiştir (Anonymous. 2018b).

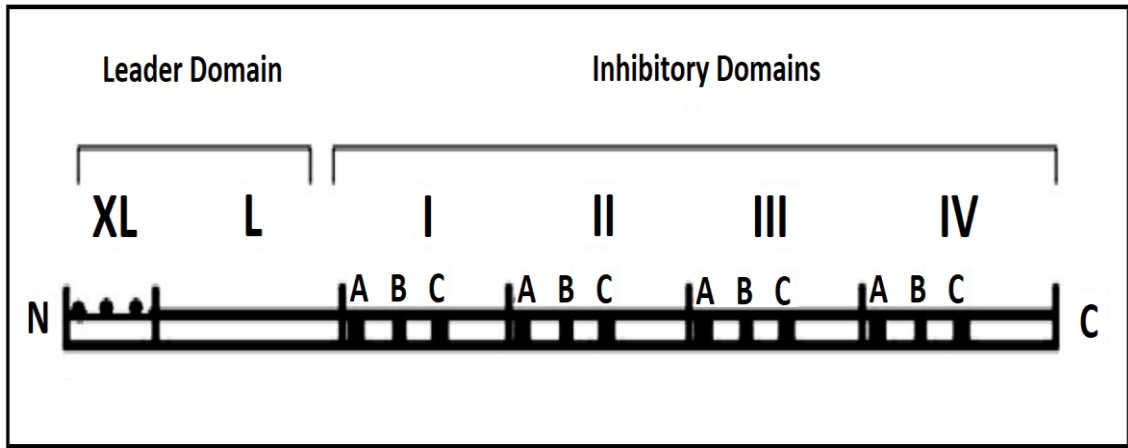
Gen ID numarası	: 281039
Resmi Sembol	: CAST (VGNC tarafından verilmiştir)
Resmi gen adı	: Calpastatin (VGNC tarafından verilmiştir)
Kaynak	: VGNC:VGNC:26790
BGD	: (Bovine Genom Database: BT19504)
Ensembl	: ENSBTAG00000000874
Gen tipi	: Protein kodlayıcı gen
RefSeq durumu	: Kesinleştirilmemiş
Organizma	: <i>Bos taurus</i>
Benzer gen	: İnsan, Mouse ve diğer
Lokalizasyon	: 7. kromozom

2.9.2 Kalpastatin gen ekspresyonu

CAST geni tarafından kodlanan endojen bir protein olan kalpastatin, memeli dokularında bulunan ve kalsiyuma bağımlı doğal bir proteaz olan μ -kalpain enziminin spesifik bir inhibitörüdür (Bhat vd. 2018). Kalpastatin (CAST) geni kalpain aktivitesinin regülasyonu üzerinden postmortem kas degradasyonuna etki etmektedir.

Bu gendeki polimorfizm ve varyasyonlar etin rengi, pH'sı, su tutma kapasitesi ve tekstürel özelliklerini etkilemektedir (Ropka-Molik vd. 2014).

Kalpastatin proteini Şekil 2.11'de görüldüğü gibi XL ve L olmak üzere iki ayrı subdomaini içeren “N terminal Leader Domaini” ve her birinde A, B ve C alt domain inhibitör tekrarlarından oluşan “C Terminal İnhibitör Domaininden” oluşmaktadır (Aali vd. 2014).



Şekil 2.11 Kalpastatin polipeptit domainlerinin yapısı (Aali vd. 2014).

2.10 Et Gevrekliği Üzerine Etki Eden Diğer Genler

Kesim sonrası periyotta kaslarda karmaşık fizyolojik değişiklikler gerçekleşir. Kalpain/kalpastatin sistemi, karkasın kesim sonrası depolanması süreci ve buzdolabı sıcaklığında kesilen etin miyofibrillar anahtar proetinlerin proteolizine aracılık eden kalsiyuma bağlı endogenaz bir proteinaz sistemidir. BTA29 ile eşlenmiş olan kalpain geni, et gevrekliği ile yakından ilgili olan miyofibrillar proteinlerin parçalanmasından sorumludur. BTA7 ile eşleşen kalpastatin (CAST) geni ise, μ -kalpain ve m-kalpain aktivitesini inhibe eder ve böylece post mortem proteolizi düzenler. Biyolojik olarak kesim sonrası artan CAST aktivitesi et gevrekliğini azaltıcı etkiye sahiptir (Lee vd. 2014a).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Et örneklerinin toplanması

Kalpastatin (CAST) geni üzerindeki polimorfizmlerin tayini ve et tekstürünün incelenmesi amacıyla 52 adet Brangus ve 52 adet Simmental ırk sığırlardan elde edilen kas dokusundan alınan örnekler kullanılmıştır. 52 adet Brangus sığır ırkı Et Süt Kurumu Sakarya Et Kombinasi'ndan ve 52 adet Simmental sığır ırkı ise Et Süt Kurumu Ankara Sincan Et Kombinasi'ndan temin edilmiştir. Hayvanlar ortalama 16 aylık ve en az 450 kg olan erkek sığırlardır.

3.1.2 Et örneklerinin sınıflandırılması ve analizler için hazırlanması

Et gevrekliğine ait genetik ve tekstürel özellikleri saptamak için mezbahada kesilen hayvanların karkaslarının *Longissimus dorsi* kasından örnekler temin edilmiştir. Her bir hayvandan duyuşal analiz ve enstrümental tekstür için ikişer adet 2.50 cm kalınlığında ve ortalama 250 g ağırlığında alınan et örnekleri soğuk depoda 4°C'de 48 saat süreyle bekletilmiştir. Soğutulan etler soğuk zincir kırılmadan Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Et Laboratuvarında 4 gün süreyle 4°C'de muhafaza edildikten sonra -20°C'de depolanmıştır. Ayrıca, tezin genetik analiz çalışmaları için her iki ırka ait her bir hayvandan tedarik edilen ortalama 250'şer gramlık et örneklerinden bistüriyle 1x1x1 cm³ parçalar alınmıştır. Örnekler eppendorf tüplerde etiketlenerek -20°C'de analize almak üzere bekletilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 DNA testi için et örneklerin hazırlanması ve DNA izolasyonu

Her iki ırka ait kas dokudaki kalpastatin (CAST) geninde olası polimorfizmlerin yeni nesil sekanslama ile tespiti amaçlanmıştır. Bunun için 1x1x1 cm³ büyüklüğündeki 104

et örneğine ait kas dokudan izole edilen DNA (Deoksiribonükleik Asit) örneklerinin konsantrasyonları ölçölüp arşivlenmiştir. Her bir hayvana ait örnek üzerinde çalışma yapılarak elde edilen polimorfizm farklılıkları ortaya konulmuştur.

Hücresinin çekirdeğindeki DNA'ya ulaşmak için hücre duvarının parçalanması gerekmektedir. Parçalama, fiziksel ve kimyasal yollarla yapılabilmektedir. Fiziksel olarak ısıtılan hücreler aynı zamanda kimyasal karışımlarla muamele edilerek hücre duvarının parçalanması sağlanmıştır. DNA izolasyonu, QIAGEN QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50) protokolüne göre yapılmıştır.

Aşamalar sırası ile aşağıdaki gibidir:

- 1.5 ml'lik her biri numaralandırılmış eppendorf tüpte muhafaza edilen, kesiti alınmış olan doku örneklerinin bistüri ile kazınarak fiziksel parçalanması sağlanmış ve kısa örnek bilgilerinin not edildiği 1.5ml'lik tüplere aktarılmıştır.
- Doku örneklerinin aktarıldığı tüplere 1ml ksilen eklenerek vortekslendikten sonra yüksek hızda santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında pelleti almadan süpernatant kısım çekilerek atılmıştır. Süpernatanttan uzaklaştırılmış pelletin üzerine 1ml %100 Etanol (EtOH) eklenmiş ve vorteks ile yüksek hızda karıştırılmıştır.
- Süpernatanttan uzaklaştırılmış pelletten kalan etanolün uzaklaştırılması için de ısı bloğunda 37°C'de 10 dk kurumaya bırakılmıştır.
- Isı bloğundan alınan tüpe hücre zarını yıkmak için 80µl ATL eklenmiş ve ardından da proteinleri uzaklaştırmak için 20µl proteinaz K eklenip düşük hızda vorteks ile karıştırılmıştır.
- 56°C'de 2 saat süresince 20 dk aralıklarla vorteks ile karıştırıldıktan sonra tüpler, ısı bloğunda 90°C'de 1 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
- Hücresel düzeyde parçalanmayı sağlamak için 200 µl AL buffer eklenmiş ve sonra liziz amaçlı bufferlerin etkisini durdurmak için 200 µl %100 EtOH eklenip vorteks ile karıştırılmıştır.
- Vorteks ile karıştırılan tüpten pelleti almadan sadece süpernatant kısım çekilerek kısa örnek bilgilerinin olduğu spin kolona aktarılmıştır.

- Santrifüjden sonra toplama tüpleri boşaltılmış ve aynı toplama tüpündeki spin kolon üzerine, filtrede tutulan DNA dışı hücre kalıntılarını uzaklaştırmak için 500 µl AW1 buffer eklenmiştir.
- AW1 buffer eklenen spin kolonlar 8000 rpm’de 1dk 30 sn süreyle santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonunda toplama tüpleri boşaltılmış ve aynı toplama tüplerindeki spin kolon üzerine 500 µl AW2 buffer eklenmiştir.
- AW2 buffer eklenen spin kolonları 8000 rpm’de 1 dk 30 sn süreyle santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında spin kolonları, izole edilecek olan DNA’yı muhafaza etmek için ayrıntılı örnek bilgilerinin olduğu yeni 1.5ml’lik tüplere aktarılmıştır.
- Spin kolonların üzerine 75 µl ATE buffer eklenip oda sıcaklığında 1dk süre ile inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyondan sonra spin kolonları DNA’yı muhafaza edecek 1.5ml’lik tüp ile birlikte 14000 rpm’de 1 dk 30 sn santrifüj edilmiştir.
- İzole edilen DNA örneğinin konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop ile ölçülmüştür.
- Ölçüm sonrasında DNA örneği, -20°C’de muhafaza edilmek üzere örnek numarasına göre saklanmıştır.

3.2.2 DNA ölçümü ve PCR uygulamaları

DNA doku örneklerinin 260/280 nm dalga boyundaki saflık düzeyleri ve nanogram ölçüsünde olan doku DNA izolasyon konsantrasyonları Spektrofotometrik NanoDrop cihazı ile belirlenmiştir.

3.2.3 Spektrofotometre ile DNA konsantrasyon ve saflığının ölçümü

Spektrofotometrede ölçüm yapabilmek için ilk olarak cihazın orta kısmına DNA’nın çözüldüğü solüsyondan 2 µl konulmuş, daha sonra ekrandaki blank tuşuna basılmış ve çalışılan DNA örneklerinin sırasıyla ölçümleri yapılmıştır. Bu prosesle Brangus ve Simmental sığır et örneklerinden izole edilen DNA moleküllerinin Spektrofotometrik

NanoDrop cihazı ile elde edilen saflık ve konsantrasyonlarının ölçüm değerleri tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde şu kriterler baz alınmıştır:

DNA saflığını belirlemede; 260/280 nm'deki sonucuna bakılmıştır.

Saf bir DNA , 260/280= 1.8-2.0 arasında olmalıdır.

260/280 > 2.0 ise; ortamdaki RNA (Ribonükleik Asit) kontaminasyonunu,

260/280<1.8 ise; ortamdaki protein kontaminasyonunu ifade eder.

İzole edilen ve konsantrasyon/pürifikasyon ölçümleri yapılan DNA örnekleri daha sonra PCR (Polymerase Chain Reaction - Polimeraz Zincir Reaksiyonu) amplifikasyonu yapmak üzere kayıt altına alınarak -20°C'de saklanmıştır. Koşum sonrası cihazda aşağıda açılım ve açıklamaları olan VCF (Variant Call Format), FASTQ ve BAM (Binary Alignment Map) olmak üzere 3 tip veri elde edilmesi işlemleri gerçekleştirilmiştir:

1. VCF dosyalarının variant studio (basespace.illumina.com/lab) programı ile analizi,
2. Elde edilen sonuçların FASTQ dosyasından Nextgene (softgenetics) analiz programı ile konfirme edilmesi,
3. BAM dosyaları kullanılarak her gendeki farklı bölgelerin kapsamının kontrol edilmesi ve zayıf amplifikasyon bölgelerinin tespit edilmesi.

Bulunan polimorfizmler HGMD (Human Genome Mutation Database) veri bankasında taranarak adlandırılmış ve yeni bulunan değişimlerin etkisini ortaya koyan SIFT ve POLYPHEN gibi biyoinformatik “in silico” programlarla tayini gerçekleştirilmiştir.

3.2.4 Yeni nesil dizi analizi (NGS) öncesi hazırlıklar

Her iki ırka ait hayvanlardan kesimden sonra alınan kas dokusundan izole edilen DNA örnekleri üzerinde çalışma yapılarak elde edilen polimorfizm farklılıkları ortaya konulmuştur. Kalpastatin geninde mutasyon taraması, adaptörlü primer dizayn edilerek Yeni Nesil Dizileme Analizi (Next Generation Sequencing-NGS) ile yapılmıştır.

Kütüphane hazırlığında Nextera V2 kit (Illumina, California) kullanılmıştır. Kütüphane hazırlığından sonra analiz aşamaları aşağıdaki gibi uygulanmıştır.

3.2.4.1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Çalışma kapsamında varyasyonların saptanması ve verilerin çoğaltılması için tüm gen taraması yapılmış, kalpastatin (CAST) geni bölgesine ait biyoinformatik programların işaret edeceği tüm değişimler ortaya konulmuştur. Günümüz genetik testlerinden en güncel yöntem olan Yeni Nesil Dizileme ile tüm genin etkin biçimde taraması yapılarak, polimorfizm farklılıkları tespit edilmiştir. Yeni Nesil Dizileme için PCR yöntemi ile hedef bölgelerin çoğaltılması amacıyla PCR amplifikasyonu yapılmıştır. PCR; bir DNA zincirinin bilinen iki parçası arasında uzanan özel DNA bölümünün enzimatik olarak çoğaltıldığı in-vitro bir tekniktir. Önceden belirli bir genin sadece küçük bir parçası elde edilebilirken, günümüzde PCR kullanılarak birkaç saat içinde tek bir gen kopyasından milyonlarca kopya çoğaltılabilmektedir.

- Oligomer firma adıyla temin edilmiş olan çizelge 3.1'deki stok CAST primerleri; 1-31 ekzonlu ve liyofilize haldedir, işlem aşamasında sulandırılarak kullanıma hazır halde -20°C'de muhafaza edilebilmektedir. Multiplex PCR ile daha az zamanda daha çok hedef bölge amplifikasyonu gerçekleştirileceği için bu primerlerden her birinde 10 tane ekzon olan 3 tane multipleks oluşturulmuş ve PCR kurulmuştur.

Çizelge 3.1 CAST primerleri (1-31 ekzonlu)

PRİMER ADI	PRİMER SEKANSI	PRİMER ADI	PRİMER SEKANSI
CASTex1-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG GCCCTCGCTCCCTCCCAG	CASTex1-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA G CCGGTCACCTGCCAGAG
CASTex2-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG CCTATGTCAATGGAGAATTATTAACAGTTC	CASTex2-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA G GGAGATATTGCTACCTCATTATTTATTTTCAT
CASTex3-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG TGCGGTTGACCACACTGTTAAG	CASTex3-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA G TGCCCAGAAATGATACTTTGTTCCA
CASTex4-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG TCAGCCACGATTGAGTGACTAAC	CASTex4-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA G AATCCTGTATAAGTATATAGATGGTGTGTTGAG
CASTex5-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG TGTTAATTCGTGTTGCTTACTTGACT	CASTex5-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA G AGCGTTACAGAAGATGGTGAAC
CASTex6-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG AAAGCATAATAATCTTAACCTCACAACACT	CASTex6-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA G AGCTATTCATTATTATTTCAAAGAATCCCA
CASTex7-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG AACCAGACACCAACAGCCATT	CASTex7-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA G AATAACTGCCATTCTAGGTAGGACTT
CASTex8-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG AAGTGTTATGAATTGCTTTCTACTCCTC	CASTex8-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA G TCATCTGTCTGCTTTATTTACCTTTGG
CASTex9-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG GCTAGTGACCATTTCCCTACAAGAT	CASTex9-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA GGACGCACGCTCCTCTTCATC
CASTex10-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG TATCATTGTTATTATTACTTCTGCTGTTCTG	CASTex10-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA G TTAAGCTAACCTCACCTCATATTGTT

Çizelge 3.1 CAST primerleri (1-31 ekzonlu) (devam)

PRİMER ADI	PRİMER SEKANSI	PRİMER ADI	PRİMER SEKANSI
CASTex11-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG AAGTGAAGGATGTGCAGCAAGTA	CASTex11-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G GCTACCACGGACGCTAACAG
CASTex12-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG ACTGCTGGCTTCTTAATGATTTGTAT	CASTex12-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G CCATCCAATCTGTAACACTCTGAC
CASTex13-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG ACACGACTGAGCGACTGAACT	CASTex13-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G CCCACCCTCTTCCTTTGAATAGATG
CASTex14-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG AATCTGTTCTGTCACTTAAATGGTTCC	CASTex14-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G AGCCTACACATCGCAACTAGAGA
CASTex15-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG TATGTTTCCTTCATCTGCCAGTCAA	CASTex15-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G GAGGTCTACGGGTATAATGCACTATT
CASTex16-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG GCCACAGCTCATTCTAGAGATT	CASTex16-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G TATGTTGGGCATTAGTTTCGTAACC
CASTex17-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG TTCCTCCACCTCCAGTCTCC	CASTex17-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G TTCAGGGTTTCCAGAGTTGTTATCT
CASTex18-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG AATACAACTCACTCAAACATATCAGAAA	CASTex18-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G TTCTCCTTAATACTAGGCTGGCATAT
CASTex19-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG ATTCATTACTTGTTGTGTGACATTTATCT	CASTex19-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G AATACGTTTGGTCCTGGCATT
CASTex20-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG CCGTATTGTTGGTTCATTGTTGTC	CASTex20-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G GTAATACATTGGTAATACAGGAGGAAGG

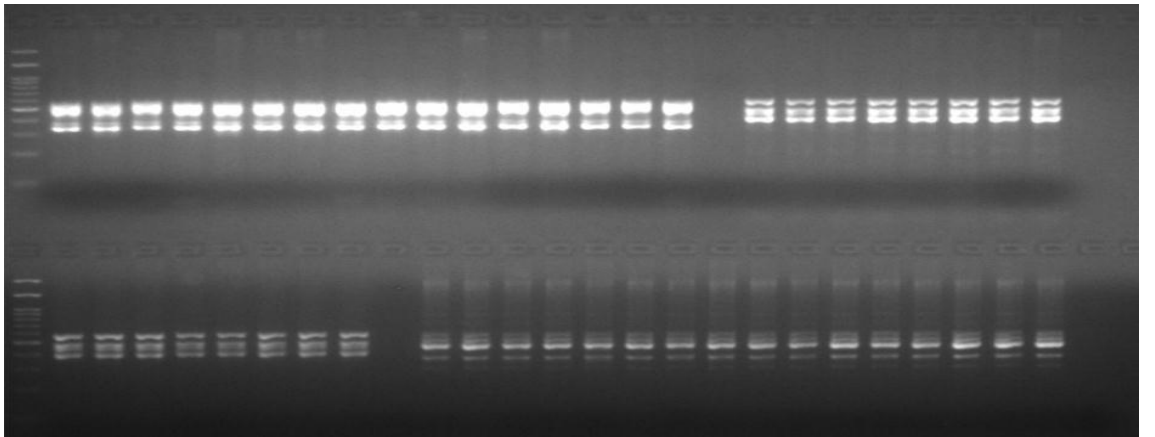
Çizelge 3.1 CAST primerleri (1-31 ekzonlu) (devam)

PRİMER ADI	PRİMER SEKANSI	PRİMER ADI	PRİMER SEKANSI
CASTex21-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG TCTGAGTTGTTTCGTTGTAGTCTCTT	CASTex21-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G CGCTCGCTCTGCTTCACTT
CASTex22-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG TTATCAGAGAACGAGGTACTAACACT	CASTex22-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G TGCTAACAGGATGTGAGTTAAGTAATAC
CASTex23-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG ATCATCAGCTATAACCTATCAACCTCT	CASTex23-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G TCTGCCCTTCCTAAATTAACCATCA
CASTex24-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG CGAGGTAGCGTTTGCTGACA	CASTex24-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G CACTGGCTCTATTAGTTACACTGTTG
CASTex25-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG TGCTGTGTTGCTGTGCTTCC	CASTex25-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G CCTATCTTGCCAGTCTTACCTCTTC
CASTex26-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG CTAAGGTGGCTAACCAGTGAATAAT	CASTex26-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G TCTCTGTTCGTTTCCAAGGCAAA
CASTex27-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG TCTGTTGACATTGTTGCTCTAAGTTAC	CASTex27-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G GAGTATAGATCCAACCTGGACACC
CASTex28-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG ACTGGATAAAGATCATGTAAATACTGACTTA	CASTex28-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G GCACAAGGTAGGCATTCACTGA
CASTex28-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG CTCAGCACCTTGTATAACAGAGTG	CASTex28-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G AAGTTTCCTAGGGCATTAAATCAGTTTA
CASTex30-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG AGTTAATTGCTAGATGGAGTGTTGAC	CASTex30-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G TGGAGAAGGAAATGGCAACCC
CASTex31-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGACAG GGGAAGAATTCAAGTGTTTGGACTAAA	CASTex31-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACA G AGATTTCAGTGTCCTTTTCATTGC

- PCR miksinde kullanılan PCR kiti QIAGEN MULTIPLEX KIT (1000) ile uygulanan PCR testinin her pleksi için 8.5 µl DNA örneği kısa örnek bilgilerinin not edildiği 0.2 ml'lik plate kuyularına konulmuştur. Üzerlerine DNA'ların ısı etkisiyle uçmasını engellemek için 2'şer damla mineral (Qiagen Top Elute Fluid 60 ml) yağ eklenmiş ve plate kuyularındaki DNA'ların denatürasyonu için BIO-RAD T100 Thermal Cycler termal döngü cihazında 98 °C'de 10 dk süre bekletilmiştir.
- Bu aşamada DNA ipliklerinin ikiye ayrılarak primerlerin kolayca bağlanması sağlanmıştır. Plateler denatüre DNA'yı sabitlemek için -20°C'de 5 dk süre ile bekletilmiştir.
- Uygulanan testte 4 multipleks primer çalışılmış olup, multipleks sayısına ve taslaktaki miktarına göre hazırlanan karışım tüplerine her örnek için 25 µl Qmix koyulmuştur. Üzerine 10 µl Qsolution ve 5 µl d H₂O eklenmiştir.
- Her 4 multipleks için hazırlanan karışım tüplerine her örnek için 5 µl Multipleks primer eklenmiş ve vorteks ile karıştırılmıştır.
- Denatürasyon aşamasından sonra DNA örneği bulunan plate kuyularına her multipleks için ayrı hazırlanan PCR karışımından 45 µl eklenmiştir.
- Kuyularına PCR karışımı eklenen plate, termal döngü cihazına yerleştirilmiş ve aşağıdaki program çalıştırılmıştır. Bu aşamada DNA ipliklerinin ikiye ayrılarak bu sayede primerlerin kolayca bağlanması sağlanmıştır. Denatürasyon, primer (öncü) birleşmesi ve primer uzaması, PCR metodunda 1 döngüyü oluşturur. Denatürasyon aşamasından sonra DNA örneği bulunan plate kuyularına her multipleks için ayrı hazırlanan PCR karışımından eklenen plate, termal döngü cihazına yerleştirilerek aşağıda detayları verilen 30 döngü prosesine ayarlanarak güvenli bekleme aşaması oluşturulmuştur.

95 °C	15 dk	}	30 döngü
94 °C	30 sn		
60 °C	30 sn		
55 °C	30 sn		
55 °C	30 sn		
50 °C	30 sn		
72 °C	1 dk		
72 °C	10 dk		
4 °C	∞		

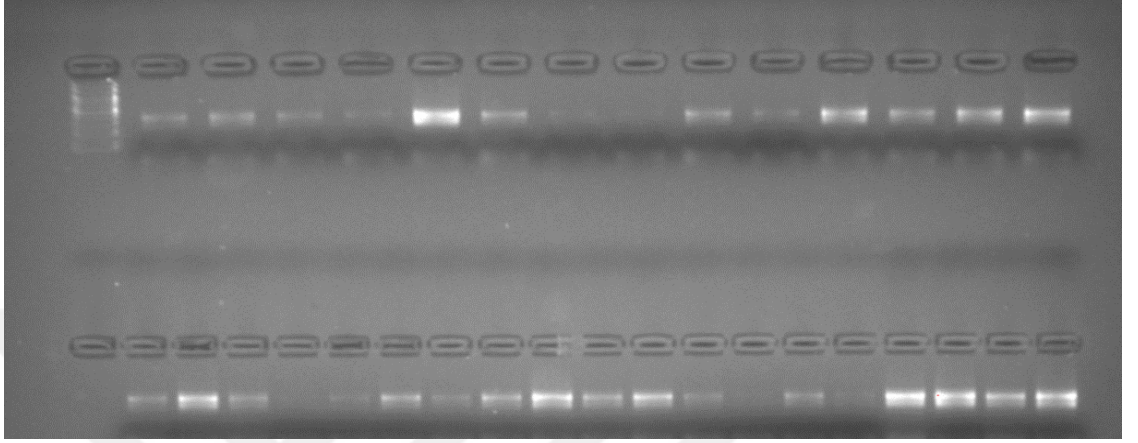
- 31 ekzonun yer aldığı PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek elde edilen DNA fragmanları açıkça tanımlanmış bant olarak görülebilmektedir.
- CAST geninin 31 ekzonu ve ekzon-intron bağlantılarını içeren bölgeleri kapsayacak şekilde dizayn edilen 4 ayrı adaptörlü primer çifti kullanılarak multipleks PCR yapılmış ve hedef bölgeler çoğaltılmıştır.
- PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir (Şekil 3.1). Brangus ve Simmental ırlarına ait jel elektroforez görüntüleri sırasıyla şekil 3.2 ve şekil 3.3'te verilmiştir.



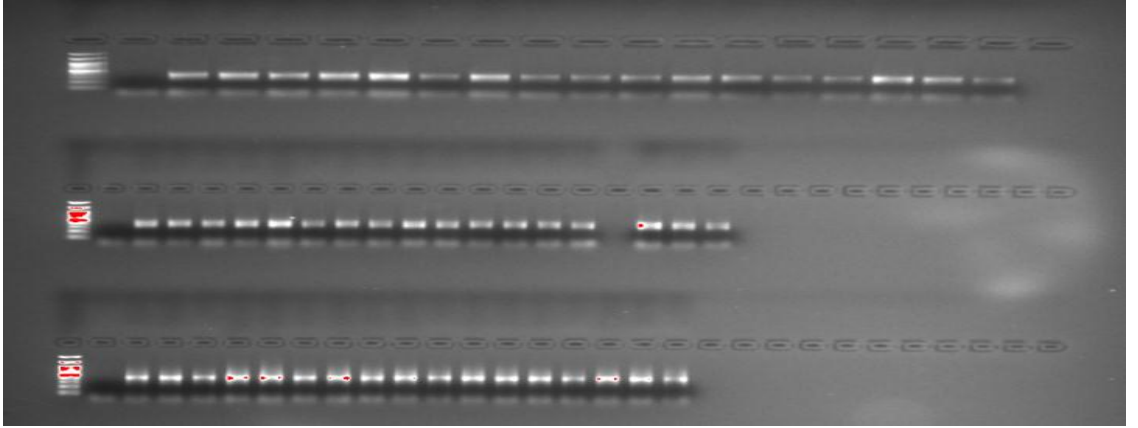
Şekil 3.1 NGS öncesi PCR ürünlerinin jel elektroforezle kontrolü

3.2.4.2 ExoSAP bilgilerinin pürifikasyonu

- Kısa örnek bilgilerinin not edildiği 0.2 ml'lik plate kuyularına her multipleks için 5 µl ExoSap konulmuştur.



Şekil 3.2 Brangus sığır ırkına ait CAST geni multipleks 1-33 örnek jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 3.3 Simmental sığır ırkına ait CAST geni multipleks 1-52 örnek jel elektroforezi görüntüsü

- ExoSap koyulan kuyulara aynı örneğin farklı multipleksler ile hazırlanan PCR ürünlerinden 5'er µl eklenmiş ve plate termal döngü cihazına yerleştirilerek PCR cihazında aşağıdaki süre ve ısılarda program çalıştırılmıştır.

37°C'de	30 dk
95°C'de	5 dk
4°C'de	bekletme

- ExoSap pürifikasyonu sonrasında 12 örnekten 5-6'sı rastgele seçilmiş ve konsantrasyonu 10 µl kullanılarak Qubit ile ölçülmüştür.
- Qubit ölçümlerinin ortalaması alınarak tüm PCR ürünleri 0.5 ng/µl olacak şekilde dH₂O ile seyreltilmiştir.

3.2.4.3 İndeks primer amplifikasyonu

- Her örnek için uygun İndeks Primer kombinasyonu belirlenmiş ve "Illumine Experiment Manager"a kaydedilmiştir.
- İndeks 1 (yatay-turuncu kapak i7) ve indeks 2 (dikey beyaz kapak i5) primerleri - 20°C'den oda sıcaklığına çıkarılmıştır.
- İndeks tüpleri çözüldükten sonra vorteks ile homojenize edilmiştir.
- İndeks Primer PCR'ı için örnek bilgilerinin yer aldığı yeni 0.2 ml'lik plate üzerindeki kuyulara her örnek için belirlenmiş indeks 2 primerlerinden 5 µl ölçüsünde konulmuştur.
- İndeks 2 primeri konulmuş olan kuyuların üzerine her örnek için belirlenmiş indeks 1 (i7) primerinden 5 µl eklenmiştir.
- İndeks primerleri eklenen kuyulara önceki adımda 0.5 ng/µl olacak şekilde seyreltilmiş PCR ürünlerinden 2.5 µl eklenmiştir.
- PCR ürünü eklenen tüplere ya da kuyulara 22.5 µl RGI karışımı eklenmiş ve pipetle karıştırılmıştır.
- Tüpler termal döngü cihazına yerleştirilmiş ve aşağıdaki program çalıştırılmıştır. (50 dakika)

95°C	2 dk	} 10 döngü
95°C	30 sn	
55°C	40 sn	
72°C	40 sn	
72°C	5 dk	
4°C	∞	

- Adaptörlü primerler ile çoğaltılan DNA örnekleri sırasıyla pürifikasyon, kütüphane hazırlığı ve barkodlama işlemlerinden geçirilerek NGS cihazına (Miseq-Illumina USA) yüklenmiştir.

3.2.4.4 PCR clean-up

- AmPure XP boncukları +4 °C'den oda sıcaklığına çıkarılmış ve vorteks ile 30 sn yüksek hızda karıştırılmıştır.
- Her PCR ürünü için 400 µl olacak şekilde 15 ml'lik ya da 50 ml'lik tüplere taze %80 EtOH hazırlanmıştır.
- PCR'dan çıkan indeks platenin üzerine 35 ml AmPure XP beads (DNA'yı kendisine çeken manyetik boncuklar) eklenmiştir.
- İndeks PCR ürünleri eklenen plate, oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- Inkübasyon sonrasında plate manyetik standda 5 dk bekletilmiştir.
- Manyetik standda bekletilmiş olan örneklerde tüm AmPure XP boncuklarının kuyuların kenarlarına çekildiği gözlemlendikten sonra, AmPure XP boncuklarının pipetin ucuna gelmemesine dikkat edilerek supernatant çekilerek atılmıştır.
- Supernatanttan uzaklaştırılan kuyular plate manyetik standda iken 200 µl %80 EtOH eklenmiş ve 30 sn bekletilmiştir.
- Manyetik standda bekletilen örneklerde tüm AmPure XP boncuklarının kuyuların kenarlarına çekildiği gözlemlendikten sonra, AmPure XP boncuklarının pipetin ucuna gelmemesine dikkat edilerek supernatant çekilerek atılmış olur.

- Süpernatanttan uzaklaştırılan kuyulara plate manyetik standda iken 200 µl %80 EtOH eklenmiş ve 30 sn bekletilmiştir.
- Manyetik standda bekletilen örneklerde tüm AmPure XP boncuklarının kuyuların kenarlarına çekildiği gözlemlendikten sonra, AmPure XP boncuklarının pipetin ucuna gelmemesine dikkat edilerek süpernatant çekilerek atılmıştır.
- Süpernatanttan uzaklaştırılan kuyularda kalan EtOH'un tamamen uçması için plate 5 dk kurumaya bırakılmıştır.
- Plate kurduğunda manyetik standdan alınmış, her kuyuya 40 µl dH₂O, kurumuş AmPure XP boncukları çözülecek şekilde eklenmiş ve pipetleyerek karıştırılmıştır.
- Kuyulardaki örnekler yeterince karıştırıldıktan sonra plate manyetik standda 2 dk bekletilmiştir.
- Manyetik standda bekletilen örneklerde tüm AmPure XP boncuklarının kuyuların kenarlarına çekildiği gözlemlendikten sonra, AmPure XP boncuklarının pipetin ucuna gelmemesine dikkat edilerek 35 µl supernatant çekilerek örnek bilgilerinin not edildiği 0.2 ml'lik plate üzerindeki kuyulara aktarılmıştır.

3.2.4.5 Kütüphane birleştirme ve örnek yükleme

- Miseq Nanokit V2-500 cycles V2 kartuşu -20°C'den alınarak oda sıcaklığında çözündürülmüştür.
- Hybridizasyon Buffer (HT1) +4 °C'den oda sıcaklığına çıkarılmıştır.
- AmPure XP ile pürifiye edilmiş olan Brangus'a ait tüm örneklerden ve Simmental'e ait tüm örneklerden 10'ar µl alınarak 1.5 ml'lik iki ayrı tüpte pool (havuz) oluşturmak üzere birleştirilmiş her plate için ürünler ayrı tüpte birleştirilerek tüpler vorteks ile karıştırılmıştır.
- Birleştirilmiş olan örnek kütüphanelerinin konsantrasyonu 5 µl kullanılarak qubit ile ölçülmüştür.
- Qubit sonuçlarına göre birleştirilen örnek kütüphaneleri 2 nM olacak şekilde TE Buffer ile seyreltilmiştir.
- Seyreltme sonrasında farklı tüplerdeki örnek kütüphanelerinden 20 µl alınarak birleştirilmiştir.

- 195 µl qubit mix ve 5 µl ayrı ayrı kendi içinde birleştirilen örnek kütüphaneden alınarak karıştırılmıştır.
- 2 dk süreyle oda sıcaklığında bekletildikten sonra örnekler qubit ile ölçülmüştür.
- Denatürasyonun gerçekleştirilmesi amacıyla 990 µl dH₂O seyreltme tüpüne aktarılmıştır.
- dH₂O koyulmuş olan tüpe 10 µl 10 N NaOH eklenmiştir ve tüp vorteks kullanılarak karıştırılınca 0.1 N NaOH elde edildikten sonra 2 pool 10'ar µl alınarak tek poolda birleştirilmiştir.
- Tek tüpte birleştirilmiş olan örnek stoğundan 5 µl alınmış ve denatürasyonun gerçekleştirilmesi için 1.5 ml'lik tüplere aktarılmıştır.
- Örnek stoğu eklenmiş olan tüpe 5 µl 0.1 N NaOH eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra denatürasyon süreci için oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir.
- Denatürasyondan sonra tüpe 990 µl HT1 Buffer eklenmiştir.
- HT1 ile seyreltilmiş olan örnek kütüphanesinden 400 µl farklı bir 1.5 ml'lik tüpe konulmuştur.
- 200 µl HT1 Buffer, derişimi azaltılmış olan örnek kütüphanesinin konulduğu tüpe eklenmiştir.
- 570 µl örnek kütüphanesi bir başka 1.5 ml'lik tüpe eklenmiş ve 60 µl 10 pm (pikamol) PhiX (%10) de dahil edilerek düşük hızda vorteks kullanılarak karıştırılmıştır.
- 600 µl örnek kütüphanesi kartuş üzerindeki 17 numaralı kuyuya aktarılmıştır.

3.3 Duyusal Analiz

Çalışmada 52'şer adet Brangus ve Simmental sığır ırkının *Longissimus dorsi* kasına ait her biri yaklaşık 250 gram olan ve duyusal analiz için dondurulmuş 104 hayvandan et örneği her analiz gününde 4°C'de 24 saat süreyle çözdürülmüştür. Çözdürülen her bir hayvana ait iki parça et örneği kapaklı borcam kaplarda iç sıcaklığı 74°C'ye ulaşana kadar ortalama 1 saat süreyle elektrikli fırında (model: M4503; Bosch BSH A.Ş.)

pişirilmiştir. Aynı gün içinde bu iki ayrı et parçalarından birisi duyuusal analiz için, diğeri ise enstrümental tekstür ölçümü için ayrılmıştır.

3.4 Duyusal Analiz Öncesi Panelistlerin Eğitimi

Duyusal test sonuçlarının standardizasyonu için Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü akademik, idari personel ve lisansüstü öğrencilerden oluşan, yaş aralığı 22-48 olan 10 kişinin yer aldığı kadın ve erkek gönüllüler ile panelist grubu oluşturulmuştur. Panelistlere American Meat Science Association (AMSA) duyuusal analiz rehberindeki (Anonymous 2015) kriterlere göre sığır etinde lezzet ve gevreklik temel alınarak ortak değerlendirmeyi objektif olarak ölçülebilir kılmak için duyuusal analiz eğitimi verilmiştir. Bunun için ilk oturumda, gönüllü panelistlere tanımlayıcı ve duyuusal analizler hakkında bilgi verilmiştir. Daha sonra, temel tatları ayırt edebilmede ve farklı yoğunluklardaki tatları sıralama testlerinde başarı sağlayan 10 panelist seçilerek tanımlayıcı analiz konusunda deneyimsel eğitimler verilmiştir. Tanımlayıcı duyuusal analiz eğitimi her biri yaklaşık 1'er saatlik olmak üzere 3 farklı oturumda gerçekleştirilmiştir. Gevreklik, sululuk ve lezzet yoğunluğu özellikleri için referans gıdalar kullanılmıştır. Duyusal analizde "sertlik-gevreklik", "sululuk-kuruluk" ve "lezzetin zayıf ya da güçlü olma" durumunun değerlendirilmesinde 8'li kategori skalası kullanılmış, panelistlere algıladıkları özellik yoğunluklarını değerlendirmeleri istenmiştir. Rakamsal değer düzeyi arttıkça ete ait gevreklik, sululuk ve lezzet yoğunluğu artan bu skalada, sertlik, sululuk ve lezzet yoğunluğu özellikleri için tanımlanan puanlar aşağıdaki gibidir:

Sertlik: 1-Aşırı sert, 2-Çok sert, 3-Orta sert, 4-Hafif sert, 5-Hafif gevrek, 6-Orta gevrek, 7-Çok gevrek ve 8-Aşırı gevrek.

Sululuk: 1-Aşırı kuru, 2-Çok kuru, 3-Orta kuru, 4-Hafif kuru, 5-Hafif sulu, 6-Orta sulu, 7-Çok sulu ve 8-Aşırı sulu.

Lezzet yoğunluğu: 1-Aşırı zayıf, 2-Çok zayıf, 3-Orta zayıf, 4-Hafif zayıf, 5-Hafif güçlü, 6-Orta güçlü, 7-Çok güçlü ve 8-Aşırı güçlü.

Rastgele 3 haneli sayılarla kodlanmış olan farklı hayvanlara ait pişirilmiş et örnekleri panelistlere rastgele sırayla sunulmuştur. Değerlendirme esnasında bir önceki örnekten ağızda kalan tadı gidermek için içme suyu ve elma suyu içilmesi ve kraker yenilmesi bildirilmiştir.

Duyusal analizde kullanılan form EK 3'te sunulmuştur.

3.5 Enstrümental Tekstür

Çalışmada 52'şer adet Brangus ve Simmental sığır ırkının *Longissimus dorsi* kasından elde edilen toplam 104 sığır bifteğinde tekstür özelliğinin enstrümental olarak belirlenmesinde, TA.XT.PLUS Texture Analyser TPA cihazı (Stable Micro System, İngiltere) ve Exponent Stable Micro Systems Version:3.0.5. programı kullanılmıştır. Tekstür ölçümü için her bir örnek kodlanarak üçer paralel olmak üzere 1.5 cm kalınlığında ve 2.5 cm çapında kesilmiştir. Prob olarak P25 seçilmiştir. Ölçümlerde analiz koşulları ön test hızı 3 mm/saniye, test hızı 1 mm/saniye, test sonrası hızı 3 mm/saniye, uzaklık 3.0 mm, trigger kuvveti 0.05 N ve iki sıkıştırma arasındaki süre 5 saniye ve % 60 kompresyon olarak seçilmiştir. Örnek kalınlığının %60'ına penetre olana kadar aşağı yönde hareket eden prob, ilk konumuna dönmüş ve ikinci sıkıştırma döngüsüne başlamadan önce 5 saniye boyunca durmuştur. Kuvvet-zaman verilerinden sertlik (hardness) Newton (N) olarak hesaplanmıştır.

3.6 İstatistiksel Analizler

Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri parametrik/non parametrik testler ile yapılmıştır. Brangus ve Simmental sığır gruplarında NGS analizi ile belirlenen varyasyonların varlığı ve grup ilişkisi çapraz tablolar oluşturularak "Fisher Exact testi" ile incelenmiştir ($p < 0.05$). Farklı gruplarda polimorfizm durumuna göre duyusal analiz ve enstrümental tekstür (sertlik) ortalamaları ve bu ortalamalar arasındaki farkın önemi t testi ile saptanmıştır. Duyusal analiz, enstrümental tekstür ve genetik polimorfizm arasındaki ilişki ise Pearson Korelasyon testi ile belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 DNA Konsantrasyon ve Saflık Düzeyleri

Çalışmada kullanılan Brangus ve Simmental sığır ırklarına ait et doku örneklerinden izolasyonu ve jel kontrolü yapılan DNA'ların (Deoksiribonükleik Asit) nanogram ölçüsünde olan doku DNA izolasyon konsantrasyonları ve 260/280 nm dalga boyundaki saflık düzeyleri sonuçları sırasıyla çizelge 4.1 ve 4.2'de verilmiştir. Gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçümlerle DNA saflığı A260/A280 oranı ile saptanmıştır. Saf bir DNA 260/280 =1.8-2.0 arasında olmalıdır. Bu oranın 2.0'den büyük olması RNA (Ribonükleik Asit) kontaminasyonunu, 1.8'den küçük olması ise protein kontaminasyonunu ifade etmektedir. Çizelge 4.1 ve çizelge 4.2'de verilen DNA izolasyon konsantrasyon ve saflık düzeyi ölçümleri bu bağlamda değerlendirilmiştir.

Brangus ırkına ait 52 örnekte DNA konsantrasyonu en az olan örnek 21.3 ng ile 12 nolu Brangus ve en fazla olan örnek ise 73.1 ng ile 23 nolu Brangus'tur. Diğer doku örneklerindeki DNA konsantrasyonları bu değerler arasında değişim göstermiştir.

Simmental ırkına ait 52 örnekte ise, DNA konsantrasyonu en az olan örnek 15.1 ng ile 1 nolu Simmental ve en fazla olan örnek ise 221.1 ng ile 21 nolu Simmental'dir. Diğer doku örneklerindeki DNA konsantrasyonları bu değerler arasında değişim göstermiştir.

Çizelge 4.1 Brangus ırkına ait doku DNA izolasyon konsantrasyonu ve saflık düzeyi

Brangus Sığır Kodu	DNA Konsantrasyonu(nanogram)	DNA Saflık Düzeyi(260/280 nm)
B1	32.8	1.87
B2	31.4	1.93
B3	35.6	2.02
B4	54.3	2.02
B5	64.4	1.75
B6	43.3	2.02
B7	49.4	2.08
B8	36.2	2.01
B9	38.3	1.82
B10	33.1	1.70
B11	40.1	1.74
B12	21.3	1.88
B13	27.9	1.84
B14	36.0	1.72
B15	41.6	2.04
B16	45.3	1.79
B17	37.3	1.96
B18	35.7	1.93
B19	30.9	1.88
B20	49.6	1.91
B21	47.1	1.78
B22	33.3	1.81
B23	73.1	1.85
B24	33.6	1.77
B25	41.6	1.82
B26	52.5	2.01
B27	55.9	1.96
B28	39.4	1.84
B29	41.6	2.04
B30	46.9	1.69
B31	60.7	1.76
B32	25.6	1.68
B33	60.9	1.81
B34	36.0	2.09
B35	38.6	2.00
B36	50.2	1.79
B37	65.4	2.00
B38	40.5	1.84
B39	41.8	1.78
B40	42.2	2.09
B41	33.9	1.84
B42	22.8	1.77
B43	39.6	2.03
B44	57.4	2.08
B45	28.7	1.84
B46	32.9	2.09
B47	45.8	1.92
B48	28.6	1.91
B49	37.1	1.73
B50	39.9	2.06
B51	55.2	1.75
B52	31.5	1.82

Çizelge 4.2 Simmental ırkına ait doku DNA izolasyon konsantrasyonu ve saflık düzeyi

Simmental Sığır Kodu	DNA Konsantrasyonu(nanogram)	DNA Saflık Düzeyi(260/280 nm)
S1	15.1	2.06
S2	28.9	2.11
S3	23.1	2.06
S4	33.3	1.97
S5	17.9	2.05
S6	39.6	1.93
S7	47.9	2.02
S8	51.1	2.02
S9	68.2	2.00
S10	26.7	1.96
S11	63.1	2.00
S12	40.4	2.04
S13	21.8	2.08
S14	17.1	2.01
S15	69.1	2.02
S16	69.1	2.21
S17	85.2	2.03
S18	81.4	2.28
S19	64.1	1.66
S20	75.1	2.18
S21	221.1	1.98
S22	99.7	1.73
S23	91.0	2.01
S24	67.6	2.17
S25	61.7	2.43
S26	68.9	1.69
S27	42.6	2.38
S28	87.0	2.14
S29	87.3	2.10
S30	87.4	1.89
S31	79.6	2.41
S32	73.7	1.92
S33	73.7	2.01
S34	27.8	2.04
S35	30.9	2.05
S36	17.8	2.10
S37	24.8	2.06
S38	15.9	2.08
S39	63.0	2.08
S40	40.4	2.06
S41	23.5	2.14
S42	59.7	2.11
S43	17.8	2.16
S44	40.1	2.09
S45	47.7	2.01
S46	36.7	1.92
S47	52.9	1.80
S48	57.0	1.95
S49	59.4	2.06
S50	30.3	2.04
S51	34.5	2.09
S52	49.9	2.01

4.2 NGS Çıktılarının Klasifikasyonları

NGS (Yeni Nesil Dizileme- Next Generation Sequencing) analiz platformları çok yüksek miktarda ham veri çıktısı sağlamaktadır. Bunların sistematik olarak analiz edilmesi amacıyla uygun veri türlerine ve tablolara çevrilmesi gerekmektedir. NGS cihaz çıktıları FASTQ, BAM BAI (Binary Alignment Map) ve VCF (Variant Call Format) olmak üzere üç formatta alınabilmektedir (Soft genetics nextgene next generation sequencing software versiyon 2.4.2). Ham data (FASTQ) analizi için kullanılmaktadır. Bunun için öncelikle FASTQ formatındaki data FASTA formatına dönüştürülür. Sonrasında her bir örnek, sığır referans genomu ile karşılaştırılarak anotasyonu yapılır. Bu anlamda her bir örnek projelendirilerek analize alınır.

Brangus ve Simmental sığır ırklarına ait NGS analiz sonuçları çizelge 4.3 ve çizelge 4.4'te verilmiştir. NGS analizi sonucunda Brangus'a ait 52 örneğin 20'sinde (Çizelge 4.3) ve Simmental'e ait 52 örneğin 9'unda (Çizelge 4.4) herhangi bir varyasyon saptanmamıştır. Her iki grupta toplam 13 varyasyon tespit edilmiş olup, bu 13 varyasyon (çalışmada V1-V13 olarak kodlanmış olan) her iki sığır ırkını kapsayan 104 hayvanda rastgele dağılım göstermiştir. V3, V6, V10, V11 ve V12 olmak üzere 5 varyasyon sadece Brangus et örneklerinin 32'sinde ve V8, V9 ve V13 olmak üzere 3 varyasyon sadece Simmental et örneklerinin 43'ünde saptanmıştır. Hem Brangus hem de Simmental'de bulunan ortak varyasyonlar ise V1, V2, V4, V5 ve V7'dir.

Çizelge 4.3 Brangus sığır ırkına ait NGS (Yeni Nesil Dizileme) analiz sonuçları

Brangus	DNA	
Sığır	Konsantrasyonu	Nextgene Analiz Sonuçları
Kodu	(ng)	
B1	32.8	EKZON20c.1526T>C/p.V509A Heterozigot EKZON22c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice)
B2	31.4	EKZON 9c.583A>G/p.T195A Homozigot EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot EKZON 20c.1526T>C/p.V509A Homozigot EKZON 22c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice)
B3	35.6	NORMAL
B4	54.3	EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot EKZON20c.1526T>C/p.V509A Heterozigot EKZON22c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice)
B5	64.4	NORMAL
B6	43.3	EKZON 20c.1526T>C /p.V509A Heterozigot
B7	49.4	NORMAL
B8	36.2	NORMAL
B9	38.3	EKZON 8c.439C>G/p.L147LV Heterozigot EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Heterozigot
B10	33.1	NORMAL
B11	40.1	NORMAL
B12	21.3	NORMAL

Çizelge 4.3 Brangus sığır ırkına ait NGS (Yeni Nesil Dizileme) analiz sonuçları (devam)

Brangus Sığır Kodu	DNA Konsantrasyonu (ng)	Nextgene Analiz Sonuçları
B13	27.9	EKZON 9c.583A>G/p.T195A Heterozigot EKZON 20c.1526T>C /p.V509A Heterozigot
B14	36.0	EKZON 9c.583A>G/p.T195A Heterozigot EKZON 13c.895G>A/p.A299T HeterozigotEKZON 20c.1526T>C/p.V509A HeterozigotEKZON 22c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice)
B15	41.6	NORMAL
B16	45.3	EKZON 9c.583A>G/p.T195A Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot
B17	37.3	EKZON 20 c.1526T>C/p.V509A Heterozigot EKZON 22c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice) EKZON 20 c.1510C>T/p.P504S Heterozigot
B18	35.7	NORMAL
B19	30.9	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot
B20	49.6	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot
B21	47.1	EKZON 20 c.1526T>C/p.V509A Homozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Homozigot (splice)
B22	33.3	EKZON 9 c.583A>G/p.T195A Heterozigot EKZON 14c.934A>G/p.N312D Heterozigot
B23	73.1	NORMAL

Çizelge 4.3 Brangus sığır ırkına ait NGS (Yeni Nesil Dizileme) analiz sonuçları (devam)

Brangus Sığır Kodu	DNA Konsantrasyonu (ng)	Nextgene Analiz Sonuçları
B24	33.6	EKZON 9c.583A>G/p.T195A Heterozigot EKZON 14 c.934A>G/p.N312D Heterozigot
B25	41.6	EKZON 9c.583A>G/p.T195A Heterozigot EKZON 13c.895G>A/p.A299T Heterozigot EKZON 20c.1526T>C/p.V509A Heterozigot EKZON 22c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice)
B26	52.5	EKZON 8 c.439C>G/p.L147LV Heterozigot EKZON 13 c.895G>A/p.A299T Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C/p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice)
B27	55.9	NORMAL
B28	39.4	NORMAL
B29	41.6	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot
B30	46.9	NORMAL
B31	60.7	EKZON 9 c.583A>G/p.T195A Homozigot EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot EKZON 14 c.934A>G/p.N312D Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C/p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice) INTRON 22 c.1714-3C>CT Heterozigot

Çizelge 4.3 Brangus sığır ırkına ait NGS (Yeni Nesil Dizileme) analiz sonuçları (devam)

Brangus Sığır Kodu	DNA Konsantrasyonu (ng)	Nextgene Analiz Sonuçları
B32	25.6	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Homozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Homozigot (splice)
B33	60.9	EKZON9 c.583A>G/ p.T195A Heterozigot EKZON 9 c.616G>A/p.E206KHeterozigot EKZON20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON22c.1632A>G/p.E544EHeterozigot (splice)
B34	36.0	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Homozigot EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22c.1632A>G/p.E544EHeterozigot (splice)
B35	38.6	NORMAL
B36	50.2	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Heterozigot EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice)
B37	65.4	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Heterozigot EKZON 13 c.895G>A/p.A299T Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Homozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Homozigot (splice)

Çizelge 4.3 Brangus sığır ırkına ait NGS (Yeni Nesil Dizileme) analiz sonuçları (devam)

Brangus Sığır Kodu	DNA Konsantrasyonu (ng)	Nextgene Analiz Sonuçları
B38	40.5	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot
B39	41.8	EKZON20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON22c.1632A>G/p.E544EHeterozigot (splice)
B40	42.2	NORMAL
B41	33.9	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot
B42	22.8	INTRON 6 c.373-3C>CT Heterozigot
B43	39.6	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot
B44	57.4	NORMAL
B45	28.7	NORMAL
B46	32.9	EKZON9 c.583A>G/ p.T195A Heterozigot EKZON 14 c.934A>G/p.N312D Heterozigot
B47	45.8	EKZON13c.895G>A/p.A299T Heterozigot EKZON20c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON22c.1632A>G/p.E544EHeterozigot (splice)
B48	28.6	NORMAL
B49	37.1	NORMAL
B50	39.9	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot
B51	55.2	NORMAL
B52	31.5	EKZON9c.583A>G/ p.T195A Heterozigot EKZON9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot EKZON20c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON22c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice)

Çizelge 4.4 Simmental sığır ırkına ait NGS (Yeni Nesil Dizileme) analiz sonuçları

Simmental Sığır Kodu	DNA Konsantrasyonu (ng)	Nextgene Analiz Sonuçları
S1	15.1	NORMAL
S2	28.9	EKZON 9 c.583A>G/p.T195A Homozigot EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C/p.V509A Heterozigot EKZON22c.1632A>G/p.E544EHeterozigot (splice)
S3	23.1	EKZON 9 c.583A>G/p.T195A Homozigot EKZON 20 c.1526T>C/p.V509A Homozigot EKZON22c.1632A>G/p.E544EHomozigot (splice)
S4	33.3	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Homozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Homozigot EKZON22c.1632A>G/p.E544EHomozigot (splice)
S5	17.9	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Homozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Homozigot EKZON22c.1632A>G/p.E544EHomozigot (splice)
S6	39.6	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Homozigot EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Homozigot EKZON22c.1632A>G/p.E544EHeterozigot (splice) INTRON 18 c.1335+6G>A Homozigot
S7	47.9	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Heterozigot EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice)
S8	51.1	EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice) INTRON 18 c.1335+6G>A Heterozigot

Çizelge 4.4 Simmental sığır ırkına ait NGS (Yeni Nesil Dizileme) analiz sonuçları (devam)

Simmental Sığır Kodu	DNA Konsantrasyonu (ng)	Nextgene Analiz Sonuçları
S9	68.2	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Homozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Homozigot (splice) EKZON 26 c.1985G>C/p.S662T Homozigot
S10	26.7	EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice) INTRON 18 c.1335+6G>A Heterozigot INTRON 22 c.1714-3C>CT Heterozigot
S11	63.1	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice)
S12	40.4	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Homozigot EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Homozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Homozigot (splice) EKZON 9 c.630G>AG/ p.K210KK Heterozigot (Splice)
S13	21.8	NORMAL
S14	17.1	NORMAL
S15	69.1	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice)

Çizelge 4.4 Simmental sığır ırkına ait NGS (Yeni Nesil Dizileme) analiz sonuçları (devam)

Simmental Sığır Kodu	DNA Konsantrasyonu (ng)	Nextgene Analiz Sonuçları
S16	69.1	NORMAL
S17	85.2	NORMAL
S18	81.4	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Homozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Homozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Homozigot (splice) EKZON 26 c.1985G>C/p.S662T Homozigot
S19	64.1	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice) EKZON 26 c.1985G>C/p.S662T Heterozigot
S20	75.1	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Homozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Homozigot (splice) EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot INTRON 18 c.1335+6G>A Homozigot INTRON 22 c.1714-3C>CT Heterozigot
S21	221.1	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice) EKZON 26 c.1985G>C/p.S662T Heterozigot
S22	99.7	EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Homozigot (splice) EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Homozigot INTRON 18 c.1335+6G>A Heterozigot

Çizelge 4.4 Simmental sığır ırkına ait NGS (Yeni Nesil Dizileme) analiz sonuçları (devam)

Simmental Sığır Kodu	DNA Konsantrasyonu (ng)	Nextgene Analiz Sonuçları
S23	91.0	EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice) EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot INTRON 18 c.1335+6G>A Heterozigot
S24	67.6	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice) EKZON 26 c.1985G>C/p.S662T Heterozigot INTRON 18 c.1335+6G>A Heterozigot INTRON 22 c.1714-3C>CT Heterozigot
S25	61.7	NORMAL
S26	68.9	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Homozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Homozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Homozigot (splice) EKZON 26 c.1985G>C/p.S662T Homozigot
S27	42.6	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Heterozigot EKZON20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice) EKZON 26 c.1985G>C/p.S662T Heterozigot INTRON 22 c.1714-3C>CT Heterozigot
S28	87.0	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Homozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Homozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Homozigot (splice) EKZON 26 c.1985G>C/p.S662T Homozigot

Çizelge 4.4 Simmental sığır ırkına ait NGS (Yeni Nesil Dizileme) analiz sonuçları (devam)

Simmental Sığır Kodu	DNA Konsantrasyonu (ng)	Nextgene Analiz Sonuçları
S29	87.3	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON22c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice) EKZON9c.630G>AG/p.K210KK Heterozigot (Splice)
S30	87.4	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Homozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Homozigot (splice) EKZON 26 c.1985G>C/p.S662T Homozigot
S31	79.6	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice) EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot INTRON 18 c.1335+6G>A Heterozigot INTRON 22 c.1714-3C>CT Heterozigot
S32	73.7	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice)
S33	73.7	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice) EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot INTRON 18 c.1335+6G>A Heterozigot
S34	27.8	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Homozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice) EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot INTRON 18 c.1335+6G>A Heterozigot
S35	30.9	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A HETEROZİGOT EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A HETEROZİGOT EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E HETEROZİGOT (splice)

Çizelge 4.4 Simmental sığır ırkına ait NGS (Yeni Nesil Dizileme) analiz sonuçları (devam)

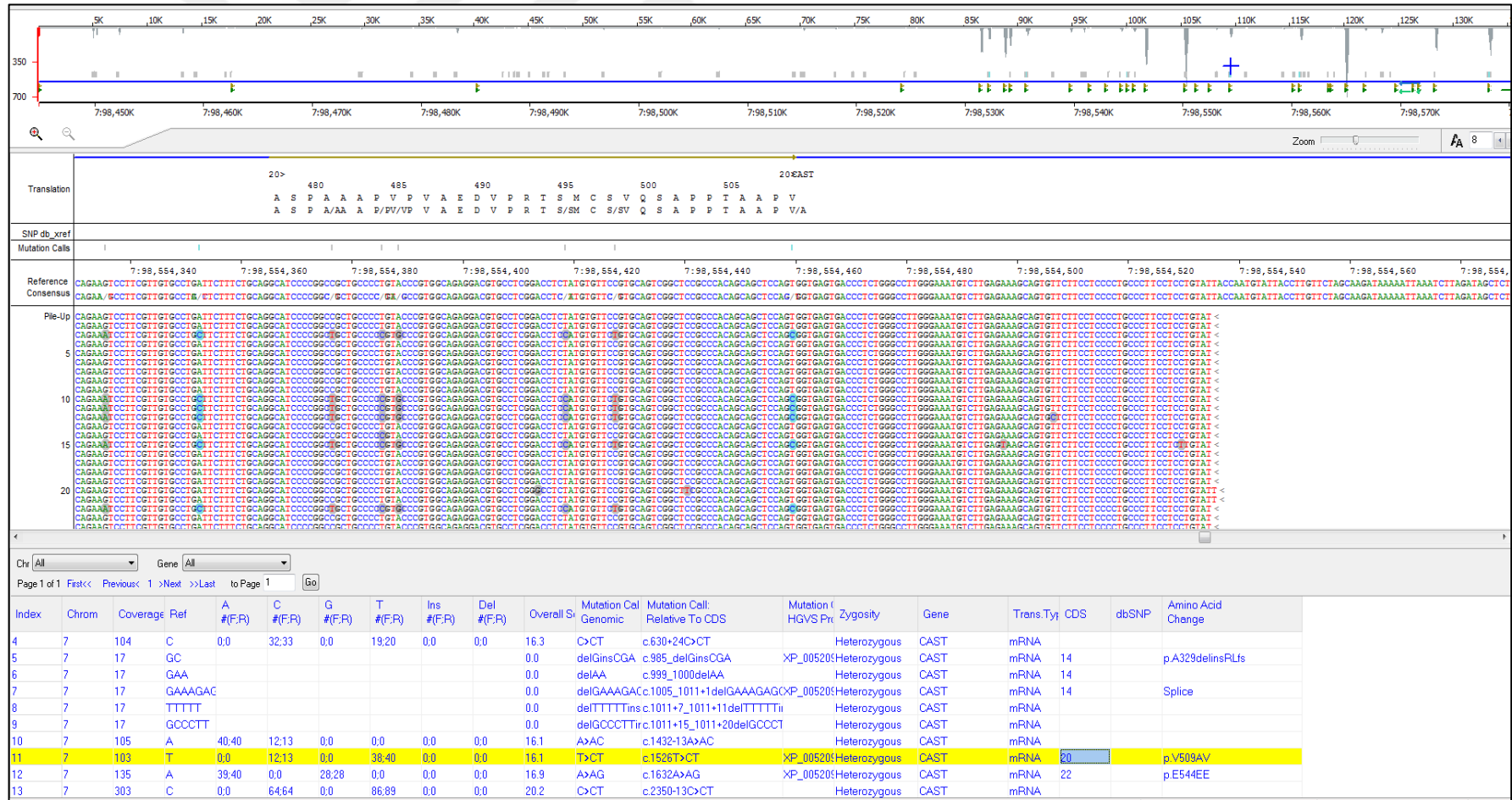
Simmental Sığır Kodu	DNA Konsantrasyonu (ng)	Nextgene Analiz Sonuçları
S36	17.8	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice)
S37	24.8	NORMAL
S38	15.9	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot INTRON 18 c.1335+6G>A Heterozigot EKZON 9 c.616G>A/p.E206KHeterozigot
S39	63.0	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice)
S40	40.4	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice)
S41	23.5	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Homozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Homozigot (splice) EKZON 26 c.1985G>C/p.S662T Homozigot
S42	59.7	NORMAL
S43	17.8	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice) EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot INTRON 18 c.1335+6G>A Heterozigot
S44	40.1	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice) EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot

Çizelge 4.4 Simmental sığır ırkına ait NGS (Yeni Nesil Dizileme) analiz sonuçları (devam)

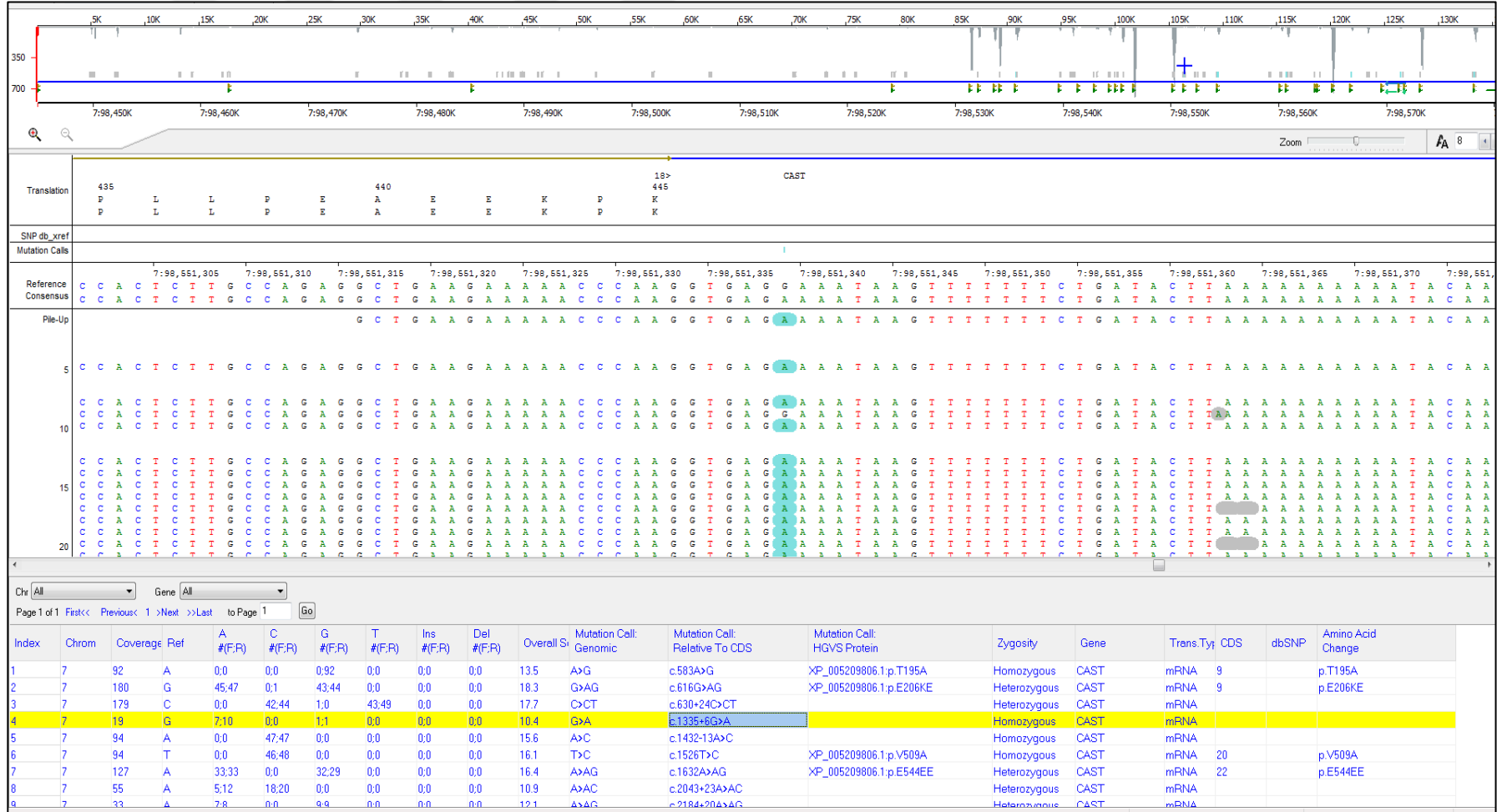
Simmental Sığır Kodu	DNA Konsantrasyonu (ng)	Nextgene Analiz Sonuçları
S45	47.7	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Homozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Homozigot (splice) EKZON 26 c.1985G>C/p.S662T Homozigot
S46	36.7	EKZON 9 c.583A>G/ p.T195A Heterozigot EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice) EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot INTRON 18 c.1335+6G>A Heterozigot
S47	52.9	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice) EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot
S48	57.0	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice) EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot
S49	59.4	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice) EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot INTRON 18 c.1335+6G>A Heterozigot
S50	30.3	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Heterozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot (splice) EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot
S51	34.5	NORMAL
S52	49.9	EKZON 20 c.1526T>C /p.V509A Homozigot EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Homozigot (splice) EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot

Çalışmada NGS analizi sonucu bulunan polimorfizmler HGMD veri bankasında taranarak adlandırılmış, yeni bulunan değişimlerin etkileri SIFT ve POLYPHEN gibi biyoinformatik “in silico” programlarla ortaya konmuştur.

Buna göre, varyasyon tespit edilen 32 Brangus’tan biyoinformatik değerlendirmeyle elde edilen 1 nolu hayvanda belirlenen V1 varyasyonunun (EKZON 20 c.1526T>C/p.V509A Heterozigot) surveyor görüntüsü şekil 4.1’de, diğer 10 Brangus’a ait varyasyon görüntüleri ise EK 1’de gösterilmiştir. Benzer şekilde, varyasyon tespit edilen 43 Simmental’den biyoinformatik değerlendirmeyle elde edilen 6 nolu örneğe ait olan V13 varyasyonunun (INTRON 18 c.1335+6G>A Homozigot) surveyor görüntüsü şekil 4.2’de, diğer 7 Simmental’e ait varyasyonların surveyor görüntüleri ise EK 2’de verilmiştir.



Şekil 4.1 Brangus ırkına ait 1 nolu hayvanda bulunan varyasyonun (B1-EKZON 20 c.1526T>C/p.V509A Heterozigot) surveyor görüntüsü
 *Surveyor görüntüsü, B1 ırkına ait temsili olarak verilmiş, Brangus ırkına ait diğer varyasyonlar için olan görüntüler ise EK 1’de sunulmuştur



Şekil 4.2 Simmental ırkına ait 6 nolu hayvanda bulunan varyasyonun (S6- INTRON 18 c.1335+6G>A Homozigot) surveyor görüntüsü
 *Surveyor görüntüsü, S6 ırkına ait temsili olarak verilmiş, Simmental ırkına ait diğer varyasyonlar için olan görüntüler ise EK 2’de sunulmuş

DNA'daki değişimlerin patojenik olup olmadıklarına karar vermek çok kolay bir süreç değildir. Değişimin sıklığının yanı sıra lokalizasyonu (intronik veya ekzonik olup olmadığı), nonsense, frameshift değişim olması veya başlangıç kodonunda yer alması ya da bir veya birkaç ekzon delesyonu şeklinde bir değişim olması sağlam patojenite kriterleri arasında yer alır. Diğer yandan, varyasyonun literatürde başka araştırmacılar tarafından ne şekilde bildirildiği (patojen/polimorfizm) de önemli bir kriterdir ve farklı veri bankalarından kontrol yapılarak söz konusu varyasyonun patojenitesi hakkında ya da polimorfizm olup olmadığı konusunda fikir sahibi olunabilmektedir.

Bu amaçla, insan ırkı için çok sayıda veri bankası ve analiz programları geliştirilmiş bulunmaktadır. Bitkiler ve değişik hayvan türleri için de oluşturulmuş veri bankaları ve analiz programları mevcuttur. Bu programlar referans dizi ile hedef bölgeyi karşılaştırır. Çalışmada, NGS analizi sonucu elde edilen DNA dizi çıktılarını “mutation surveyor” isimli program aracılığı ile “Ensembl data base”de sığır genomuna (cow) ait dizilerle kıyaslaması ve analizleri gerçekleştirilmiştir (Anonymous 2018c). (1-5 ensembl web).

4.3 Varyasyonların Biyoinformatik Değerlendimesi

Bir türe ait farklı bireyler arasında iki veya daha fazla farklı dizinin varlığı anlamına gelen polimorfizmler, DNA replikasyonu sırasında meydana gelen hatalar sonucu oluşabilmektedir. Her canlının genomunda ortak dizilerin yanı sıra çoğunlukla birbirinden farklı varyasyonlar yer alır. Özellikle fonksiyonel bölgelerdeki (gen) kodlayıcı dizilere, yani ekzonlara ait farklılıklar patolojik bir sonuç doğuruyorsa, diğer bir ifadeyle, amino asit dizilimini ve sonuçta protein yapısını değiştiriyor ya da bozuyorsa, bu değişikliğe patojen varyasyon ya da mutasyon denilir. Diğer yandan, patolojik sonuç doğurmayan değişimler ise “polimorfizm” olarak adlandırılmaktadır. Bir varyasyonun patojenik olup olmadığı, intronik veya ekzon lokalizasyonlu olup olmadığı, splice bölgede bulunması gibi faktörlere, transkripsiyon veya translasyon ürününe bağlı olarak da değişir.

Polimorfizmlerin diğ er önemli tanımlayıcı kriteri ise sıklıklar  dır. Frekansı %1'in altında olan bir alelin (varyasyonun) patojenik (fonksiyonel) olma ihtimali artarken, %1'in üzerinde olanların ise benign (polimorfik) olma ihtimali artmaktadır. Yani, popülasyonda sıklığı yüksek olan varyasyonlar polimorfizmdir.

Minör alel frekansı (MAF), bir alelin popülasyondaki en düşük sıklığı olarak refere edilir. $MAF \leq 1$ olduğunda % mutasyon, $MAF > 1$ olduğunda ise polimorfizm olarak ifade edilir. RS numarası (Reference SNP-veri giriş numarası) ise; araştırmacılar tarafından kullanılan, spesifik olarak tek nükleotid değişimlerini adresleyen veri bankaları giriş numarasıdır. Çalışmada, biyoinformatik değerlendirmelerle elde edilen varyasyonların sıklık değerleri (MAF) ve veri giriş numaraları  izelge 4.5'te verilmiştir.

NGS analizi biyoinformatik değerlendirme  ıktıları dikkate alındığında, 13 adet varyasyon (V1→V13) tespit edilmiştir ( izelge 4.5). Çalışmada saptanmış olan tüm varyasyonlar MAF (minör alel frekans) değerlerine göre polimorfik özellik göstermektedir. Bunlardan V6 olarak isimlendirilen “EKZON 8 c.439C>G/p.L147LV” ile yine V13 olarak isimlendirilen “INTRON 18 c.1335+6G>A”nin MAF değerleri daha önce bildirilmemiş olup patojenitesi belirlenmemiştir ve rs (veri bankası giriş numarası) da bulunmamaktadır.

Ayrıca, V10, V11 ve V12 varyasyonlarının ise rs numaraları olmasına rağmen, MAF değerleri bildirilmemiştir. MAF değerleri daha önce bildirilmemiş olanlardan V11 ve V12'nin sıklık değerleri bu çalışmada %0.48 olarak saptanmıştır. V2 olarak adlandırılan “EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E (splice)” polimorfizmin olası patojenik özellikte olduğu gözlenmiştir. Geriye kalan varyasyonlara ait sonuçlar, yüksek frekans varyasyon (sıklık değerleri %1'in üzerinde) olarak değerlendirilebilir ( izelge 4.5).

Çizelge 4.5 Biyoinformatik değerlendirmelerle elde edilen varyasyonların sıklık değerleri ve veri giriş numaraları

Varyasyon	Tespit Edilen Değişimler	Veribankası Numarası*	MAF* Ensembl	MAF (Mevcut Çalışma)
V1	EKZON 20 c.1526T>C/p.V509A	rs109384915	%38.00	%42.78
V2	EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E (splice)	rs110712559	%25.00	%36.53
V3	EKZON 14 c.934A>G/p.N312D	rs723916435	%23.00	%1.92
V4	EKZON 9 c.583A>G/p.T195A	rs210072660	%44.00	%25.00
V5	EKZON 9 c.616G>A/p.E206K	rs384020496	%19.00	%12.5
V6	EKZON 8 c.439C>G/p.L147LV	Bildirilmemiş	-	%0.96
V7	INTRON 22 c.1714-3C>T	rs110711318	%21.00	%2.88
V8	EKZON 26 c.1985G>C/p.S662T	rs110914810	%45.00	%8.65
V9	EKZON 9 c.630G>AG p.K210KK	rs378682309	%15.00	%1.92
V10	EKZON13 c.895 G>A/p.A299T	rs715323791	Bildirilmemiş	%2.4
V11	EKZON 20 c.1510C>T/p.P504S	rs1116977475	Bildirilmemiş	%0.48
V12	INTRON 6 c.373-3C>T	rs433558933	Bildirilmemiş	%0.48
V13	INTRON18 c.1335+6G>A	Bildirilmemiş	-	%7.69

* Veri bankası numarası (rs numarası-Reference SNP): araştırmacılar tarafından kullanılan, spesifik olarak tek nükleotit değişimlerini adresleyen veri bankaları giriş numarasıdır. Bu numaraya sahip olmayan değişimler literatürde bildirilmemiştir.

* MAF (Minor Allel Frequency): Minör alel frekansı ilgili popülasyondaki en düşük sıklıkla görülen aleli ifade etmektedir. SNP'ler (Single Nucleotide Polymorphism-Tek Nükleotit Polimorfizmi) MAF ≤ 1 % mutasyon iken, MAF > %1 polimorfizm olarak değerlendirilir.

4.4 Brangus ve Simmental Sığır Irklarında NGS Analizi ile Belirlenen Varyasyonların Karşılaştırılması

Projelendirilerek analize alınan her bir sığır et örneğine ait bölgeler sığır referans genomu ile karşılaştırılarak farklılıklar ortaya konulmuştur. Brangus ve Simmental sığır gruplarında NGS analizi ile belirlenen varyasyonların varlığı ve grup ilişkisi çapraz tablolar oluşturularak “fisher exact testi” ile incelenmiştir (Çizelge 4.6). Buna göre V1, V2, V5, V8, V10 ve V13 varyasyonları ve çalışma grupları arasında istatistiki olarak önemli düzeyde bir korelasyon saptanmıştır ($p < 0.05$). V1 kodlu varyasyon (EKZON 20 c.1526T>C/p.V509A) Brangus’ların %51.9’unda (27 hayvanda), Simmental grubun ise %82.7’sinde (43 hayvanda) gözlenmiştir. V2 kodlu varyasyon (EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E splice) Brangus’ların %32.7’sinde (17 hayvanda), Simmental grubun da %80.82’sinde (42 hayvanda) bulunmuştur. V5 varyasyonu (EKZON 9 c.616G>A/p.E206K) Brangus’ların %13.5’inde (7 hayvanda), Simmental grubun ise %36.52’inde (19 hayvanda) görülmüştür. Brangus’larda V8 kodlu varyasyon (EKZON 26 c.1985G>C/p.S662T) hiç görülmemiştir, Simmental’lerin %21.2’sinde (11 hayvanda) saptanmıştır. Brangus’ların %9.6’sında (5 hayvanda) V10 varyasyonu (EKZON13 c.895 G>A/p.A299T) gözlenirken, Simmental grupta V10 varyasyonu hiç belirlenmemiştir. V13 varyasyonuna (INTRON 18 c.1335+6G>A) Brangus’larda rastlanmamış ve Simmental grupta görülme oranı (14 hayvanda) %26.9 olarak tespit edilmiştir.

Her iki ırkta varyasyonların görülme durumu değerlendirildiğinde, saptanan 13 varyasyondan 5 tanesi sadece Brangus’ta (V3, V6, V10, V11 ve V12), 3 tanesi (V8, V9 ve V13) sadece Simmental’de ve 5 tanesi de hem Brangus hem de Simmental’de (V1, V2, V4, V5 ve V7) görülmüştür.

Çizelge 4.6 Brangus ve Simmental ırklarına ait varyasyonların karşılaştırılması

Varyasyon kodu	Varyasyon varlığı	Brangus		Simmental		p değeri
		n	%	n	%	
V1	Yok	25	48.1	9	17.3	0.001*
	Var	27	51.9	43	82.7	
V2	Yok	35	67.3	10	19.2	0.000*
	Var	17	32.7	42	80.8	
V3	Yok	48	92.3	52	100.0	0.059
	Var	4	7.7	0	0.0	
V4	Yok	36	69.2	29	55.8	0.112
	Var	16	30.8	23	44.2	
V5	Yok	45	86.5	33	63.5	0.006*
	Var	7	13.5	19	36.5	
V6	Yok	50	96.2	52	100.0	0.248
	Var	2	3.8	0	0.0	
V7	Yok	51	98.1	47	90.4	0.102
	Var	1	1.9	5	9.6	
V8	Yok	52	100.0	41	78.8	0.000*
	Var	0	0.0	11	21.2	
V9	Yok	52	100.0	50	96.2	0.248
	Var	0	0.0	2	3.8	
V10	Yok	47	90.4	52	100.0	0.028*
	Var	5	9.6	0	0.0	
V11	Yok	51	98.1	52	100.0	0.500
	Var	1	1.9	0	0.0	
V12	Yok	51	98.1	52	100.0	0.500
	Var	1	1.9	0	0.0	
V13	Yok	52	100.0	38	73.1	0.000*
	Var	0	0.0	14	26.9	

n= örnek sayısı

*p<0.05

Çalışmada, populasyondaki en düşük sıklıkla görülen aleli refere eden MAF değerine sahip Brangus örneklerine ait 3 varyasyon (V6, V11 ve V12) düşük frekans varyasyonu olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.5). Simmental sığır ırkında tespit edilen 13 varyasyondan hiçbirinde düşük frekans varyasyon saptanmamıştır (Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5). Brangus ırkında, V6 varyasyonu B9 ve B26 kodlu hayvanlarda, V11 varyasyonu B17 kodlu hayvanda ve V12 varyasyonu ise sadece B42 kodlu hayvanda saptanmıştır (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.5). MAF değerleri %1'in altında olan bu üç varyasyonda istatistiki değerlendirme sonunda önemli derecede farklılık ($p>0.05$) görülmemiştir (Çizelge 4.6). Çalışmada tespit edilen V6 (EKZON 8 c.439C>G/p.L147LV) and V13 (INTRON 18 c.1335+6G>A) varyasyonları daha önceden rapor edilmemiş varyasyonlardır. V6 varyasyonu 104 hayvandan sadece 2 Brangus'ta (B9 ve B26), V13 varyasyonu ise 14 Simmental'de (S6, S8, S10, S20, S22, S23, S24, S31, S33, S34, S38, S43, S46 ve S49) bulunmuştur. Analiz sonucu elde edilen bu iki varyasyonun (V6 ve V13) olası yeni varyantlar olarak literatüre kazandırılması beklenebilir.

Curi vd. (2009) Nellore ırkından 114, Angus-Nellore çapraz ırkından 67, Canchim ırkından 41, Brangus ve çapraz ırkından 19 ve Braunvieh çapraz ırkından 15 hayvan kullanılarak gerçekleştirdikleri çalışmada, araştırmadaki ırklarda CAPN4751 ve CAST/DdeI polimorfizmleri ile et gevrekliği arasındaki ilişkiye bağlı olarak ortaya konulan benzerlik elde edilen sonuçları doğrular niteliktedir. Genetik grup ve genotiplerin etkisinin çelişkili olmadığı, alel dağılımlarındaki benzerlikle ve bulunan ilişkilerin istatistiki önemiyle ($p<0.01$) ortaya konmuştur.

Allais vd. (2011) çalışmalarında kalpastatin (CAST) ve μ -kalpain (CAPN1) genlerindeki polimorfizmlerin et gevrekliğiyle ilişkisini üç Fransız sığır ırkı üzerinden değerlendirmişlerdir. CAST genindeki 3 SNP (Single Nucleotide Polymorphism- Tek Nükleotit Polimorfizmi) ve CAPN1 genindeki 4 SNP için 1114 adet Charolais, 1254 Limousin ve 981 Blonde d'Aquitaine safkan genç sığır genotiplenmiştir. Blonde d'Aquitaine sığır ırkında CAST markırının G alelinin (Btau4.0'daki 97574679 pozisyonu), kesme kuvveti ve duyuşal gevreklik skoru üzerinde önemli ölçüde etkisinin olduğu bulunmuştur. Charolais ırkında ise CAST-3 markırının kesme kuvvetinde etkili

olduğu, fakat gevreklik skorlarının belirleyiciliğinin olmadığı öne sürülmüştür. CAPN1–2 markırının G alelinin Limousin ırkında kesme kuvvetinde önemli derecede etkili olduğu, bununla birlikte, gevreklik skoruna etkisinin olmadığı vurgulanmıştır. CAST-1 markırındaki G alelinin ise yalnızca gevreklik skorunu etkilediği bulunmuştur. Blonde d'Aquitaine ırkında CAST-2 markırı üzerindeki G alelinin tekstür özelliğinin değerlendirildiği iki özellik açısından (kesme kuvveti ve duyusal gevreklik) bakıldığında et sertliğindeki artışla ilişkili olduğu ortaya çıkarılmıştır. Charolais ve Limousin ırklarında CAST genine ait 5 haplotipin gevreklik skoru üzerinde etkili olduğu fakat kesme kuvvetini etkilemediği bulunmuştur.

Ropka-Molik vd. (2014) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada CAST markırlarının popülasyonda ve analiz edilmiş olan mutasyonlarda değişiklik göstermesinden yola çıkarak Polonya'da yetiştirilen beş domuz ırkına ait et kalite özellikleri üzerine CAST geni polimorfizmlerinin etkilerini saptamak amacıyla objektif bir çalışma ortaya koymuşlardır. CAST markırlarının öneminin popülasyonlara ve saptanan mutasyonlara göre değişim gösterdiğini dikkate alarak, saptanan 3 CAST geni polimorfizminin (HinfI, HpaII and RsaI) görülme sıklıklarının farklı genotiplerde farklı düzeyde olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada kalpastatin genindeki polimorfizmlerin, kesme kuvveti üzerinde additif etkili rol oynadığı belirtilmiştir. Ortaya konan araştırmada çok sayıda et kalite özellikleri dikkate alınmış ve bu kapsamlı analizle CAST geninin 6. intronundaki polimorfizmlerin su tutma kapasitesi ve tekstür parametreleri (sertlik, sıklık, yapışkanlık, çiğnenebilirlik ve yaylılık) ile ilişkili olduğu da doğrulanmıştır.

Diğer bir çalışmada Calvo vd. (2014) tarafından, iki farklı ırk sığırdan et gevrekliğiyle ilişkilendirilen CAST ve CAPN1 genlerindeki etkili mutasyonlar araştırılmış ve Parda de Montaña ve Pirenaica ırklarında sırasıyla 31 ve 7 polimorfizmleri tespit edilmiştir. CAST geninin intron 5 (BTA7: g.98533962CNG on UMD 3.0), exon 7 (g.98535683ANG) ve intron 12 (g.98545188TNA) bölgelerinde lokalize olan 3 SNP'nin özellikle Parda de Montaña ırkında gevreklik özelliğiyle ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Araştırmacılar, h2 ve h5 haplotiplerinin, CAST genindeki g.98535683ANG SNP'nin etkili bir mutasyon olabileceğini, bu mutasyonun p.Thr182Ala (NM_174003) bölgesindeki amino asit dizisinde değişikliğe sebep olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu

amino asit değişiminin kalpastatin L-domain ve kalpain arasındaki bölgeleri etkileyebileceğini ve kalpain ve kalpastatin arasında daha kararlı bir bağlantı oluşturabileceğini vurgulamışlardır.

Lozano vd. (2016) toplam 196 Meksika menşeli hayvandan 40 adeti *Bos taurus* [Bt], 95'i *Bos indicus* [Bi] ve 61'i ise bunların çaprazlanmasıyla elde edilmiş olan Bi x Bt gruplarını genetik açıdan değerlendirmişler ve kalpain (CAPN316 ve CAPN4751) ve kalpastatindeki (CAST-T1) SNP'lerin Warner–Bratzler kesme kuvveti (WBSF) üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Araştırma sonuçlarına göre genetik grup genetik grup WBSF üzerine önemli ölçüde etkili olduğu CAPN316 ile CAPN ve CAST kombine etkisinin et gevrekliği tahmininde kullanılabileceği vurgulanmıştır. CAST polimorfizminin WBSF üzerinde önemli bir etki göstermemiş olmasıyla birlikte CAPN alelleriyle kombine etkisi, etlerin kesme kuvvetinde azalmaya sebep olmaktadır. Bu argüman birkaç sığır ırkında bildirilmiş olan CAPN ve CAST'ın birlikte değerlendirildiği genetik markır geçerlilik testiyle tutarlı bulunmuştur.

Leal-Gutiérrez vd. (2018)'nin Angus–Brahman sığırlarında yaptıkları çalışmada kalpastatin geni üzerinde enstrümental tekstür (Warner Bratzler kesme kuvveti) ile ilişkilendirilmiş dört markır bulunmuştur. Çalışmada, rs210861835 numaralı polimorfizm ve CAST5 SNP'lerinin, RNA stabilitesi ve mRNA konformasyonel değişimi üzerinden gen ekspresyonunu regüle ettiği tahmin edilmiştir. rs210861835 C alelinin moleküler stabilitesinin yüksek olduğu ve mRNA dayanıklılığının daha fazla olduğu öne sürülmüştür. Bunun kalpastatin proteini, vem- kalpain inhibisyonu oranında artışa neden olduğu da vurgulanmıştır. CAST5'in mRNA'nın yapısını değiştirdiği ve yüksek protein ekspresyonuna sebep olan bu polimorfizme yakın tek zincirli bölgelerin uzunluğunu ve sayısını artırdığı öne sürülmüştür.

Sun vd. (2018), yaptıkları çalışmada 132 Chinese Simmental sığır ırkında CAPN1 ve CAST genotipleri ve et kalite özellikleri arasındaki ilişkiyi tespit etmek amacıyla bu genlerdeki SNP'leri analiz etmiş ve tanımlamışlardır. Pişirilmiş etin lezzet kalitesinde önemli katkısı olan gevreklik kriteri kesme kuvveti ile değerlendirilmiştir. Daha önceki benzer çalışmalarda da olduğu gibi (Allais vd. 2011, Curi vd. 2009), CAPN1

markırlarının sığır etinde kesme kuvveti üzerine önemli etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Polimorfizmler DNA sekans havuzundan elde edilmiş olup, çalışmada sığır CAPN1 geninin ekzon 1 ile ekzon 6 arasında olduğu ve CAST geninin de ekzon 9'da olmak üzere toplam 3 SNP tanımlanmış ve bu polimorfizmlerin CAPN1 geninde ekzon 4 ve ekzon 2'de, CAST geninde ise ekzon 9'da lokalize olduklarını tespit etmişlerdir. Bulunan CAPN1 4558 A>G, CAPN1 4684 C>T ve CAST 596 T>C içeren bu SNP'ler, PCR-SSCP ile başarılı biçimde genotiplendirilmiştir. Çalışmaya göre tüm SNP'lerin, her popülasyonda 2 alel ve 3 genotip içerdikleri de bildirilmiştir.

Iguácel vd. (2019), Parda de Montaña ve Pirenaica ırklarında *Longissimus thoracis* kasını materyal olarak kullanmışlar, tanımlanmış olan CAST SNP'leri ve et sertliği arasındaki ilişkiyi ortaya koymuşlardır. Parda de Montaña ırkındaki CAST geninin SNPs etkilerine göre olgunlaştırılmış *Longissimus thoracis* kasında et sertliği üzerine etkili olan kalpastatin (CAST) geninin rs210072660 ve rs109221039 SNP'lerinin etkisini doğrulamanın amaçlandığı çalışmada, et olgunlaştırma ve tespit edilen rs210072660 SNP arasındaki etkileşimin WBSF üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, Parda de Montaña ve Pirenaica ırkındaki et gevrekliğini artırma çalışmalarına destek vermek için etkin markır destekli seleksiyonda (MAS) SNPs rs210072660 ve rs109221039 markırlarının yararlı olabileceği ileri sürülmüştür. Çiftlik hayvanlarının etinde CAST geni ve et gevrekliği arasında yakın bir ilişki olduğu hakkında çok sayıda tespit bulunmakla birlikte ırka bağlı bir ilişkinin de söz konusu olduğu raporlanmıştır.

Genetik markırların fenotipler üzerine etkili olması çevre ve popülasyona ait içsel faktörlerden kaynaklanabilmektedir. Iguácel vd. (2019) tarafından tespit edilen rs210072660 ve rs109221039 veri numaralı varyasyonların olgunlaştırma süresi ve ırka bağlı olarak et sertliğini farklı düzeyde etkileyebileceği hipotezini ortaya koymuştur. Et sertliğini etkileyen CAST geni incelendiğinde tespit edilen rs210072660 SNP'nin, ekzon 7'de (BTA7:g.98535683A>G in UMD3.1 genome assembly) lokalize olduğu belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında CAST geninde saptanan 13 varyasyondan biri olan ve V4 olarak kodlanan EKZON 9.c 583A>G/p.T195A varyasyonu, Iguácel vd. (2019) tarafından saptanan SNP'lerden biri olan rs210072660 ile aynıdır. Ensembl verilerine göre %44 MAF değerine sahip olan bu polimorfizm, çalışmada

değerlendirmeye alınan iki sığır ırkından biri olan 52 Brangus'tan 16'sında, çalışılan diğer grup olan 52 adet Simmental ırkının 23'ünde bulunmuştur. Genetik markırların fenotipe etkisi popülasyona ve çevreye bağlı bir faktör olduğundan, tespit edilen rs210072660 ve rs1092212039 veri numaralı varyasyonların olgunlaştırma süresi ve ırka bağlı olarak et sertliğini farklı düzeyde etkileyebileceği hipotezini ortaya koymuşlardır. Çalışmada, genetik markır olarak değerlendirilen bu polimorfizmlerin et endüstrisinde sert etlerin tespitinde ve karkasların buna göre uygun prosedürlere tabi tutulması açısından yararlı olabileceği bildirilmiştir. Aynı çalışmada, Parda de Montaña ve Pirenaica hayvanlarındaki istenilen alellerin (her iki SNP için A alelleri) nispeten yüksek frekansı ve bulunan etkilerinin boyutu göz önüne alındığında, rs210072660 ve rs109221039 numaralı SNP'lerin sığır yetiştiriciliği programlarında kullanılan potansiyel genetik markırlar olarak ek bir kaynak teşkil edebileceği belirtilmiştir. Böylece bu her iki ırk için yetiştiricilik programları sadece genomik seçimle uygulanabilir olacaktır.

4.5 Duyusal Analiz Sonuçları

Eğitimli 9 panelist tarafından Brangus ve Simmental grubu et örneklerinde “sertlik” (1:aşırı sert, 8:aşırı gevrek), “sululuk” (1:aşırı kuru, 8:aşırı sulu) ve “lezzet yoğunluğu” (1:aşırı zayıf, 8:aşırı güçlü) olmak üzere üç duyusal özellik açısından duyusal değerlendirme yapılmıştır. Brangus ve Simmental ırklarına ait 52'şer adet, toplamda 104 adet hayvandan elde edilen pişirilmiş et örneklerinin duyusal değerlendirme sonuçları sırasıyla çizelge 4.7 ve çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Brangus sığır ırkına ait duyusal sertlik, sululuk ve lezzet yoğunluğu puanları

Brangus Sığır Kodu	Sertlik	Sululuk	Lezzet yoğunluğu
B1	5.75 ± 0.38	4.86 ± 0.86	5.22 ± 0.41
B2	4.07 ± 0.78	4.15 ± 0.88	4.82 ± 0.95
B3	4.67 ± 0.87	4.02 ± 1.35	4.45 ± 0.83
B4	4.50 ± 0.58	4.00 ± 0.23	5.58 ± 0.77
B5	5.87 ± 0.70	5.00 ± 0.84	5.75 ± 0.54
B6	5.23 ± 0.87	5.46 ± 1.11	5.33 ± 0.86
B7	5.34 ± 1.17	5.54 ± 1.29	5.69 ± 0.69
B8	4.79 ± 0.70	4.33 ± 0.97	5.19 ± 0.91
B9	5.42 ± 0.81	5.20 ± 0.79	5.37 ± 0.76
B10	4.43 ± 0.74	3.65 ± 0.95	4.98 ± 0.46
B11	5.36 ± 0.48	4.23 ± 1.16	5.22 ± 1.00
B12	6.79 ± 0.40	5.86 ± 0.63	6.09 ± 0.54
B13	3.75 ± 0.50	3.80 ± 0.42	4.66 ± 0.43
B14	4.00 ± 0.29	4.48 ± 0.59	5.23 ± 0.95
B15	5.08 ± 0.74	5.60 ± 0.86	4.85 ± 0.56
B16	5.25 ± 1.00	4.59 ± 1.33	5.25 ± 0.66
B17	5.13 ± 0.86	4.63 ± 0.75	4.90 ± 0.55
B18	4.88 ± 0.25	4.88 ± 0.28	5.40 ± 0.55
B19	5.00 ± 1.20	4.45 ± 1.32	5.10 ± 0.97
B20	5.89 ± 1.25	5.00 ± 1.67	5.44 ± 0.97
B21	4.50 ± 0.97	4.34 ± 1.37	4.38 ± 1.31
B22	6.17 ± 0.69	4.75 ± 1.71	5.47 ± 1.34
B23	5.93 ± 0.19	4.32 ± 1.32	4.65 ± 0.98
B24	5.55 ± 0.61	5.16 ± 0.81	5.53 ± 0.68
B25	6.22 ± 0.64	5.26 ± 0.69	5.29 ± 0.81
B26	5.79 ± 0.49	5.30 ± 1.36	5.55 ± 0.68
B27	4.95 ± 0.17	5.43 ± 0.98	5.76 ± 1.15
B28	6.48 ± 0.44	4.82 ± 1.17	5.67 ± 1.13
B29	5.00 ± 0.64	4.50 ± 0.78	4.97 ± 1.06
B30	4.34 ± 0.89	4.70 ± 0.70	4.77 ± 0.76

*Ortalama±Standart sapma.

Çizelge 4.7 Brangus sığır ırkına ait duyusal sertlik, sululuk ve lezzet yoğunluğu puanları (devam)

Brangus Sığır Kodu	Sertlik	Sululuk	Lezzet yoğunluğu
B31	4.75 ± 0.89	4.62 ± 1.17	5.04 ± 0.59
B32	4.50 ± 0.78	4.45 ± 1.04	4.47 ± 0.88
B33	3.84 ± 0.56	4.54 ± 0.76	4.47 ± 0.97
B34	4.17 ± 0.42	4.07 ± 0.73	4.75 ± 0.76
B35	5.07 ± 0.73	3.64 ± 1.26	4.88 ± 1.11
B36	3.73 ± 0.57	4.57 ± 1.02	4.63 ± 1.31
B37	5.13 ± 0.36	4.59 ± 0.96	4.62 ± 0.78
B38	5.54 ± 0.67	5.20 ± 0.79	5.09 ± 0.92
B39	4.50 ± 0.55	3.75 ± 0.85	5.22 ± 0.48
B40	3.50 ± 0.54	4.15 ± 0.54	4.57 ± 0.76
B41	3.97 ± 0.36	4.62 ± 0.91	4.92 ± 0.70
B42	5.75 ± 0.81	4.93 ± 1.07	5.07 ± 0.63
B43	5.25 ± 1.23	4.78 ± 1.49	4.84 ± 0.97
B44	5.40 ± 0.68	5.14 ± 1.04	5.34 ± 0.89
B45	5.82 ± 0.38	4.29 ± 1.55	6.02 ± 0.89
B46	5.25 ± 0.85	4.98 ± 1.07	4.89 ± 0.81
B47	5.19 ± 0.66	4.18 ± 0.90	5.38 ± 0.85
B48	4.29 ± 0.40	4.98 ± 1.03	5.20 ± 0.93
B49	6.04 ± 0.69	3.95 ± 0.86	6.05 ± 0.53
B50	3.94 ± 0.42	4.14 ± 0.75	4.85 ± 0.56
B51	3.82 ± 0.26	4.62 ± 0.80	4.53 ± 0.73
B52	4.39 ± 0.67	4.18 ± 1.00	4.90 ± 0.64

*Ortalama±Standart sapma.

Sertlik: 1-Aşırı sert, 2-Çok sert, 3-Orta sert, 4-Hafif sert, 5-Hafif gevrek, 6-Orta gevrek, 7- Çok gevrek ve 8-Aşırı gevrek. Sululuk: 1-Aşırı kuru, 2-Çok kuru, 3-Orta kuru, 4-Hafif kuru, 5-Hafif sulu, 6-Orta sulu, 7-Çok sulu ve 8-Aşırı sulu. Lezzet yoğunluğu: 1-Aşırı zayıf, 2-Çok zayıf, 3-Orta zayıf, 4-Hafif zayıf, 5-Hafif güçlü, 6-Orta güçlü, 7-Çok güçlü ve 8-Aşırı güçlü.

Çizelge 4.8 Simmental sığır ırkına ait duyuşal sertlik, sululuk ve lezzet yoğunluğu puanları

Simmental Sığır Kodu	Sertlik	Sululuk	Lezzet yoğunluğu
S1	6.75 ± 0.42	5.67 ± 0.76	5.84 ± 0.76
S2	6.26 ± 1.16	3.97 ± 1.74	4.40 ± 1.70
S3	6.25 ± 0.76	5.34 ± 1.07	5.55 ± 1.32
S4	4.84 ± 0.94	5.22 ± 0.65	6.06 ± 0.65
S5	4.55 ± 0.87	4.97 ± 0.69	5.95 ± 1.18
S6	6.50 ± 0.90	5.14 ± 1.63	5.30 ± 1.51
S7	6.59 ± 0.67	5.62 ± 1.30	5.79 ± 0.45
S8	6.64 ± 0.93	5.14 ± 1.11	5.30 ± 0.98
S9	6.59 ± 0.38	5.34 ± 0.82	5.34 ± 1.33
S10	5.89 ± 0.70	4.36 ± 1.17	5.19 ± 0.85
S11	6.37 ± 0.98	5.87 ± 0.83	5.84 ± 0.69
S12	5.59 ± 0.98	4.97 ± 0.69	5.12 ± 1.00
S13	6.58 ± 0.98	4.82 ± 1.31	5.19 ± 1.40
S14	4.50 ± 1.23	4.30 ± 0.79	4.93 ± 0.94
S15	6.67 ± 0.99	5.34 ± 1.64	4.90 ± 1.51
S16	6.55 ± 0.83	4.30 ± 1.67	6.06 ± 0.75
S17	4.70 ± 0.84	5.70 ± 1.31	6.20 ± 1.22
S18	6.80 ± 0.58	5.70 ± 0.68	5.55 ± 1.38
S19	6.48 ± 0.59	5.07 ± 0.84	5.58 ± 1.15
S20	4.60 ± 0.66	4.20 ± 1.10	4.63 ± 0.68
S21	6.89 ± 0.75	5.08 ± 1.20	5.80 ± 1.18
S22	5.44 ± 0.52	3.80 ± 1.32	5.60 ± 0.82
S23	5.20 ± 0.45	5.46 ± 0.56	5.25 ± 0.58
S24	6.34 ± 0.50	4.76 ± 0.73	5.73 ± 0.91
S25	6.50 ± 0.87	4.90 ± 1.20	5.50 ± 0.76
S26	6.55 ± 0.80	5.69 ± 0.91	5.63 ± 0.94
S27	6.90 ± 0.97	5.46 ± 0.86	6.18 ± 0.94
S28	6.64 ± 0.56	5.59 ± 0.87	5.80 ± 0.76
S29	5.75 ± 0.62	4.59 ± 1.03	5.00 ± 1.04
S30	6.92 ± 0.59	5.14 ± 0.90	5.92 ± 1.57

Çizelge 4.8 Simmental sığır ırkına ait duyuşal sertlik, sululuk ve lezzet yoğunluğu puanları (devam)

Simmental Sığır Kodu	Sertlik	Sululuk	Lezzet yoğunluğu
S31	4.09 ± 0.92	4.55 ± 0.97	5.30 ± 0.88
S32	6.59 ± 1.12	4.22 ± 1.57	4.70 ± 1.25
S33	6.73 ± 0.88	4.93 ± 1.28	5.97 ± 0.90
S34	6.13 ± 0.75	4.54 ± 0.84	5.42 ± 1.16
S35	5.82 ± 0.25	5.04 ± 0.77	5.10 ± 0.59
S36	6.63 ± 0.52	5.10 ± 1.22	5.75 ± 1.18
S37	6.75 ± 0.99	5.47 ± 1.14	5.59 ± 1.36
S38	7.05 ± 0.24	5.80 ± 1.14	6.09 ± 0.74
S39	7.09 ± 0.38	5.75 ± 0.83	5.90 ± 0.67
S40	5.95 ± 0.75	4.98 ± 0.94	5.79 ± 1.01
S41	6.58 ± 0.74	4.46 ± 1.33	5.19 ± 1.52
S42	5.84 ± 1.04	5.95 ± 0.86	5.86 ± 1.53
S43	6.67 ± 0.69	5.25 ± 1.26	5.95 ± 0.98
S44	7.09 ± 0.74	4.39 ± 1.43	4.60 ± 1.79
S45	6.80 ± 0.51	5.67 ± 0.76	6.17 ± 0.52
S46	6.16 ± 1.10	3.62 ± 1.43	4.50 ± 1.69
S47	6.80 ± 0.60	5.62 ± 0.70	5.80 ± 0.52
S48	6.89 ± 1.18	5.60 ± 0.97	5.33 ± 1.07
S49	6.79 ± 0.91	5.79 ± 0.88	5.79 ± 0.81
S50	7.00 ± 0.80	5.60 ± 1.25	5.33 ± 1.11
S51	6.45 ± 0.64	4.66 ± 0.97	5.38 ± 0.73
S52	6.92 ± 0.74	5.59 ± 1.03	5.92 ± 1.03

*Ortalama±Standart sapma.

*Ortalama±Standart sapma. Sertlik: 1-Aşırı sert, 2-Çok sert, 3-Orta sert, 4-Hafif sert, 5-Hafif gevrek, 6-Orta gevrek, 7-Çok gevrek ve 8-Aşırı gevrek. Sululuk: 1-Aşırı kuru, 2-Çok kuru, 3-Orta kuru, 4-Hafif kuru, 5-Hafif sulu, 6-Orta sulu, 7-Çok sulu ve 8-Aşırı sulu. Lezzet yoğunluğu: 1-Aşırı zayıf, 2-Çok zayıf, 3-Orta zayıf, 4-Hafif zayıf, 5-Hafif güçlü, 6-Orta güçlü, 7-Çok güçlü ve 8-Aşırı güçlü.

Duyusal değerlendirmede sertlik özelliği bakımından Brangus ve Simmental ırklarının her ikisinin de “Aşırı sert (1)” ve “Çok sert (2)” puanlar almadıkları görölmüşür. Brangus ırkına ait etlerde “Orta sertten (3)-Çok gevrekliğe (7)” yakın, Simmental ırkına ait et örneklerinde ise “Hafif sertten (4)- Çok gevreklik (7)” arasında puanlar elde edilmiştir. Sululuk bakımından ise, her iki grupta da “Orta kurudan (3) Orta suluya (6) yakın” puan değerleri tespit edilmiştir.

Tüm çalışılan Brangus hayvan örneğinin panelistler tarafından duyusal olarak “sertlik” değerlendirmelerinin kümülatif ortalaması $4.99 \leq$ Hafif gevrek (5) olarak bulunmuştur. Hayvan örneklerine ait panelistler tarafından duyusal olarak “sululuk” değerlendirmelerinin kümülatif ortalaması 4.56 [Hafif kuru (4) $\leq 4.56 \leq$ -Hafif sulu (5)] olarak değerlendirilmiştir. Panelistler tarafından duyusal olarak “lezzet yoğunluğu” değerlendirmelerinin kümülatif ortalaması ise $5.12 \geq$ Hafif güçlü (5) olarak bulunmuştur.

Çalışılan Simmental hayvan örneklerinin panelistler tarafından duyusal olarak “sertlik” değerlendirmelerinin kümülatif ortalaması $6.26 \geq$ Orta gevrek (6) olarak bulunmuştur. Hayvan örneklerine ait panelistler tarafından duyusal olarak “sululuk” değerlendirmelerinin kümülatif ortalaması $5.04 \geq$ (Hafif sulu (5) olarak bulunmuştur. Panelistler tarafından duyusal olarak “lezzet yoğunluğu” değerlendirmelerinin kümülatif ortalaması ise 5.55 [(Hafif güçlü (5) $\leq$ -Orta güçlü (6)] olarak bulunmuştur.

Brangus ve Simmental ırkına ait hayvanlardan elde edilen sığır et örneklerinin duyusal değerlendirme sonuçlarının kümülatif ortalamalarının karşılaştırılması çizelge 4.9 ve şekil 4.3’te verilmiştir. Duyusal analiz parametlerinden sertlik özelliği iki ırk üzerinden karşılaştırıldığında, Simmental ırkına ait örneklerin Brangus örneklerinden önemli ölçüde daha gevrek olduğu ($p < 0.05$) saptanmıştır (Çizelge 4.9). Sululuk özelliği açısından yapılan karşılaştırmada ise Simmental grubu et örneklerinin Brangus grubu örneklerden önemli ölçüde daha sulu ($p < 0.05$) olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Simmental et örneklerinin Brangus grubu et örneklerine göre daha güçlü lezzet yoğunluğu ($p < 0.05$) skorlarına sahip olduğu görölmüşür. Lezzet yoğunluğu

bakımından yine her iki grup hayvanda da “Hafif zayıftan (4) Orta güçlü (6)” karakterde lezzet yoğunluğu puanları elde edilmiştir.

Dikeman vd. (2005) poligenik kalıtımın et kalite özellikleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmada, Angus, Brahman, Brangus, Charolais, Gelbvieh, Hereford, Limousin, Maine-Anjou, Red Angus, Salers, Shorthorn, Simbrah, Simmental, and South Devon ırklarından erkek sığırların yavrularından elde edilen etleri Warner-Bratzler kesme kuvveti ve duyuşal özellikler açısından incelemişlerdir. Simmental, Shorthorn ve Hereford erkek sığırlarda WBSF ile ilişkili olan beklenen genetik farklılıklar kapsamında gevrekliği genetik açıdan etkileyen önemli sayıda varyasyon bulunduğu bildirilmiştir. Çalışmaya göre istenilen düzeyde gevreklik ve sululuk için yapılan seçim anlamlı sonuçlar verebilir fakat lezzete göre seçim yapmak verimli olmamaktadır. Mozaikleşme oranından yola çıkarak seçim yapmak gevreklik açısından küçük bir etki yaratmaktadır; mozaikleşme, gevreklik ve sululuk büyük oranda kalıtılmaktadır. Araştırmacılar, et gevrekliğini genetik açıdan yönlendirmek için bir yöntem belirlemede mevcut DNA markırları ve genlerin saptanabileceğini ya da genetik testlerde gevreklik düzeyindeki farklılıkları gözlemlemek amacıyla hayvanların sınıflandırılmasında karkas gevrekliğini ön görmek üzerine bir yöntem geliştirmenin mümkün olabileceğini vurgulamışlardır.

Doydora vd. (2014) tarafından, ırkın sığır etlerinin duyuşal kalite özellikleri üzerine etkilerinin belirlendiği çalışmada, yaş aralığı 2’den 2.5’a kadar değişen Bali, Brahman, Philippine Native ve Simbreh olmak üzere 4 farklı sığır ırkı kullanılmıştır. Sığır et örneklerinin sağ ön çeyrekteki 9. ve 11. kaburgadan elde edilen pirzola 48 saat boyunca dinlendirilmiş ve duyuşal değerlendirme oturumuna kadar dondurulmuştur. Duyusal değerlendirme kapsamında lezzet, aroma, gevreklik ve sululuk gibi lezzetlilik ölçüsü olan parametrelerden yararlanılmıştır ve 7 puanlı beğeni ölçeği kullanılmıştır. Duyusal değerlendirmede Philippine Native ırkı etlerinde saptanmış olan bu dört duyuşal parametreye göre elde edilen genel kabul edilebilirlik puanı 4.76 değeri ile, diğer üç ırkın et örneklerinden daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Değerlendirmede Philippine Native ırkı et örneklerinin sırasıyla 4.28, 5.48 ve 3.96 olmak üzere daha yüksek gevreklik, lezzet ve sululuk puanları aldığı belirlenmiştir. Çalışmadaki genel

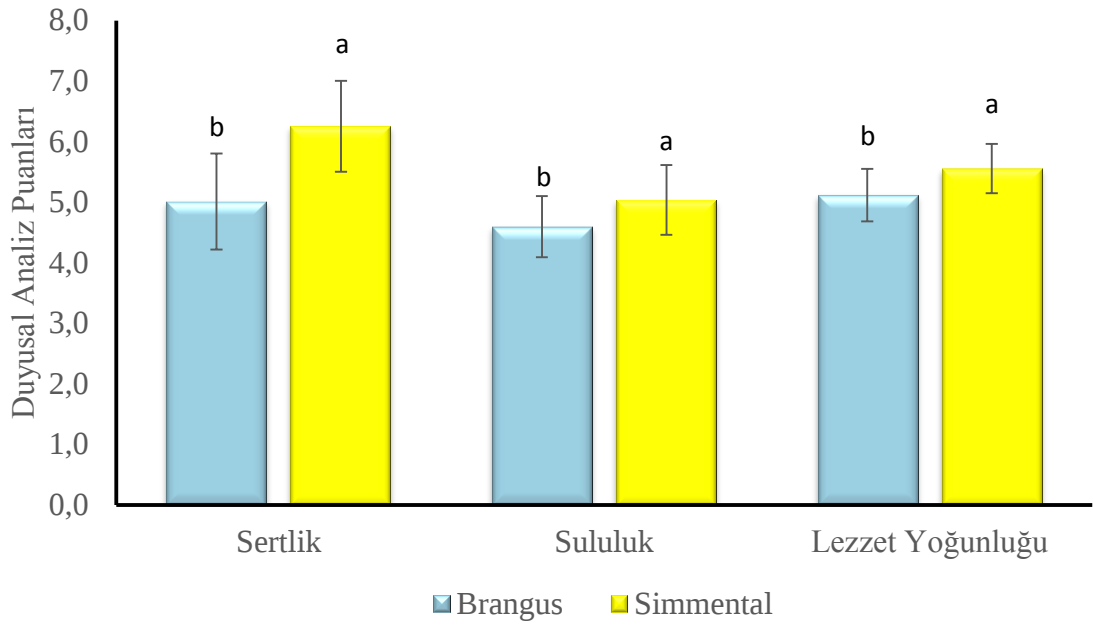
değerlendirmeler sonucu gevreklik ve sululuk arasında makul düzeyde bir korelasyon bulunurken, lezzet ve aroma arasında ise zayıf bir ilişki saptanmıştır ($p<0.01$). Diğer taraftan lezzetin aroma, gevreklik ve sululukla pozitif yönlü ilişkisi olduğu da ifade edilmiştir. Ayrıca aroma ve sululuk arasında önemli düzeyde güçlü bir korelasyon saptanmıştır ($p<0.01$). Bu sonuçlara göre sığır etinin duyu kalite özelliğinin lezzetlilik ölçüsü ile yakından ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Ortak değerlendirmeler bakımından ele alındığında ise tez çalışmasında 1-8 aralığında eğitimli panelistler tarafından değerlendirilen Simmental ırkı et örneklerinin Brangus ırkına göre daha gevrek, daha sulu ve lezzet yoğunluğunun daha yüksek olduğu saptanmıştır. Buna göre duyu sertlik ortalaması $6.26 \geq$ Orta gevrek olarak “sululuk” değerlendirmelerinin ortalaması $5.04 \geq$ (Hafif sulu) olarak “lezzet yoğunluğu” değerlendirmelerinin ortalaması ise 5.55 (Hafif güçlü) $\leq$ Orta güçlü olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.9 Brangus ve Simmental hayvan gruplarına ait duyu özelliklerinin karşılaştırılması *

Özellik	Hayvan ırkı	Puan	p değeri
Duyu sertlik	Brangus	5.00 ± 0.79^b	0.000*
	Simmental	6.26 ± 0.75^a	
Sululuk	Brangus	4.57 ± 0.50^b	0.000*
	Simmental	5.04 ± 0.58^a	
Lezzet yoğunluğu	Brangus	5.01 ± 0.43^b	0.000*
	Simmental	5.55 ± 0.41^a	

* $p<0.05$. n=52. *Ortalama $\pm$ Standart sapma.

Sertlik: 1-Aşırı sert, 2-Çok sert, 3-Orta sert, 4-Hafif sert, 5-Hafif gevrek, 6-Orta gevrek, 7-Çok gevrek ve 8-Aşırı gevrek. Sululuk: 1-Aşırı kuru, 2-Çok kuru, 3-Orta kuru, 4-Hafif kuru, 5-Hafif sulu, 6-Orta sulu, 7-Çok sulu ve 8-Aşırı sulu. Lezzet yoğunluğu: 1-Aşırı zayıf, 2-Çok zayıf, 3-Orta zayıf, 4-Hafif zayıf, 5-Hafif güçlü, 6-Orta güçlü, 7-Çok güçlü ve 8-Aşırı güçlü.



Şekil 4.3 Simmental ve Brangus ırklarının duyu analiz parametrelerine göre skorlarının karşılaştırılması

*Hata çubukları: $\pm$ standart sapma. ^{a-d}: Farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

Etlerde duyu özellikler genetik özelliklerin yanı sıra diğer faktörlerden de etkilenmektedir. Liang vd. (2016) gerçekleştirdikleri bir çalışmada, beş farklı tesisten alınan Çin yerli sarı melez ırkı sığırlara ait (toplam 25 hayvan) *Longissimus lumborum* kası üzerinden duyu değerlendirmeler yapmışlardır. *Longissimus lumborum* kasından alınan örnekler kesim sonrası 4°C’de 72 saat bekletildikten sonra Japon Karkas Sınıflandırma Standartları’na göre A1, A2, A3, A4 ve A5 olmak üzere 5 sınıfta değerlendirilmiş ve duyu değerlendirmeler de bu kategorizasyonla paralellik göstermiştir. Kalite sınıflandırmasında yağ ve nem içeriği baz alınmıştır. Her bir gruba ait etler sululuk, gevreklik ve lezzet kapsamında değerlendirilmiş olup A1 grubu etlerin kalitesinin en düşük, A4 ve A5 grubu etlerin kalitesinin ise daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Elde ettikleri bu sonuçlara göre Çin’deki Çin yerli sarı melez ırkı yetiştiriciliğinde yüksek kaliteli etçi sığır ırkı üretimine katkı sağlanabileceği de ileri sürülmüştür. İntramüsküler yağlanma oranı A1’den A5’e doğru artış göstermiştir. Çalışmada A1 sınıfındaki örneklerin intramüsküler yağlanma oranı % 4.26 iken A5 sınıfındaki etlerin intramüsküler yağlanma oranı % 24.55 olarak bulunmuştur. Nem miktarı ise yağ oranıyla ters orantılı bulunmuştur. Ortalama nem miktarı A1

kapsamındaki etlerde % 70.12 olarak bulunmuştur fakat bu oran A5 sınıfındaki örneklerde %58.03'e düşmüştür. Yağ oranı arttıkça nem oranında doğrusal biçimde azalma görülmüştür. A4 ve A5 sınıfındaki etlerin 6'dan yüksek ve yakın değerlere sahip olduğu göz önünde bulundurulduğunda her iki sınıfın da tüketici tarafından tercih edildiği fakat A5 sınıfı etlerin daha fazla yağ oranına sahip olmasından dolayı A4'ten daha çok talep görmesinin söz konusu olmadığı görülmüştür. Bu sebeple A4 sınıfında değerlendirilen etlerin müşteri memnuniyeti ve yağ miktarının maliyeti artırmasına bağlı olarak Çinli tüketiciler için optimal olduğu vurgulanmıştır. A2 ve A3 sınıfı etlerin duyusal değerlendirme puanlamaları ise 5'in üzerinde ve 6'ya yakın bulunmuştur. Bu sebeple bu iki sınıftaki etlerin de Çinli tüketiciler baz alındığında tercih edilebilir olduğu öne sürülmüştür.

4.6 Enstrümental Sertlik Değerleri

Brangus ve Simmental sığır ırklarına ait pişirilmiş et örneklerinde tekstür analiz cihazı ile ölçülen sertlik (hardness-Newton) değerleri sırasıyla çizelge 4.10 ve çizelge 4.11'de verilmiştir. Brangus sığır ırkına ait et örneklerinin sertlik değerleri incelendiğinde 52 hayvan grubundan elde edilen etlerde sertlik değerinin genel ortalamasının 196.97 ± 50.37 N olduğu görülmüştür (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.4). Bu grup hayvan ırkına ait etler içinde en yüksek sertlik değerine sahip örneğin 339.81 N ile 10 nolu Brangus'a, en düşük sertlik değerinin ise (en gevrek et örneği) 86.76 N ile 12 nolu Brangus'a ait olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.10). Simmental sığır ırkına ait örneklerde ise sertlik değerinin 52 hayvandan elde edilen et örnekleri için ortalama 116.41 ± 34.67 N olduğu, en yüksek sertlik değeri 14 nolu Simmental'den elde edilen et örneğinde (193.01 N) iken, en gevrek özellik gösteren et örneğinin ise 38 nolu hayvana ait olduğu (59.03 N) tespit edilmiştir.

Her iki sığır ırkına ait örneklerin genel sertlik değeri ortalamaları karşılaştırıldığında, Simmental gruptaki hayvanlardan elde edilen etlerin genel sertlik ortalamalarının Brangus gruptaki hayvanlardan elde edilen etlerin genel ortalamalarından istatistiksel olarak önemli ölçüde düşük olduğu ($p < 0.05$) bulunmuştur (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.4).

Çizelge 4.10 Brangus sığır ırkına ait enstrümental sertlik değerleri

Brangus	Sertlik (N)
B1	255.28 ± 27.01
B2	261.22 ± 33.91
B3	284.50 ± 26.26
B4	208.92 ± 26.53
B5	229.90 ± 18.15
B6	138.65 ± 15.96
B7	246.68 ± 28.60
B8	170.74 ± 27.01
B9	119.74 ± 6.96
B10	339.81 ± 22.81
B11	160.93 ± 15.33
B12	86.76 ± 34.23
B13	213.12 ± 31.70
B14	236.39 ± 27.71
B15	102.82 ± 12.90
B16	228.71 ± 18.94
B17	191.97 ± 48.93
B18	160.07 ± 13.5
B19	164.42 ± 23.66
B20	177.99 ± 30.57
B21	240.10 ± 17.93
B22	241.09 ± 17.30
B23	187.41 ± 0.18
B24	137.08 ± 17.45
B25	274.28 ± 34.98
B26	161.62 ± 25.30

Çizelge 4.10 Brangus sığır ırkına ait enstrümental sertlik değerleri (devam)

Brangus Sığır Kodu	Sertlik (N)
B27	141.38 ± 24.62
B28	214.89 ± 6.23
B29	156.87 ± 7.17
B30	137.39 ± 48.7
B31	204.54 ± 18.41
B32	170.59 ± 31.70
B33	203.38 ± 28.97
B34	279.41 ± 22.01
B35	181.23 ± 38.82
B36	200.63 ± 29.31
B37	172.32 ± 26.63
B38	232.60 ± 15.58
B39	228.18 ± 23.10
B40	178.58 ± 30.33
B44	214.02 ± 21.57
B45	253.17 ± 15.06
B46	211.92 ± 11.72
B47	229.42 ± 18.76
B48	180.23 ± 25.00
B49	173.87 ± 15.60
B50	159.87 ± 19.87
B51	187.47 ± 43.39
B52	246.72 ± 21.24

*Ortalama±Standart sapma.

Çizelge 4.11 Simmental sığır ırkına ait enstrümental sertlik değerleri

Simmental Sığır Kodu	Sertlik (N)
S1	79.45 ± 16.92
S2	104.96 ± 16.60
S3	105.91 ± 17.03
S4	185.61 ± 3.30
S5	109.67 ± 43.92
S6	105.28 ± 33.06
S7	108.39 ± 14.85
S8	105.19 ± 3.81
S9	69.40 ± 15.92
S10	138.62 ± 14.30
S11	100.68 ± 6.63
S12	174.81 ± 8.34
S13	110.79 ± 10.41
S14	193.01 ± 10.79
S15	96.29 ± 13.34
S16	136.79 ± 10.68
S17	166.37 ± 8.15
S18	113.30 ± 10.11
S19	102.84 ± 15.37
S20	182.89 ± 24.16
S21	76.08 ± 9.01
S22	148.99 ± 9.32
S23	140.39 ± 4.59
S24	115.34 ± 33.04
S25	72.43 ± 3.41
S26	78.55 ± 14.18

Çizelge 4.11 Simmental sığır ırkına ait enstrümental sertlik değerleri (devam)

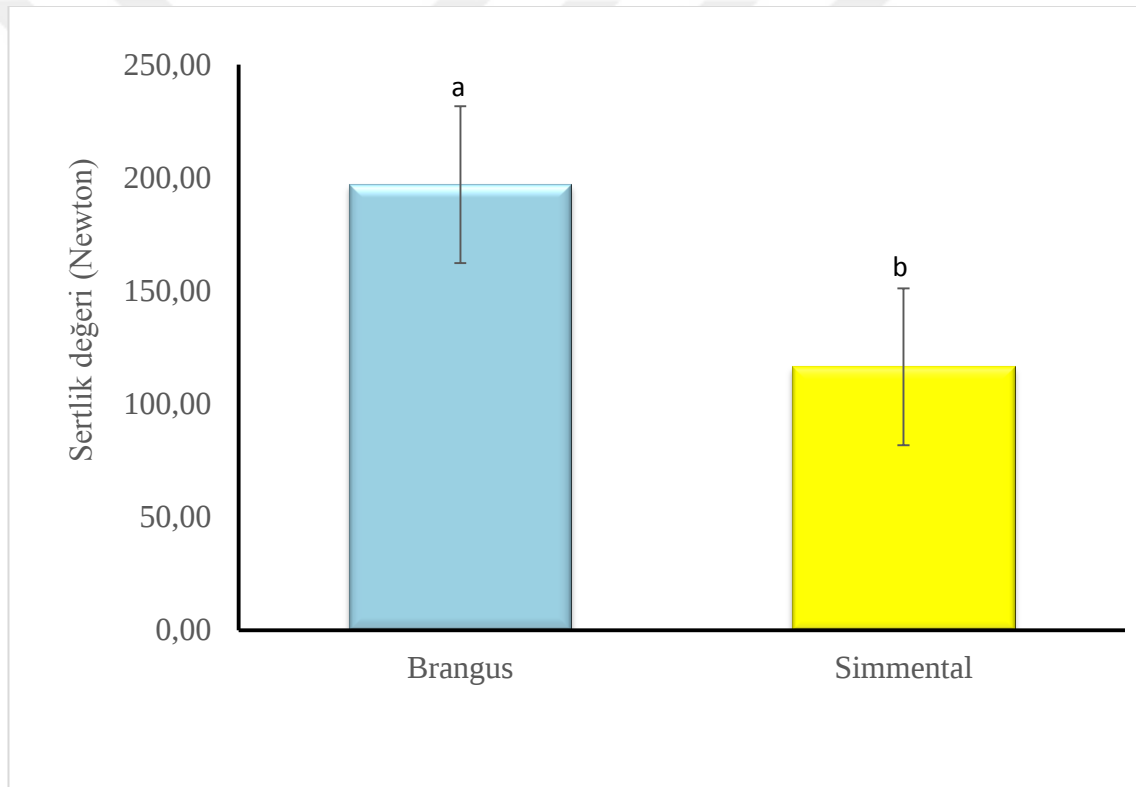
Simmental Sığır Kodu	Sertlik (N)
S27	138.27 ± 13.34
S28	119.19 ± 22.66
S29	128.71 ± 7.30
S30	71.57 ± 16.57
S31	190.06 ± 14.46
S32	143.82 ± 6.61
S33	84.07 ± 0.57
S34	105.15 ± 24.03
S35	165.62 ± 9.36
S36	117.40 ± 34.16
S37	90.19 ± 6.28
S38	59.03 ± 12.47
S39	103.67 ± 11.92
S40	144.95 ± 12.82
S41	103.99 ± 10.52
S42	160.39 ± 16.60
S43	86.49 ± 13.70
S44	101.65 ± 12.36
S45	109.83 ± 24.04
S46	140.42 ± 30.29
S47	134.43 ± 16.77
S48	79.53 ± 26.60
S49	134.59 ± 8.96
S50	69.97 ± 13.98
S51	76.36 ± 19.73
S52	72.33 ± 4.78

*Ortalama±Standart sapma.

Çizelge 4.12 Brangus ve Simmental hayvan gruplarına ait ortalama enstrümental sertlik değerleri (N)

Hayvan ırkı	Sertlik	p değeri
Brangus	196.96 ± 50.37 a	0.000*
Simmental	116.41 ± 34.67 ^b	

*p<0.05. n=52. *Ortalama±Standartsapma^{a-b}. Farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).



Şekil 4.4 Brangus ve Simmental hayvan gruplarına ait ortalama enstrümental sertlik değerleri (N)

Hata çubukları: ± standart sapma.^{a-b} Farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

Liang vd. (2016) yaptığı çalışma kapsamında *Longissimus lumborum*'dan elde edilen etlerin 55.43 N' den düşük ve 41.4 N'den yüksek olan WBSF değerleri sırasıyla sert ve gevrek olarak değerlendirilmiştir. Sert etler Çinli tüketiciler tarafından tercih edilmezken gevrek etlerin talep gördüğü de vurgulanmıştır.

Calvo vd. (2014), Parda de Montaña ve Pirenaica ırkı sığırlarda et gevrekliğiyle ilgili CAST ve CAPN1 genlerindeki olası mutasyonları araştırdıkları çalışmada gevrekliğin CAPN1'deki mutasyonlardan etkilenmediğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, CAST geninin intron 5 (BTA7: g.98533962CNG on UMD 3.0), exon 7 (g.98535683ANG) ve intron 12 (g.98545188TNA) bölgelerinde lokalize olan 3 SNP'nin, Parda de Montaña ırkında kesimden 7 gün sonraki et gevrekliği düzeyi ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu saptamışlardır. h2 ve h5 haplotiplerinin, CAST genindeki g.98535683ANG SNP'nin etkili bir mutasyon olabileceğine dair SNP ilişki düzeyi sonuçlarıyla tutarlılık göstererek et sertliği üzerinde önemli ölçüde etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Birmaduma (2019) tarafından Arsi, Bale ve Harar ırklarına ait sığırların *Longissimus dorsi* kasında Warner Bratzler (WB) kesme kuvveti ve duyusal özellikler üzerine cinsiyet, ırk ve mevsimin etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, WB kesme kuvveti ortalama değerinin ırklara göre önemli ölçüde değişiklik gösterdiği vurgulanmıştır. Harar ırkının enstrümental gevrekliği Bale ve Arsi ırklarına göre daha yüksek bulunmuştur. Farklı üç ırka ait etlerin gevreklik özelliklerindeki farklılığın genetik, çevresel veya her iki faktörün kombinasyonundan kaynaklandığı öne sürülmüştür. Bu bulguların, genç hayvanların etlerinin düşük WB kesme kuvveti değerlerine sahip olduğu, dolayısıyla etlerinin daha gevrek özellik gösterdiği ifade edilmiştir.

4.7 Enstrümental Sertlik Değerlerinin ve Duyusal Analiz Sonuçlarının Karşılaştırılması

Brangus ve Simmental grup hayvanların etlerinden elde edilen etlerde belirlenen duyusal özellikler ve enstrümental sertlik değerleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi

amacıyla yapılan Pearson korelasyon analizi sonuçları sırasıyla çizelge 4.13 ve çizelge 4.14'te verilmiştir.

Çizelge 4.13 Brangus grupta duyuşal analiz sonuçları ile enstrümental sertlik değęrlerinin Pearson korelasyon analizi sonuçları

		Duyusal sertlik	Sululuk	Lezzet yoğunluğu	Enstrümental sertlik
Duyusal Sertlik	r	1	0.678**	0.380**	-0.101
	p		0.000	0.005	0.478
Sululuk	r	0.678**	1	0.307*	-0.321*
	p	0.000		0.027	0.020
Lezzet Yoğunluğu	r	0.380**	0.307*	1	-0.077
	p	0.005	0.027		0.586
Enstrümental sertlik	r	-0.101	-0.321*	-0.077	1
	p	0.478	0.020	0.586	

*p<0.05; **p<0.001

Çizelge 4.14 Simmental grupta duyuşal analiz sonuçları ile enstrümental sertlik değęrlerinin Pearson korelasyon analizi sonuçları

		Duyusal sertlik	Sululuk	Lezzet yoğunluğu	Enstrümental sertlik
Duyusal Sertlik	r	1	0.280*	0.242	-0.769**
	p		0.044	0.083	0.000
Sululuk	r	0.280*	1	0.699**	-0.229
	p	0.044		0.000	0.103
Lezzet Yoğunluğu	r	0.242	0.699**	1	-0.316*
	p	0.083	0.000		0.022
Enstrümental sertlik	r	-0.769**	-0.229	-0.316*	1
	p	0.000	0.103	0.022	

*p<0.05; **p<0.001

Brangus grubunda yapılan korelasyon analiz sonucunda, duyuusal sertlik özelliğinin sululuk özelliğiyle %67.8 düzeyinde pozitif yönlü, lezzet yoğunluğu ile ise %38 düzeyinde pozitif yönlü olan önemli düzeyde ilişkisi saptanmıştır ($p<0.001$). Branguslarda, duyuusal sertlik özelliği ve lezzet yoğunluğu ile enstrümental sertlik değeri arasında ise istatistiksel açıdan önemli düzeyde ($p>0.05$) bir ilişki bulunmamaktadır (Çizelge 4.13). Ayrıca, sululuk özelliği ve lezzet yoğunluğu özelliği arasında %30.7 düzeyinde pozitif yönde önemli düzeyde ilişki bulunmuştur ($p<0.05$). Bununla birlikte, enstrümental sertlik değeri ile sululuk özelliğinin %32.1 düzeyinde negatif yönde önemli ölçüde ilişkisi olduğu saptanmıştır ($p<0.05$).

Simmental grupta, duyuusal sertlik ve sululuk özellikleri arasında %28 düzeyinde pozitif yönde önemli ölçüde ilişki belirlenmiş ($p<0.05$), ancak, duyuusal sertlik ile lezzet yoğunluğu arasında önemli düzeyde ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$) (Çizelge 4.14). Diğer yandan, sululuk ve lezzet yoğunluğu özellikleri arasında %69.9 düzeyinde önemli ölçüde pozitif düzeyde ilişki tespit edilmiştir ($p<0.001$). Enstrümental sertlik değeri ve sululuk arasında önemli düzeyde ilişki bulunmazken ($p>0.05$), lezzet yoğunluğu arasındaki %31.6 düzeyinde negatif yönde önemli ölçüde ilişki saptanmıştır ($p<0.05$). Simmental grupta dikkat çeken en önemli nokta, enstrümental sertlik değeri ve duyuusal sertlik özelliği arasında yüksek düzeyde negatif korelasyon belirlenmiş olup, bu korelasyonun %76.9 oranında ve önemli ölçüde olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$).

Gagaoua vd. (2016) tarafından yürütölen çalışmada, sekiz farklı ırktan (Limousin, Blond d'Aquitaine, Angus, Holstein ırklarına ait kastre edilmemiş genç erkek sığırlar; Belçika-Blue×Holstein, Charolais×Friesian ırklarına ait kastre edilmiş erkek sığırlar; Belçika-Blue×Friesian ve Angus×Friesian ırklarına ait genç dişi sığırlar) olmak üzere toplam 265 sığır kullanılarak, farklı hayvanlarda karkas karakteristiklerinin duyuusal özelliklerle ilişkisi Pearson korelasyonu ile değerlendirme yapılmıştır. Duyusal özelliklerden yola çıkarak dört hayvana ait genel beğeni düzeyi lezzet özelliğiyle pozitif korelasyon, istenmeyen lezzetle ise negatif korelasyon göstermektedir. Angus x Friesian genç dişi sığırlar dışındaki hayvan tipleri için et lezzeti ve istenmeyen lezzet arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur. Genel beğeni düzeyi Charolais×Friesian kastre edilmiş erkek sığırlar dışındaki tüm hayvanlar için gevreklikle ilişkili bulunmuştur.

Buna ek olarak, gevreklik diğer üç hayvan ırkı için sululukla ve lezzetle pozitif korelasyon göstermiştir. Gevreklik, Limousin ($r=0.43$), Angus×Friesian ($r=0.34$) ve Belçika-Blue×Holstein ($r=0.39$) sığırlarında sitrat sentaz aktivitesiyle (CS) korelasyon göstermiştir.

4.8 Enstrümental Sertlik ve Duyusal Özelliklerin Polimorfizm Durumuna Göre Karşılaştırılması

Brangus ve Simmental ırkı hayvanlarda ($n=104$) belirlenen 13 varyasyonun bulunma durumuna göre enstrümental sertlik değerleri ile duyusal sertlik, sululuk ve lezzet yoğunluğu puanlarındaki önemli düzeyde etkilerinin karşılaştırılması amacıyla gerçekleştirilen “t testi” sonuçları sırasıyla çizelge 4.15 ve çizelge 4.16’da verilmiştir.

Çizelge 4.15 Brangus ırkında polimorfizm durumuna göre enstrümental sertlik (N) değeri, duyuusal sertlik, sululuk ve lezzet yoğunluğu puanlarının karşılaştırılması

Varyasyon Kodu	Varlığı	n ¹	Enstrümental sertlik	p değeri	Duyuusal sertlik	p değeri	Sululuk	p değeri	Lezzet yoğunluğu	p değeri
V1	Yok	25	189.60 ± 57.13	0.315	5.23±0.80	0.033*	4.61±0.59	0.611	5.24±0.48	0.052
	Var	27	203.78 ± 43.15		4.78±0.72		4.54±0.47		4.79±1.01	
V2	Yok	35	185.07 ± 52.40	0.013*	5.13±0.79	0.068	4.57±0.56	0.984	5.17±0.43	0.038*
	Var	17	221.46 ± 36.09		4.71±0.72		4.57±0.45		4.67±1.26	
V3	Yok	48	196.82 ± 51.27	0.945	4.96±0.79	0.256	4.56±0.54	0.606	5.09±0.43	0.008*
	Var	4	198.65 ± 43.97		5.43±0.59		4.70±0.36		3.97±2.66	
V4	Yok	36	190.03 ± 51.35	0.138	5.10±0.75	0.146	4.60±0.55	0.510	5.17±0.44	0.033*
	Var	16	212.56 ± 45.78		4.76±0.83		4.50±0.48		4.64±1.29	
V5	Yok	45	191.94 ± 51.03	0.068	5.12±0.76	0.003*	4.62±0.53	0.076	5.14±0.43	0.003*
	Var	7	229.25 ± 32.54		4.20±0.37		4.25±0.36		4.16±1.87	
V6	Yok	50	199.22 ± 49.87	0.108	4.97±0.79	0.283	4.54±0.52	0.061	4.99±0.84	0.440
	Var	2	140.67 ± 29.61		5.58±0.28		5.25±0.07		5.46±0.12	
V7	Yok	51	196.82 ± 50.85	0.000*	5.00±0.79	0.755	4.57±0.53	0.931	5.11±0.43	0.000*
	Var	1	204.53		4.75		4.62		5.04	
V8	Yok	52	196.96 ± 50.36		5.00±0.78	-	4.57±0.52	-	5.01±0.83	-
	Var	0	-		-		-		-	
V9	Yok	52	196.96 ± 50.36	0.201	5.00±0.78	0.233	4.57±0.52	0.422	5.01±0.83	0.815
	Var	0								
V10	Yok	47	195.07 ± 50.81	0.410	4.97±0.78	0.429	4.54±0.53	0.126	4.99±0.86	0.570
	Var	5	214.80 ± 47.03		5.26±0.84		4.91±0.38		5.21±0.35	
V11	Yok	51	197.06 ± 50.86	0.921	4.99±0.79	0.870	4.57±0.53	0.919	5.01±0.83	0.897
	Var	1	191.96		5.13		4.63		4.90	
V12	Yok	51	196.93 ± 50.86	0.975	4.98±0.78	0.336	4.57±0.53	0.937	5.01±0.83	0.946
	Var	1	198.56		5.75		4.61		5.06	
V13	Yok	52	196.96 ± 50.37		5.00±0.78	-	4.57±0.52	-	5.01±0.83	-
	Var	0	-		-		-		-	

*Ortalama±Standart sapma; ¹: varyasyon sayısı; p< 0.05

Çizelge 4.16 Simmental ırkında polimorfizm durumuna göre enstrümental sertlik (N) değeri, duyuusal sertlik, sululuk ve lezzet yoğunluğu puanlarının karşılaştırılması

Varyasyon		n ¹	Enstrümental sertlik	p değeri	Duyusal sertlik	p değeri	Sululuk	p değeri	Lezzet yoğunluğu	p değeri
Kodu	Varlığı									
V1	Yok	9	120.63 ± 44.96	0.695	6.05±0.84	0.363	5.08±0.63	0.794	5.64±0.44	0.498
	Var	43	115.52 ± 33.13		6.30±0.73		5.03±0.57		5.54±0.40	
V2	Yok	10	114.47 ± 46.65	0.848	6.15±0.85	0.614	5.07±0.59	0.835	5.68±0.44	0.268
	Var	42	116.87 ± 32.32		6.28±0.73		5.03±0.58		5.52±0.40	
V3	Yok	52	116.41 ± 35.00	-	6.26±0.75	-	5.04±0.58	-	5.55±0.41	-
	Var	0	-		-		-		-	
V4	Yok	29	108.92 ± 34.85	0.083	6.39±0.67	0.151	5.09±0.57	0.470	5.63±0.37	0.115
	Var	23	125.85 ± 33.57		6.09±0.83		4.97±0.59		5.46±0.44	
V5	Yok	33	117.44 ± 33.53	0.782	6.21±0.72	0.580	5.13±0.53	0.125	5.63±0.36	0.076
	Var	19	114.61 ± 38.29		6.33±0.81		4.88±0.62		5.42±0.45	
V6	Yok	52	116.41 ± 35.00	-	6.26±0.75	-	5.04±0.58	-	5.55±0.41	-
	Var	0	-		-		-		-	
V7	Yok	47	113.78 ± 33.10	0.098	6.33±0.67	0.028*	5.08±0.57	0.129	5.57±0.40	0.475
	Var	5	141.08 ± 46.70		5.56±1.18		4.66±0.49		5.43±0.52	
V8	Yok	41	120.45 ± 36.57	0.026*	6.14±0.80	0.035*	4.98±0.60	0.141	5.50±0.42	0.072
	Var	11	99.84 ± 22.67		6.68±0.20		5.27±0.41		5.75±0.31	
V9	Yok	50	114.99 ± 34.64	0.147	6.28±0.76	0.262	5.05±0.58	0.516	5.57±0.41	0.189
	Var	2	151.75 ± 32.59		5.67±0.12		4.78±0.27		5.18±0.09	
V10	Yok	52	116.41 ± 35.00	-	6.26±0.75	-	5.04±0.58	-	5.55±0.41	-
	Var	0	-		-		-		-	
V11	Yok	52	116.41 ± 35.00	-	6.26±0.75	-	5.04±0.58	-	5.55±0.41	-
	Var	0	-		-		-		-	
V12	Yok	52	116.41 ± 35.00	-	6.26±0.75	-	5.04±0.58	-	5.55±0.41	-
	Var	0	-		-		-		-	
V13	Yok	38	113.41 ± 34.36	0.346	6.35±0.69	0.160	5.14±0.53	0.026*	5.60±0.39	-
	Var	14	124.03± 36.87		6.01±0.88		4.75±0.62		5.44±0.44	-

*Ortalama±Standart sapma; ¹: varyasyon sayısı; p< 0.05

V1 varyasyonu Branguslarda 27 hayvanda tespit edilmiş, 25 hayvanda ise bulunmamıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, V1 varyasyonunun var olup olmama durumuna göre, sadece duysal sertlik özelliği üzerine önemli ölçüde etkili olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Duyusal analizde panelistlerin V1 varyasyonu olan hayvanların etlerini daha sert [4.78: Hafif sert (4) $\leq$ 4.78 $\geq$ Hafif gevrek (5)], V1 varyasyonu bulunmayanların ise daha gevrek [5.23: Hafif gevrek (5) $\leq$ 4.78 $\geq$ Orta gevrek (6)] olarak puanladıkları görülmüştür ($p<0.05$) (Çizelge 4.15). Bununla birlikte, Simmental grupta, 43 hayvanın et örneklerinde belirlenen V1 varyasyonunun test edilen duysal sertlik özelliği açısından önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$) (Çizelge 4.16).

V2 varyasyonun her iki grup için değerlendirildiğinde sadece Brangus'ta enstrümental sertlik ve lezzet yoğunluğu açısından önemli ölçüde etkili olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Brangus grupta 17 hayvanda bulunan, 35 hayvanda ise tespit edilmeyen V2 varyasyonunun var olduğu hayvanların etlerinde belirlenen ortalama enstrümental sertlik değeri 221.46 N, var olmayanlarınkinde ise 185.07 N olarak saptanmıştır. Lezzet yoğunluğu puanları ise V2 varyasyonu bulunan örneklerde 4.67 [Hafif zayıf (4) $\leq$ 4.67 $\geq$ Hafif güçlü (5)]; varyasyon bulunmayanlarda ise 5.17 [Hafif güçlü (5) $\leq$ 5.17 $\geq$ Orta güçlü (6)] olarak belirlenmiştir. V2 varyasyonu olan Brangus grup etlerin lezzet yoğunluğunun varyasyon olmayanlara göre daha düşük olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Simmental grupta V2 varyasyonunun duysal ve enstrümental kalite özellikleri üzerine önemli bir etkisinin olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

V3 ve V4 varyasyonları ise Simmental grup için hiçbir özellik üzerinde önemli etkili olmamış, bununla birlikte Brangus grupta, lezzet yoğunluğu üzerine önemli ölçüde etkili olduğu görülmüştür. Duyusal analizde V3 varyasyonunun bulunduğu Brangus ırkına ait 4 hayvanın etleri, lezzet yoğunluğu açısından ortalama 3.97 [$\leq$ Hafif zayıf (4)] puan almış, varyasyon bulunmayan 48 hayvana ait lezzet yoğunluğu puanı ise ortalama 5.09 [Hafif güçlü (5) $\leq$ 5.17 $\geq$ Orta güçlü (6)] olarak belirlenmiştir. Yine, Brangus grupta V4 varyasyonu bulunan hayvanların et örneklerinin lezzet yoğunluğu puanları ortalama 4.64 [Hafif zayıf (4) $\leq$ 4.64 $\geq$ Hafif güçlü (5)], bulunmayanların ise 5.17 [Hafif güçlü (5) $\leq$ 5.17 $\geq$ Orta güçlü (6)] düzeyinde saptanmıştır.

Simmental grupta 19 hayvanda tespit edilmesine rağmen değerlendirilen kalite parametreleri üzerine önemli bir etkisi olmayan ($p>0.05$) V5 varyasyonu, Brangus'larda sadece 7 hayvanda bulunmuş ve bu grupta duysal sertlik ve lezzet yoğunluğu açısından önemli ölçüde etkili olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Duysal sertlik değeri V5 varlığı belirlenen Brangus hayvan ırkına ait etlerde duysal sertlik puanı ortalama 4.20 [Hafif sert (4) $\leq 4.20 \geq$ Hafif gevrek (5)]; varyasyon varlığı saptanmayan hayvanların örneklerinde ise ortalama 5.12 [Hafif gevrek (5) $\leq 5.12 \geq$ Orta gevrek (6)] bulunmuştur. Lezzet yoğunluğu puanı ise varyasyon görülen Brangus grupta 4.16 [Hafif zayıf (4) $\leq 4.16 \geq$ Hafif güçlü (5)], görülmeyen grupta ise 5.14'tür [Hafif güçlü (5) $\leq 5.14 \geq$ Orta güçlü (6)].

Simmental grupta hiç tespit edilmeyip, Brangus grupta sadece 2 hayvanda bulunan V6 varyasyonu değerlendirilen kalite özellikleri üzerine etkisi istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).

Brangus ırkı hayvanlardan sadece B31 kodlu hayvanda saptanan V7 varyasyonu enstrümental sertlik ve lezzet yoğunluğu parametreleri üzerine etkili bulunmuştur ($p<0.05$). V7 varyasyonu saptanan bu hayvanda enstrümental sertlik değeri 204.53 N iken, V7 varyasyonu tespit edilmeyen diğer 51 hayvanda ortalama 196.82 N olarak tespit edilmiştir. Lezzet yoğunluğu puanı ise B31 kodlu hayvana ait örneklerde 5.04 (Hafif güçlü), varyasyon bulunmayan diğer 51 hayvana ait örneklerde ise ortalama 5.11 (Orta güçlü) olarak saptanmıştır.

Brangus ırka ait hiçbir hayvanda tespit edilmeyen V8 varyasyonu, Simmental grupta çalışılan 52 hayvandan 11'inde bulunmuş; enstrümental ve duysal sertlik parametreleri üzerine önemli etki göstermiştir ($p<0.05$). Bu varyasyonun görüldüğü Simmental grupta enstrümental sertlik değeri ortalama 99.84 N ve duysal sertlik puanı 6.68 [Orta gevrek (6) $\leq 6.68 \geq$ Çok gevrek (7)]; varyasyon görülmeyen 41 hayvanda ise bu değerler sırasıyla 120.45 N ve 6.14 [Orta gevrek (6) $\leq 6.14 \geq$ Çok gevrek (7)] olarak belirlenmiştir.

Brangus grupta hiç bulunmayan V9 varyasyonu Simmental grupta 2 hayvanda tespit edilmiş olup, test edilen kalite özellikleri üzerine önemli bir etkisi saptanmamıştır ($p>0.05$).

Simmental grupta hiç bulunmayan V10 varyasyonu ise Brangus grupta 5 hayvanda görülmüş; ancak, yine test edilen kalite özellikleri üzerine önemli bir etkisi saptanmamıştır ($p>0.05$).

Simmental ırkına ait hayvanların hiçbirinde tespit edilmeyen V11 ve V12 varyasyonları, Brangus ırkında sadece 1'er hayvanda (V11: B17 kodlu hayvan, V12: B42 kodlu hayvan) bulunmuş, ancak, incelenen kalite özellikleri üzerine istatistiksel olarak önemli bir etki yapmadıkları görülmüştür ($p>0.05$).

V13 varyasyonu ise Brangus ırkına ait hiçbir hayvanda tespit edilmemiştir. Simmental grupta ise 14 hayvanda bulunan bu varyasyon sadece sululuk özelliğini önemli ölçüde etkilemiş olup, varyasyon bulunan hayvanların etlerine ait sululuk puan ortalamaları 4.75 [Hafif kuru (4) $\leq$ 4.75 $\geq$ Hafif sulu (5)], varyasyon bulunmayan 38 hayvanın etlerinde ise 5.14 [Hafif sulu (5) $\leq$ 5.14 $\geq$ Orta sulu (6)] olarak belirlenmiştir.

Brangus'larda duyusal sertlik V1 ve V5 varyasyonu olma durumuna göre önemli farklılık göstermekte olup ($p<0.05$) V1 varyasyonu olan Brangus'ların "duyusal sertlik" düzeyi, bu varyasyonu taşımayan Brangus'lardan önemli derecede daha yüksektir ($p<0.05$). V5 varyasyonu olan Brangus'ların "duyusal sertlik" düzeyi de bu varyasyonu bulunmayan Brangus'lardan önemli derecede daha yüksektir ($p<0.05$). Brangus'larda lezzet yoğunluğu V2, V3, V4, V5 ve V7 varyasyonu olma durumuna göre önemli düzeyde farklılık göstermekte olup, varyasyonu olmayanların lezzet yoğunluğu varyasyon olanlardan önemli derecede daha yüksektir ($p<0.05$). Brangus'larda sululuk ortalaması ise varyasyon varlığına göre önemli farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). Diğer bir ifade ile 13 farklı varyasyon olan ve olmayanların sululuk düzeyleri aynı seviyededir.

Sululuk düzeyleri incelendiğinde; Simmental hayvan ırkında V13 varlığına göre sululuk düzeyinin önemli derecede farklılık gösterdiği görülmüş olup, V13 görülen örneklerin sululuk düzeylerinin varyasyon görülmeyenlerden önemli derecede daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$)

Curi vd. (2009), 114 Nellore ırkı, 67 Angus x Nellore melezi, 41 Canchim ırkı, 19 Brangus melezi ve 15 Braunvieh melezi olmak üzere toplam 300 hayvanda, sırasıyla CAPN1 ve CAST genlerinde bulunan tek nükleotit polimorfizmlerin alelik ve genotipik frekanslarını, ayrıca, bu polimorfizmler ile et kalite özellikleri arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Genotip ile et gevrekliği (kesme kuvveti) ile miyofibrillar fragmentasyon indeksi arasında önemli bir ilişki olduğunu, bu ilişkinin CT genotipinde TT genotipinden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca, tüm örneklerde, genotip ve

kesme kuvveti arasında önemli bir ilişki belirlenmiş olup, AA genotipinde bu ilişkinin AG genotipinden daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Pinto vd. (2010)'nın *Bos taurus*'taki gevreklikle ilişkili tek nükleotid polimorfizmlerin Nellore sığır ırkında polimorfizm durumlarını araştırdıkları çalışmada, belirli bir alel bulunmaması ve tüm markırlar için alel frekansının %1'in üzerinde olması nedeniyle CAPN4751, CAPN4753, UOGCAST, WSUCAST markırları Nellore'da polimorfik olarak değerlendirilmiştir. Tespit edilen CAPN4751, *Bos taurus* ve *Bos indicus* ırklarında et gevrekliğiyle ilişkili olduğu saptanan CAPN1 genindeki ilk markırdır.

μ -kalpain (CAPN1) ve kalpastatin (CAST) genlerindeki biyobelirteçlerin et gevrekliğiyle ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Allais vd. 2011). Buna ek olarak Wright vd. (2018) Angus–Brahman çoklu ırk popülasyonunu kullanarak μ -kalpainin aktivasyon oranının gevrekleştirme sürecinde etkili olduğunu göstermiştir. Bu popülasyondaki Brahman ırkıyla daha ilişkili olan hayvanların μ -kalpainin aktivasyonunun daha yavaş olduğu ve lezzetinin daha az olduğu öne sürülmüştür. *Bos indicus* ve *Bos taurus* ırklarında GG genotipinin gevreklik üzerinde istenmeyen bir etkisinin olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Charolais ($1.60 \pm 0.61 \text{ N/cm}^2$) ve Limousin ($0.90 \pm 0.37 \text{ N/cm}^2$) ırkında G alelinin WBSF üzerinde negatif yönde etkisinin olduğu da vurgulanmıştır.

McClure vd. (2012) tarafından 3360 sığırdaki genotipleme yapılmış, çalışmalarında, çeşitli ırklarda farklı lezzet özellikleri üzerine olan etkilerinin değerlendirildiği çok sayıda genetik markır tespit etmişlerdir. WB kesme kuvveti ile ilişkili olan 79 genomik bölge saptanmış ve beş ırkın üçünde yalnızca 42 tanesi, beş ırkın tümünde ise yalnızca 8 tanesi ortak markır bulunmuştur.

Sun vd. (2018), yaptıkları çalışmada 132 Chinese Simmental sığır ırkında CAPN1 ve CAST genotipleri ve et kalite özellikleri arasındaki ilişkiyi tespit etmek amacıyla bu genlerdeki SNP'leri analiz etmiş ve tanımlamışlardır. Pişirilmiş etin lezzet kalitesinde önemli katkısı olan gevreklik kriteri kesme kuvveti ile değerlendirilmiştir. Daha önceki benzer çalışmalarda da olduğu gibi (Allais vd. 2011, Curi vd. 2009) CAPN1

markırlarının sığır etinde kesme kuvveti üzerine önemli etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Polimorfizmler DNA sekans havuzundan elde edilmiş olup, çalışmada sığır CAPN1 geninin ekzon 1 ile ekzon 6 arasında olduğu ve CAST geninin de exon 9'da olmak üzere toplam 3 SNP tanımlanmış ve bu polimorfizmlerin CAPN1 geninde ekzon 4 ve ekzon 2'de, CAST geninde ise ekzon 9'da lokalize olduklarını tespit etmişlerdir. Bulunan CAPN1 4558 A>G, CAPN1 4684 C>T ve CAST 596 T>C içeren bu SNP'ler, PCR-SSCP ile başarılı biçimde genotiplendirilmiştir. Çalışmaya göre tüm SNP'lerin, her popülasyonda 2 alel ve 3 genotip içerdikleri bildirilmiştir. Elde edilen veriler CAPN1 4558 A>G değişiminin mozaikleşme düzeyi (BMF) ve kesme kuvveti değeri (SFV) ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu ortaya koymuştur ve CAPN1 4684 C>T değişiminin Çin Simmental sığır ırkının kesme kuvveti değeri üzerinde önemli etkisi olduğu tespit edilmiştir. Böylece bu genetik markırların hayvan yetiştiriciliğinde popülasyon seçimi açısından kullanışlı olabileceği vurgulanmıştır. Buna ek olarak CAST geninde belirlenen SNP'lerle kesme kuvveti değerlerini de içine alan et kalite özellikleri arasında Çin Simmental sığır popülasyonunda önemli bir ilişki bulunmamış, dolayısıyla bu SNP'lerin Çin Simmental sığırındaki et kalite özellikleri açısından güçlü birer markır olmaları da söz konusu edilmemiştir.

Leal-Gutiérrez vd. (2018)'nin yaptığı çalışmada kalpastatinin biyolojik fonksiyonu ve et gevrekliğiyle ilişkisi sebebiyle uygun bir aday gen olduğu öne sürülmüştür. Ayrıca kullanılan Angus- Brahman çapraz ırkı popülasyonunun gevreklikle ilişkili fonksiyonel polimorfizmlerin segregasyonunu artıracakı vurgulanmıştır. Angus sığır ırkı (*Bos taurus*), *Bos indicus*'a kıyasla daha gevrek ve et kalitesinin yüksek olması nedeniyle tercih edilmektedir. Bu sebeple, çapraz ırkların iki safkan ırk popülasyonundan elde edilen yüksek düzeydeki gevreklikle ilişkili alelleri aktarması beklenmektedir.

Leal-Gutiérrez ve Mateescu (2019), diğer bir çalışmada, G alelinin Charolais ($1.60 \pm 0.61 \text{ N/cm}^2$) ve Limousin ($0.90 \pm 0.37 \text{ N/cm}^2$)'de WBSF üzerine negatif bir etkiye sahip olduğunun tahmin edildiğini ileri sürmüşlerdir. Çalışmada, CC genotipine sahip olan Angus, Hereford ve Limousin melez hayvanlarından elde edilen WBSF değerlerinin %11 oranında CG ve %17 oranında GG genotiplerinden daha düşük düzeyde olduğu bildirilmiştir. CAPN316 varyasyonunun, daha düşük WBSF değerleriyle

ilişkilendirilmiş olan ve tercih edilen C aleli saptanmış *Bos taurus* popölasyonlarında olumlu etkisi doğrulanmıştır.

Iguácel vd. (2019) tarafından saptanan SNP'lerden biri, tez çalışmasında bulunan rs210072660 ile aynıdır. Ensembl verilerine göre %44 MAF değerine sahip olan bu polimorfizm, çalışmada değerlendirmeye alınan iki sığır ırkından biri olan 52 Brangus'tan 16'sında bulunmuş olup, önemli düzeyde lezzet yoğunluğunu azaltıcı yönde etkisinin olduğu ortaya konmuştur. Aynı rs numaralı polimorfizm, çalışılan diğer grup olan 52 adet Simmental ırkının 23'ünde rastlanmasına rağmen hiçbirinin etinde duyusal ve enstrümental parametrelerde önemli düzeyde bir fark yaratmamıştır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Et endüstrisinde kalite, uzun raf ömrü, daha yüksek lezzet ve müşteri memnuniyeti için daha iyi sonuçlar elde etmek amacıyla uygulanan klasik yöntemlere alternatif olarak modern teknolojiler ve yöntemlerin kullanılması, beklentileri çok daha olumlu yönde etkilemektedir. Bu yöntemlerin ortaya koyduğu genetik biyoışaretleyicilerin (farklı genler ve farklı varyasyonlar) kullanılması, istenilen düzeyde kaliteli et üretimine en ekonomik biçimde katkı sağlayacak unsurlardır. En önemli kalite unsurlarından olan et gevrekliğinin belirlenmesi amacıyla ülkemizde yaygın olan iki sığır ırkına (Simmental ve Brangus) ait duyuusal ve tekstürel karşılaştırmaların yanı sıra, et gevrekliği üzerine önemli etkilere sahip olduğu bilinen polimorfizmleri bulundurması nedeniyle CAST geninde genetik biyoışaretleyici analizleriyle değerlendirmeler yapılmıştır.

Önceki çalışmalardan farklı olarak, bu çalışmada geniş DNA (Deoksiribonükleik Asit) bölgelerini aynı anda analiz edebilme, ucuz maliyet ve güvenilir sonuç verme gibi üstünlükleri bulunan NGS (Yeni Nesil Dizileme-Next Generation Sequencing) yöntemi kullanılmış olup, böylece çok sayıda varyasyon eş zamanlı olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada NGS ile 52'şer Brangus ve Simmental ırklarına ait CAST geninde tüm gen analizi yapılmış olup, toplam 104 hayvanda 13 varyasyon (V1 -V13) tespit edilmiştir. 20 Brangus ve 9 Simmental ırkında olmak üzere tüm hayvanların 29'unda hiç bir varyasyon tespit edilmemiştir. Toplamda her iki ırka ait 75 hayvanda rastgele dağılım göstermiş olan bu 13 varyasyondan 5'i sadece Brangus'ta, 3'ü sadece Simmental'de, diğer 5 tanesi ise her iki ırka ait et örneklerinde tespit edilmiştir. Sadece 2 Brangus'ta saptanmış olan V6 (EKZON 8 c.439C>G/p.L147LV) ve 14 Simmental'de belirlenmiş olan V13 (INTRON 18 c.1335+6G>A) varyasyonları önceden rapor edilmemiş olduğundan bu iki varyasyonun olası yeni varyantlar olarak literatüre kazandırılması değerlendirilebilir. 17 Brangus ve 42 Simmental sığır ırkında saptanan, yüksek MAF değerine sahip olması nedeniyle polimorfik özellik gösteren V2 kodlu (EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E splice) varyasyonunun splice bölgede bulunması nedeniyle olası patojenik nitelikte olduğu gözlenmiştir. Bu varyasyonun Brangus ırkında lezzet yoğunluğu ve enstrümental sertlik üzerine önemli düzeyde kabul edilen olumsuz

etkilerine rağmen Simmental hayvan ırkında enstrümental ve duyuşal kalite özellikleri üzerine önemli bir etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir.

Et sertliği üzerine etkili olan kalpastatin (CAST) geninde saptanmış olan rs210072660 veri giriş numaralı V4 kodlu EKZON 9 c.583A>G/p.T195A varyasyonu, 52 Brangus'tan 16'sında tespit edilmiş olup "lezzet yoğunluğunu azaltıcı" yöndeki etki ile korele olduğu düşünülmüştür.

Simmental sığır ırkında tespit edilen 13 varyasyondan hiçbirinde düşük frekans varyasyon (minör alel frekansı) değerleri elde edilmemiştir. Fakat Brangus örneklerine ait 3 varyasyondan çalışmada V6 olarak kodlanmış olan EKZON 8 c.439C>G/p.L147LV varyasyonu sadece 2 Brangus'ta, V11 olarak kodlanmış EKZON 20 c.1510C>T/p.P504S ve V12 olarak kodlanmış INTRON 6 c.373-3C>T varyasyonları ise her iki ırka ait birer hayvanda saptanmış olan ve düşük sıklıkla görülen aleli refere eden MAF (Minor Allel Frequency- Minör alel frekansı) değerine sahip varyasyonlar olarak değerlendirilmiştir. Fakat MAF değerleri %1'in altında olan bu üç varyasyonda istatistiki değerlendirme sonunda önemli derecede farklılık görülmemiştir. Bu nedenle bu iki ırka ait hayvanlarda saptanan varyasyonlar, mutajenik frekans aralığında olmalarına rağmen benzer sonuçların elde edilebileceği çok sayıda bilimsel çalışmaya ihtiyaç duyulan değerlendirmelerdir. Her iki ırkta da saptanan ve istatistiki olarak önemli bulunan V7 varyasyonunun (INTRON 22 c.1714-3C>T) Brangus ırkında enstrümental sertlikte artışa ve lezzet yoğunluğunda azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Simmental ırkında ise duyuşal sertliği artırıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir. NGS analizi ile belirlenen varyasyonların varlığı ve grup ilişkisi incelenmiş ve buna göre V1, V2, V5, V8, V10 ve V13 varyasyonları ve çalışma grupları arasında istatistiki olarak önemli düzeyde bir ilişki tespit edilmiştir. Bu varyasyonlardan Brangus ırkında bulunmayan fakat 11 Simmental hayvan ırkında bulunan V8 varyasyonu (EKZON 26 c.1985G>C/p.S662T), diğer tespit edilen 13 varyasyondan farklı olarak, enstrümental ve duyuşal gevrekliği iyileştirici etkisi ile biyobelirteç olarak değerlendirilebilir.

Genetik çalışmadan bağımsız olarak Brangus ve Simmental ırkına ait et örnekleri duyuşal analiz kriterlerinden olan sertlik, sululuk ve lezzet yoğunluğu açısından

değerlendirildiğinde ise; Simmental ırkı örneklerinin Brangus örneklerine göre önemli ölçüde daha gevrek, daha sulu ve daha güçlü lezzet yoğunluğuna sahip olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular; CAST geninde bugüne kadar belirlenmiş olan polimorfizmlerin dağılımlarının yanı sıra, yeni polimorfizmlerin literatüre kazandırılması ve bu polimorfizmlerin et gevrekliği ile birlikte etin sululuk ve lezzet yoğunluğu üzerindeki öne sürülen etkilerinin ortaya konulması açısından katkı sağlayacak ve böylece etçi sığır yetiştiriciliğinde ırk ıslahı ve ırk tercihinine rehber kaynak olması beklenmektedir.

Bu çalışma, maliyeti yüksek olan gen taramanın; eş zamanlı olarak daha yüksek kapasiteli, dolayısıyla daha ucuz ve daha güvenilir olan yöntemlerle yapılabileceğinin ortaya konması bakımından da önem taşımaktadır. Bu ve benzeri çalışmaların artmasıyla et endüstrisinin gelişimine ekonomik katkı sağlanabilecek, böylece daha çok tüketiciye sağlıklı ve kaliteli et ve et ürünlerinin ulaşmasına imkan sağlanmış olacaktır. Böylece bu tür çalışmaların zamanla artış göstermesi sayesinde genomik verilerin zenginleşmesine katkı sağlanarak biyoinformatik analizlerin keskinliği ile yöntem valide edilmiş olacaktır. Zira, diğer yöntemler (duyusal ve tekstürel) kesilmiş hayvan etinde uygulanabilirken, bu yeni nesil teknoloji sayesinde ve DNA tabanlı olması nedeniyle hayvanın canlıyken kan veya burun mukoza sürüntüsü gibi biyolojik materyallerden de uygulanma imkanı sağlanmış olacaktır. Böylece canlı hayvan üzerinde uygulanabilir olması, kesim öncesi hayvan seçimine de olanak tanıyacaktır. Duyusal analiz yöntemleri, kişiye bağımlı olan subjektif değerlendirmeler olup, standart olmayan veriler ölçüsünde ve değişken olabilen yöntemlerdir.

NGS tekniği ile aynı anda çok sayıda gen ve gen bölgesinin taranabilmesi çok sayıda veri sağlayacak ve böylece daha çok parametre seçim kriteri olarak kullanılabilecektir. Benzer çalışmalarla DNA profillemelerinin artması ile sonuçların veri bankalarında biriktirilerek kayıt altına alınması, in silico değerlendirmelerin ve diğer fonksiyonel testlerin yapılması, daha güçlü veri bankalarının oluşmasına yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Aali, M., Moradi-Shahrbabak, M., Moradi-Shahrbabak, H. and Sadeghi, M. 2014. Detecting novel SNPs and breed-specific haplotypes at Calpastatin gene in Iranian fat- and thin-tailed sheep breeds and their effects on protein structure. *Gene*, 537(1);132-9.
- Allais, S., Journaux, L., Levéziel, H., Payet-Duprat, N., Raynaud, P., Hocquette, J.F., Lepetit, J., Rousset, S., Denoyelle, C., and Bernard-Capel, C. 2011. Effects of polymorphisms in the calpastatin and μ -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. *Journal of Animal Science*, 89;1-11.
- Anonim. 2018. Et ve Süt Kurumu Genel Müdürlüğü 2018 Yılı Sektör Değerlendirme Raporu. Ankara.
- Anonim. 2019. Et ve Süt Kurumu Genel Müdürlüğü 2019 Yılı Sektör Değerlendirme Raporu. Ankara.
- Anonymous. 2003. Web Sitesi: <http://www.knowledgebank.irri.org/cglrc/ilri/beef/default.htm#Brangus.htm>, Erişim Tarihi: 17.06.2019
- Anonymous. 2015. Web Sitesi: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestockpoultry.pdf>, Erişim Tarihi: 04.08.2017.
- Anonymous. 2018a. Web Sitesi: <http://www.yourgenome.org/facts/timeline-history-of-genomics>, Erişim Tarihi: 14.11.2018.
- Anonymous 2018b. Web Sitesi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Erişim tarihi: 20.06.2019.
- Anonymous 2018c. Web Sitesi: <http://www.ensembl.org/index.html>, Erişim Tarihi: 02.10.2019.
- Anonymous 2019a. Web Sitesi: OECD/FAO (2019), OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028, OECD Publishing, Paris, file:///C:/Users/lg/Downloads/agr_outlook-2019-en.pdf, Erişim Tarihi: 02.06.2019.
- Anonymous. 2019b. Web Sitesi: American Simmental Association, ASA Publication Inc, One Genetics Way, Bozeman, MT 59718. 2019. www.simmental.org, Erişim Tarihi: 17.06.2019.
- Bekhit, A.E.-D.A., Carne, A., Ha, M. and Franks, P. 2014. Physical interventions to manipulate texture and tenderness of fresh meat: A Review. *International Journal of Food Properties*, 17, 2; 433-453.
- Bhat, Z.F., Morton, J.D., Mason, S.L. and Bekhit, A.E.-D.A. 2018. Role of calpain system in meat tenderness: A review. *Food Science and Human Wellness*, 7, 3; 196-204.
- Birmaduma, G. 2019. Evaluation of eating quality in sensory panelist and instrumental tenderness of beef from Harar, Arsi and Bale cattle breeds in Oromia, Ethiopia. *International Journal of Agricultural Science and Food Technology*, 35-42.

- Bisht, S.S. and Panda, A.K. 2014. DNA sequencing: methods and applications. In: Ravi I., Baunthiyal M., Saxena J. (eds), *Advances in Biotechnology*, Springer, pp. 11-21, New Delhi.
- Braz, C.U., Bresolin, T., Espigolan, R., Garcia, D.A., Gordo, D.G.M., Magalhaes, A.F.B., de, A.L.G. and Decker, J.E. 2018. Polymorphism analysis in genes associated with meat tenderness in Nelore cattle. *Meta Gene*, 18;73-78.
- Calvo, J.H., Iguácel, I., Kirinus, J.K., Noreña, M.S., Ripoll, G., Casasús, I., Joy, M., Sarto, P., Alberti, P. and Blanco, M. 2014. A new single nucleotide polymorphism in the calpastatin (CAST) gene associated with beef tenderness. *Meat Science*, 96(1);775–82.
- Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., Sklar, P., Ardlie, K.G., Patil, N., Lane, C.R., Lim, E.L., Kalyanaraman, N., Nemesh, J., Ziaugra, L., Friedland, L., Rolfe, A., Warrington, J.A., Lipshutz, R.J., Daley, G.Q. and Lander, E.S. 1999. Characterization of single nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature Genetics*, 22(3);231-8.
- Casas, E., White, S.N., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., Riley, D.G., Chase, C.C.J.R., Johnson, D.D. and Smith, T.P.L. 2006. Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science*, 84(3);520–25.
- Cornish-Bowden, A. 1985. Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984. *Nucleic Acids Research*, 13(9); 3021–3030.
- Corva, P., Soria, L., Schor, A., Villarreal, E., Cenci, M. P., Motter, M., Mezzadra, C., Melucci, L., Miquel, C., Paván, E, Depetris, G., I Santini, F. and Naón, J.G. 2007. Association of CAPN1 and CAST gene polymorphisms with meat tenderness in *Bos taurus* beef cattle from Argentina. *Genetics and Molecular Biology*, 30(4);1064–1069.
- Coverley, D. and Laskey, R.A. 1994. Regulation of eukaryotic DNA replication. *Annual Review of Biochemistry*, 63;745–776.3.
- Curi, R.A. Chardulo, L.A., Mason, M.C., Arrigoni, M.D., Silveira, A.C. and Oliveira, H.N. 2009. Effect of single nucleotide polymorphisms of CAPN1 and CAST genes on meat traits in Nelore beef cattle (*Bos indicus*) and in their crosses with *Bos taurus*. *Animal Genetics*, 40(4);456–462.
- Dadi, H., Kim, J.J., Yoon, D. and Kim, K.S. 2012. Evaluation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) genotyped by the Illumina bovine SNP50K in cattle focusing on Hanwoo Breed. *Asian-Australas Journal of Animal Science*, 25(1); 28–32.
- Dang, C.G., Cho, S.H., Sharma, A., Kim, H.C., Jeon, G.J., Yeon, S.H., Hong, S.K., Park, B.Y., Kang, H.S. and Lee, S.H. 2014. Genome-wide association study for Warner-Bratzler shear force and sensory traits in Hanwoo (Korean cattle). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(9);1328–1335.

- Danijela, Š.Z., Vera, L.L., Ljubinko, L., Lato, P., Vladimir, T.M. and Nevena, H.M. 2013. Effect of specific packaging conditions on myoglobin and meat color. *Food and Feed Research*, 40 (1); 1-10.
- Dikeman, M.E., Pollak, E.J., Zhang, Z., Moser, D.W., Gill, C.A. and Dressler, E.A. 2005. Phenotypic ranges and relationships among carcass and meat palatability traits for fourteen cattle breeds, and heritabilities and expected progeny differences for Warner-Bratzler shear force in three beef cattle breeds. *Journal of Animal Science*, 83(10); 2461–2467.
- Doydora, M.M., Salces, A.J., Oliveros, M.R., Geromo, R.B., Migrino, A.V. and Elumba, J.A. 2014. Carcass and sensory characteristics of different breeds of beef cattle raised in a ranching operation. *Philippine Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 40(2).
- Dunner, S., Sevane, N., García, D.E., Cortés, O., Valentini, A., Williams, J.L., Mangin, B., Cañón, J. And Levéziel, H. 2013. Association of genes involved in carcass and meat quality traits in 15 European bovine breeds. *Livestock Science*, 154; 34-44.
- Ertas, N. ve Doğruer, Y. 2010. Besinlerde tekstür. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 7(1);35-42.
- Fairall, L., Rhodes, D. and Klug, A. 1986. Mapping of the sites of protection on a 5 S RNA gene by the *Xenopus* transcription factor IIIA. A model for the interaction. *Journal of Molecular Biology*, 192(3); 577–591.
- Faucitano, L., Chouinard, P.Y., Fortin, J., Mandell, I.B., Lafrenière, C., Girard, C.L. and Berthiaume, R. 2008. Comparison of alternative beef production systems based on forage finishing or grain-forage diets with or without growth promotants: 2. meat quality, fatty acid composition, and overall palatability. *Journal of Animal Science*, 86(7); 1678–1689.
- Fiems, L.O., Campeneere, S.D., De Smet, S., Van de Voorde, G., Vanacker, J.M. and Boucqué, C.V. 2000. Relationship between fat depots in carcasses of beef bulls and effect on meat colour and tenderness. *Meat Science*, 56(1); 41–47.
- Fluitt, A., Pienaar, E. and Viljoen, H. 2007. Ribosome kinetics and aa-tRNA competition determine rate and fidelity of peptide synthesis. *Computational Biology and Chemistry*, 31(5-6); 335–346.
- Fortuno, C., James, P.A., Young, E.L., Feng, B., Olivier, M., Pesaran, T., Tavtigian, S. V. and Spurdle, A.B. 2018. Improved, ACMG-compliant, in silico prediction of pathogenicity for missense substitutions encoded by TP53 variants. *Human Mutation*, 39(8); 1061–1069.
- França, L.T.C., Carrilho, E. and Kist, T.B.L. 2002. A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 35(2); 169-200.
- Gagaoua, M., Terlouw, E.M., Micol, D., Hocquette, J., Moloney, A.P., Nuernberg, K., Bauchart, D., Boudjellal, A., Scollan, N.D., Richardson, R.I. and Picard, B. 2016. Sensory quality of meat from eight different types of cattle in relation with their biochemical characteristics. *Journal of Integrative Agriculture*, 15; 1550-1563.

- Gerstein, M.B., Bruce, C., Rozowsky, J.S., Zheng, D., Du, J., Korbel, J.O., Emanuelsson, O., Zhang, Z.D., Weissman, S. and Snyder, M. 2007. What is a gene, post-encode? History and updated definition. *Genome Research*, 17(6); 669–681.
- Gökalp, H.Y., Kaya, M., Tülek, Y. ve Zorba, Ö. 1999. Et ve ürünlerinde kalite kontrol ve laboratuvar uygulama klavuzu 3. baskı. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Erzurum.
- Gül, U. ve Yıldırım, İ. 2018. Kırmızı et durum ve tahmin 2018. T.C. Gıda, Tarım Ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü, Ankara.
- Hocquette, J., Renand, G., Levéziel, H., Picard, B. and Cassar-Malek, I. 2006. The potential benefits of genetics and genomics to improve beef quality - a review. *Animal Science Papers*, 24(3);173–89.
- Hopkins, D.L. and Geesink, G. 2009. Protein degradation post mortem and tenderisation. In *applied muscle biology and meat science*, crc press: Taylor and Francis Group, pp. 149–173.
- Houbak, M.B., Ertbjerg, P. and Therkildsen, M. 2008. In vitro study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins post-mortem by proteasome and μ -calpain. *Meat Science*, 79(1); 77–85.
- Huff-Lonergan, E., Zhang, W. and Lonergan, S.M. 2010. Biochemistry of postmortem muscle - lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Science*, 86(1); 184–195.
- Iguácel, L.P., Calvo, J.H., Casasús, I., Serrano, M., Ripoll, G., Sarto, P., Villalba, D. and Blanco, M. 2019. Association of two single nucleotide polymorphisms in the calpastatin gene with tenderness under varying lengths of meat ageing in two native Spanish cattle breeds. *Livestock Science*, 230.
- Kahya, S., Büyükcangazi, E. ve Carlı, T. 2013. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) optimizasyonu. *Uludag Üniversitesi Veteriner Fakültesi. Mikrobiyoloji ABD*, 32,1;31-38.
- Kemp, C.M., Sensky, P.L., Bardsley, R.G., Buttery, P.J. and Parr, T. 2010. Tenderness-an enzymatic view. *Meat Science*, 84;248–256.
- Kim, Y.H.B., Ma, D., Setyabrata, D., Farouk, M.M., Lonergan, S.M., Huff-Lonergan, E. and Hunt, M.C. 2018. Understanding postmortem biochemical processes and post-harvest aging factors to develop novel smart-aging strategies. *Meat Science*, 144; 74–90.
- Knight, R.D. and Landweber, L.F. 2000. The early evolution of the genetic code. *Cell*, 101; 569-572.
- Lawrie, R.A. and Ledward, D.A. 2006. Factors influencing the growth and development of meat animals. *Lawrie's Meat Science*, 15-40.

- Leal-Gutiérrez, J.D., Elzo, M.A., Johnson, D.D., Scheffler, T.L., Scheffler, J.M. and Mateescu, R.G. 2018. Association of m-calpain and calpastatin polymorphisms with meat tenderness in a Brahman–Angus population. *Animal Sciences*, 9;56.
- Leal-Gutiérrez, J.D. and Mateescu, R.G. 2019. Genetic basis of improving the palatability of beef cattle: current insights. *Food Biotechnology*, 33;3, 193-216.
- Lee, S.H., Kim, S.C., Chai, H.H., Cho, S.H., Kim, H.C., Lim, D., Choi, B.H., Dang, C.G., Sharma, A., Gondro, C., Yang, B.S. and Hong, S.K. 2014a. Mutations in calpastatin and μ -calpain are associated with meat tenderness, flavor and juiciness in Hanwoo (Korean cattle): molecular modeling of the effects of substitutions in the calpastatin/ μ -calpain complex. *Meat Science*, 96(4); 1501–1508.
- Lee, S.H., Park, B.H., Sharma, A., Dang, C.G., Lee, S.S., Choi, T.J., Choy, Y.H., Kim, H.C., Jeon, K.J., Kim, S.D., Yeon, S.H., Park, S.B. and Kang, H.S. 2014b. Hanwoo cattle: origin, domestication, breeding strategies and genomic selection. *Journal of Animal Science and Technology*, 56; 2.
- Lepetit, J. 2008. Collagen contribution to meat toughness: Theoretical aspects. *Meat Science*, 80 4; 960-7 .
- Li, Y.X., Jin, H.G., Yan, C.G., Seo, K.S., Zhang, L.C., Ren, C.Y. and Jin, X. 2013. Association of CAST gene polymorphisms with carcass and meat quality traits in Yanbian cattle of China. *Molecular Biology Reports*, 40(2); 1875–1881.
- Liang, R.R., Zhu, H., Mao, Y.W., Zhang, Y.M., Zhu, L.X., Cornforth, D., Wang, R.H., Meng, X.Y. and Luo, X. 2016. Tenderness and sensory attributes of the longissimus lumborum muscles with different quality grades from Chinese fattened yellow crossbred steers. *Meat Science*, 112; 52–57.
- Listrat, A., Lebret, B., Louveau, I., Astruc, T., Bonnet, M., Lefaucheur, L., Picard, B. and Bugeon, J. 2016. How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. *Scientific World Journal*, 3182746. 14 p.
- Lozano, M.S.R., Alfaro-Zavala, S., Sifuentes-Rincon, A.M., Parra-Bracamonte, G.M., Varela, D.B., Mediana, R.D.M., Linares, C.P., Rincón, F.R., Escalante, A.S., Urrutia, G.T. and Saavedra, F.F. 2016. Meat tenderness genetic and genomic variation sources in commercial beef cattle. *Journal of Food Quality*, 39; 150–156.
- Malheiros, J.M., Enríquez-Valencia, C.E., da Silva Duran, B.O., de Paula, T.G., Curi, R.A., de Vasconcelos Silva, J., Dal-Pai-Silva, M., de Oliveira, H.N. and Chardulo, L. 2018. Association of CAST2, HSP90AA1, DNAJA1 and HSPB1 genes with meat tenderness in Nellore cattle. *Meat Science*, 138; 49–52.
- Mateescu, R.G., Garrick, D.J. and Reecy, J.M. 2017. Network analysis reveals putative genes affecting meat quality in Angus cattle. *Frontiers in Genetics*, 8; 171.
- McClure, M.C., Ramey, H.R., Rolf, M.M., McKay, S.D., Decker, J.E., Chapple, R.H., Kim, J.W., Taxis, T.M., Weaver, R.L., Schnabel, R.D. and Taylor, J.F. 2012. Genome-wide association analysis for quantitative trait loci influencing Warner-Bratzler shear force in five taurine cattle breeds. *Animal Genetics*, 43(6); 662–673.

- McNeill, S. and Van Elswyk, M.E. 2012. Red meat in global nutrition. *Meat Science*, 92(3); 166–173.
- Meilgaard, M., Civille, G.V. and Carr, B.T. 2006. *Sensory evaluation techniques*, 4th Ed., CRC Press LLC.
- Milford, A.B., Le Mouel, C., Bodirsky, B.L. and Rolinski, S. 2019. Drivers of meat consumption. *Appetite*, 141; 104313.
- Nabel, G. and Baltimore, D. 1987. An inducible transcription factor activates expression of human immuno deficiency virus in T cells. *Nature*, 326(6114); 711–713.
- Ouali, A. and Talmant, A. 1990. Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal-muscles, *Meat Science*. 28; 331–348.
- Pearson, H. 2006. Genetics: What is a gene? *Nature*, 441(7092); 398–401.
- Pennisi, E. 2007. Genomics. DNA study forces rethink of what it means to be a gene. *Science* (New York, N.Y.), 316(5831);1556–1557.
- Pereira, P.M.C.C. and Vicente, A.F.R.B. 2013. Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, 93; 586-592.
- Pighin, D., Pazos, A., Chamorro, V., Paschetta, F., Cunzolo, S., Godoy, F., Messina, V., Pordomingo, A. and Grigioni, G. 2016. Contribution of beef to human health: A review of the role of the animal production systems. *Scientific World Journal* Article ID 8681491. 10 pages.
- Pinto, L.F., Ferraz, J.B., Meirelles, F.V., Eler, J.P., Rezende, F.M., Carvalho, M.E., Almeida, H.B. and Silva, R.C. 2010. Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nellore cattle. *Genetics and Molecular Research GMR*, 9(3); 1431–1442.
- Rajkowsch, L., Vilela, C., Berthelot, K., Ramirez, C.V. and McCarthy, JE. 2004. Reinitiation and recycling are distinct processes occurring downstream of translation termination in yeast. *Journal of Molecular Biology*, 4;335(1);71- 85.
- Reiche, A.M., Oberson, J.L., Silacci, P., Messadène-Chelali, J., Hess, H.D., Dohme-Meier, F., Dufey, P.A. and Terlouw, E. 2019. Pre-slaughter stress and horn status influence physiology and meat quality of young bulls. *Meat Science*, 158; 107892.
- Ropka-Molik, K., Bereta, A., Tyra, M., Różycki, M., Piórkowska, K., Szyndler-Nędza, M. and Szmatoła, T. 2014. Association of calpastatin gene polymorphisms and meat quality traits in pig. *Meat Science*, 97(2); 143–150.
- Serdaroğlu, M ve Değirmencioğlu, G . 2002. Etin önemli bir kalite özelliği: Lezzet. *Gıda*, 27 (4).
- Shah, N.J. 2019. *Polymerase chain reaction. 1: General and Molecular Pharmacology: Principles of Drug Action*, 1;395-397; Springer Singapore.
- Shendure, J. and Ji, H. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10); 1135–1145.
- Schenkel, F.S., Miller, S.P., Jiang, Z., Mandell, I.B., Ye, X., Li, H. and Wilton, J.W. 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene

- with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 84(2); 291–299.
- Simmons, N.J., Daly, C.C., Cummings, T.L., Morgan, S.K., Johnson, N.V. and Lombard, A. 2008. Reassessing the principles of electrical stimulation, *Meat Science*. 80; 110–122.
- Simões, M., Leal, J., Minho, A.P., Gomes, C.C., MacNeil, M.D., Costa, R.F., Junqueira, V.S., Schmidt, P.I., Cardoso, F.F., Boligon, A.A. and Yokoo, M.J. 2020. Breeding objectives of Brangus cattle in Brazil. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 137(2); 177–188.
- Sun, X., Wu, X., Fan, Y., Mao, Y., Ji, D., Huang, B. and Yang, Z. 2018. Effects of polymorphisms in CAPN1 and CAST genes on meat tenderness of Chinese Simmental cattle. *Archives Animal Breeding*, 61(4); 433–439.
- Taylor, R.G., Geesink, G.H., Thompson, V.F., Koohmaraie, M. and Goll, D.E. 1995. Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization *J. Anim. Sci.*, 73; 1351–1367.
- Thompson, R.C., Dix, D.B. and Karim, A.M. 1986. The reaction of ribosomes with elongation factor Tu.GTP complexes. Aminoacyl-tRNA-independent reactions in the elongation cycle determine the accuracy of protein synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(11); 4868–4874.
- Totland, G.K., Kryvi, H. and Slinde, E. 1988. Composition of muscle fibre types and connective tissue in bovine *M. semitendinosus* and its relation to tenderness, *Meat Science*, 23; 303–315.
- Vanek, D., Silerova, M., Urbanova, V., Saskova, L., Dubska, J., Beran, M. and Vienna Austria. 2011. Genomic DNA extraction protocols for bone samples: The comparison of Qiagen and Zymo Research spin columns. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3; e397–e398.
- Warner, R.D., Greenwood, P.L., Pethick, D.W. and Ferguson, D.M. 2010. Genetic and environmental effects on meat quality. *Meat Science*, 86(1); 171–183.
- Weaber, R.L. and Lusk, J.L. 2010. The economic value of improvements in beef tenderness by genetic marker selection. *American Journal of Agricultural Economics*, 92(5); 1456–71.
- Wheeler, T. and Koohmaraie, M. 1994. Prerigor and postrigor changes in in tenderness of ovine longissimus muscle, *J. Anim. Sci.* 72; 1232–1238.
- Whitford, P.C., Blanchard, S.C., Cate, J.H. and Sanbonmatsu, K.Y. 2013. Connecting the kinetics and energy landscape of tRNA translocation on the ribosome. *PLoS Comput Biol.*, 9(3); e1003003.
- Williams, P.G. 2007. Nutritional composition of red meat, *Nutrition and Dietetics*, 64(4); S113–S119.
- Wright, A.F. 2005. Genetic Variation: Polymorphisms and mutations. MRC Human Genetics Unit, Edinburgh. UK.

- Wright, S.A., Ramos, P., Johnson, D.D., Scheffler, J.M., Elzo, M.A., Mateescu, R.G., Bass, A.L., Carr, C.C. and Scheffler, T.L. 2018. Brahman genetics influence muscle fiber properties, protein degradation, and tenderness in an Angus-Brahman multibreed herd. *Meat Science*, 135; 84–93.
- Zouridis, H. and Hatzimanikatis, V. 2007. A model for protein translation: polysome self-organization leads to maximum protein synthesis rates. *Biophysical Journal*, 92(3); 717–730.





EKLER

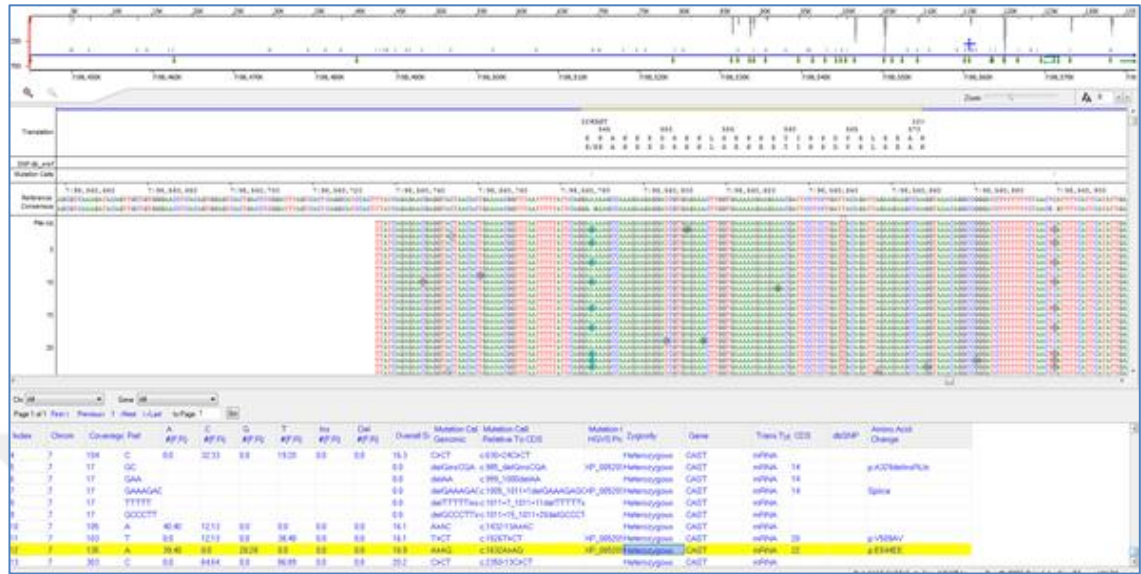
EK 1 Brangus ırkına ait saptanan varyasyonların surveyor görüntüsü

EK 2 Simmental ırkına ait saptanan varyasyonların surveyor görüntüsü

EK 3 Duyusal değerlendirme formu



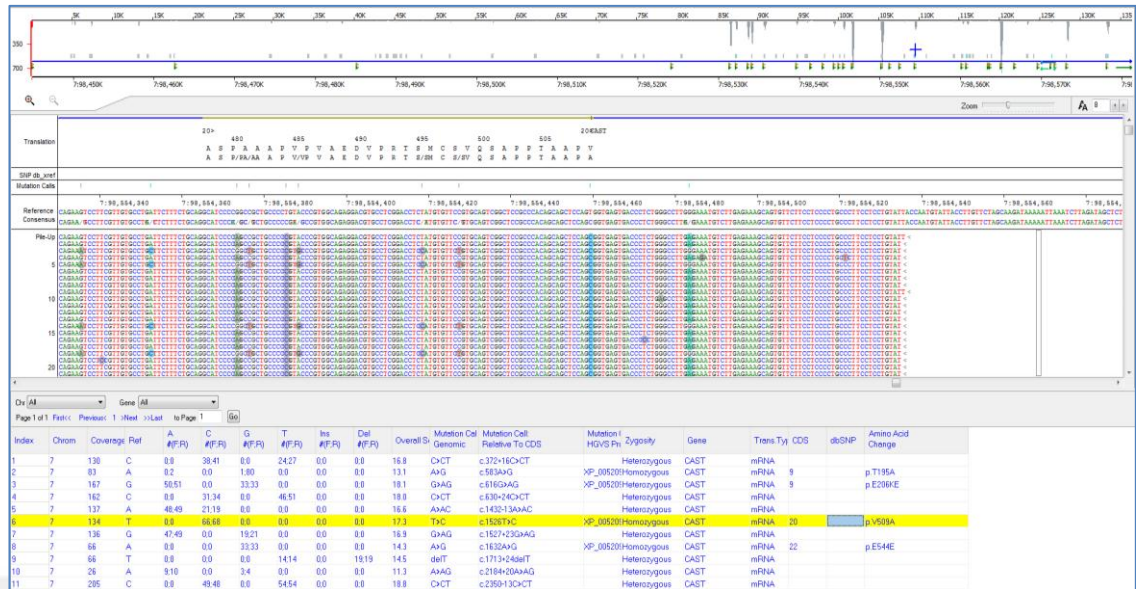
EK 1 Brangus İrkına Ait Saptanan Varyasyonların Surveyor Görüntüsü



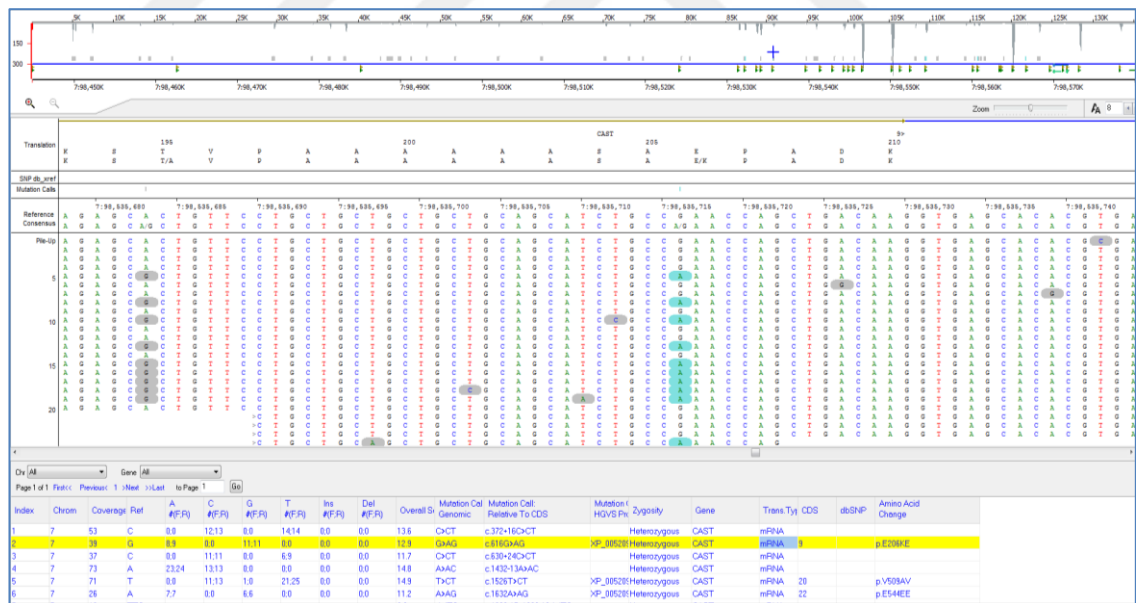
Biyoinformatik değerlendirmeyle elde edilen 1 nolu Brangus ırkına ait varyasyon (B1-EKZON 22 c.1632A>G/p.E544E Heterozigot)



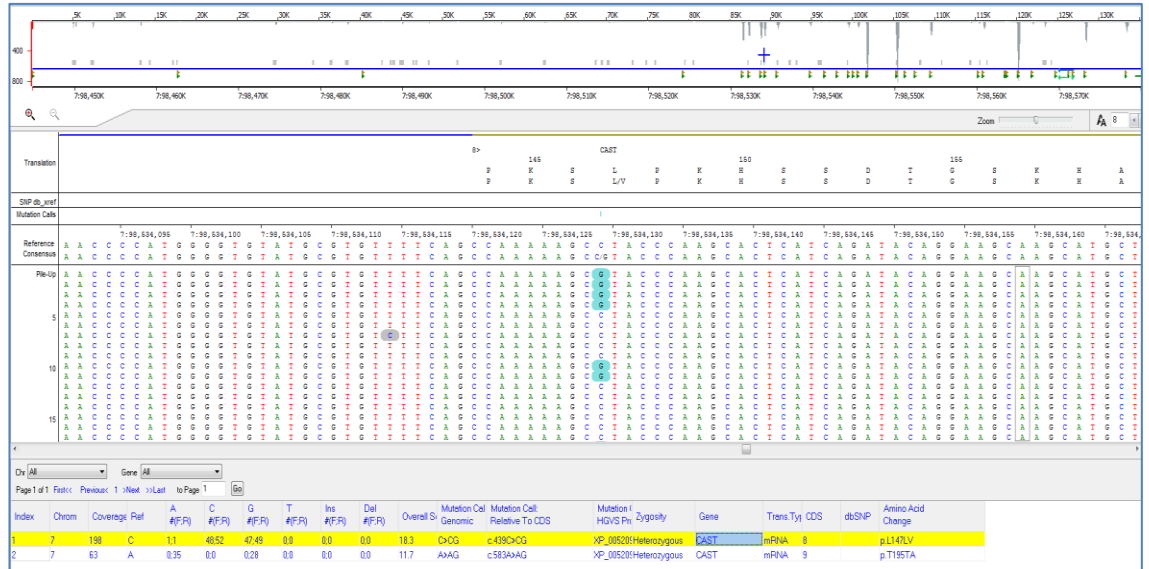
Biyoinformatik değerlendirmeyle elde edilen 2 nolu Brangus ırkına ait varyasyon (B2-EKZON 9 c.583A>G/p.T195A Homozigot - EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot)



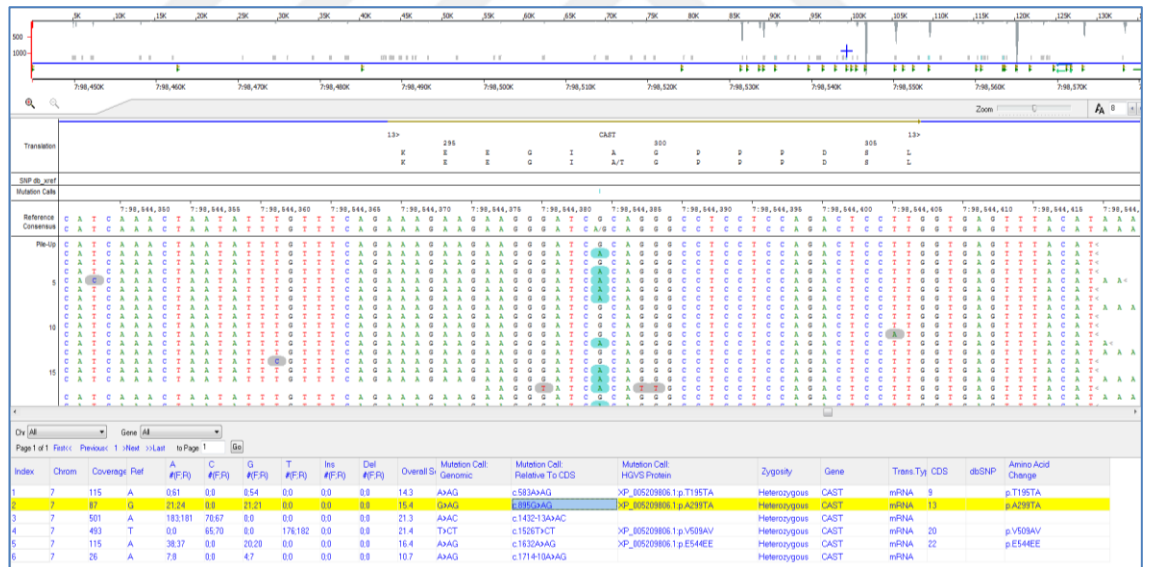
Biyoinformatik değerdendirmeyle elde edilen 2 nolu Brangus ırkına ait varyasyon (B2-EKZON 20 c.1526T>C/p.V509A Homozigot)



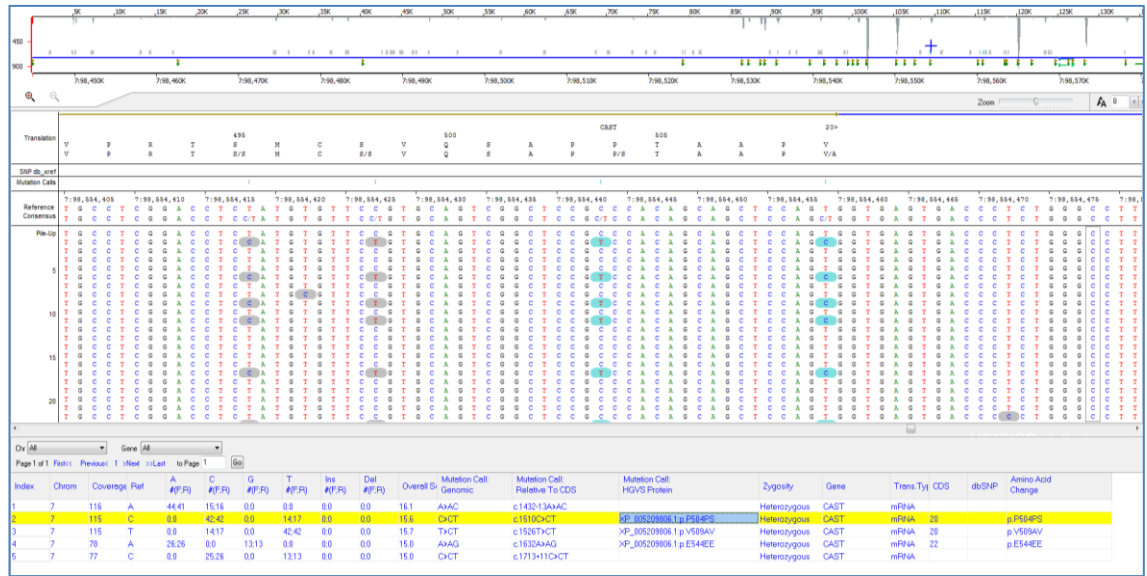
Biyoinformatik değerdendirmeyle elde edilen 2 nolu Brangus ırkına ait varyasyon (B2-EKZON 9 c.616G>A/p.E206K Heterozigot)



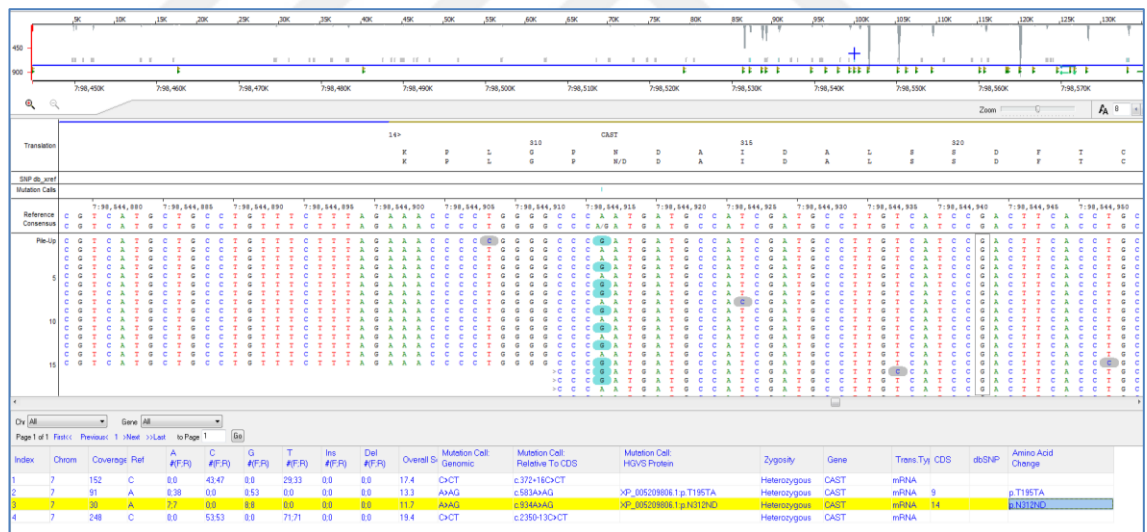
Biyoinformatik değ erlendirmeyle elde edilen 9 nolu Brangus ırkına ait varyasyon (B9-EKZON 8 c.439C>CG/p.L147LV Heterozigot)



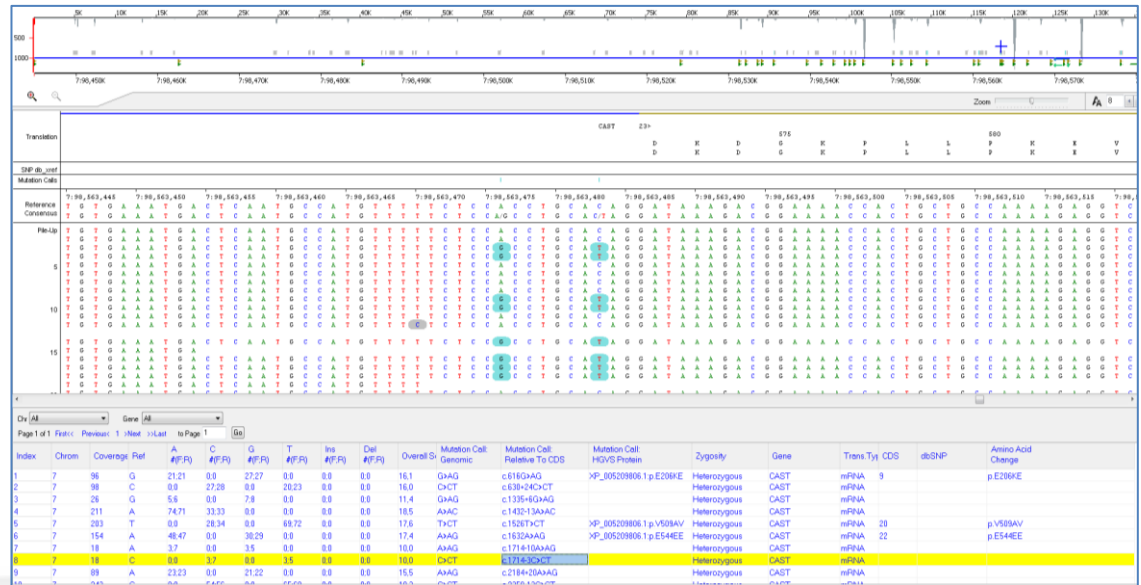
Biyoinformatik değ erlendirmeyle elde edilen 14 nolu Brangus ırkına ait varyasyon (B14- EKZON 13 c.895G>A/p.A299T Heterozigot)



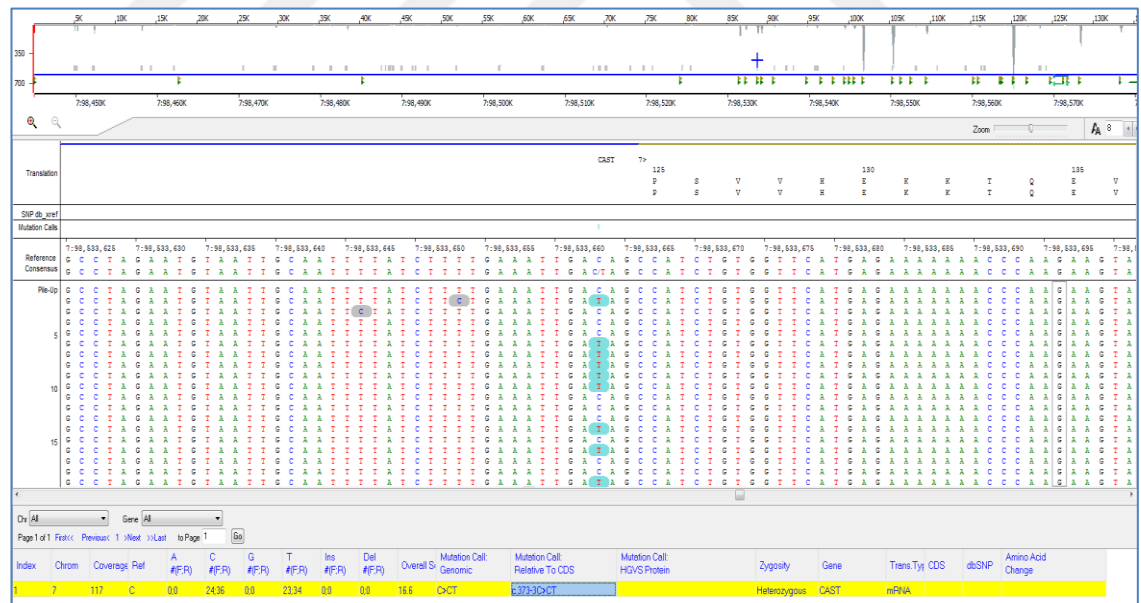
Biyoinformatik değerlendirmeyeyle elde edilen 17 nolu Brangus ırkına ait varyasyon (B17- EKZON 20 c.1510C>T/p.P504S Heterozigot)



Biyoinformatik değerlendirmeyeyle elde edilen 22 nolu Brangus ırkına ait varyasyon (B22- EKZON 14 c.934A>G/p.N312D Heterozigot)

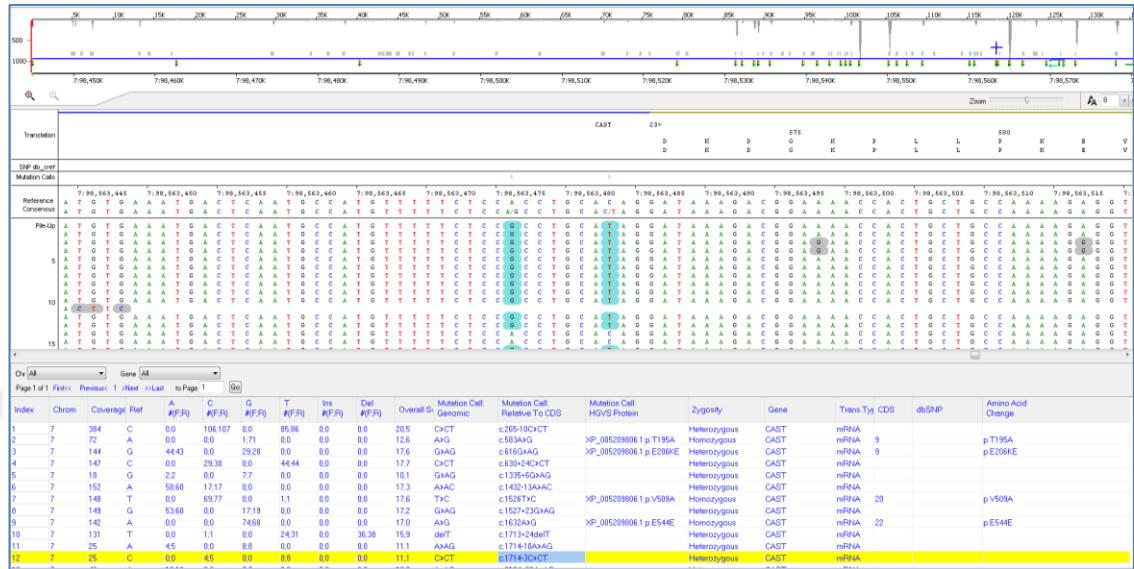


Biyoinformatik değerdendirmeyle elde edilen 31 nolu Brangus ırkına ait varyasyon (B31- INTRON 22 c.1714-3C>CT Heterozigot)

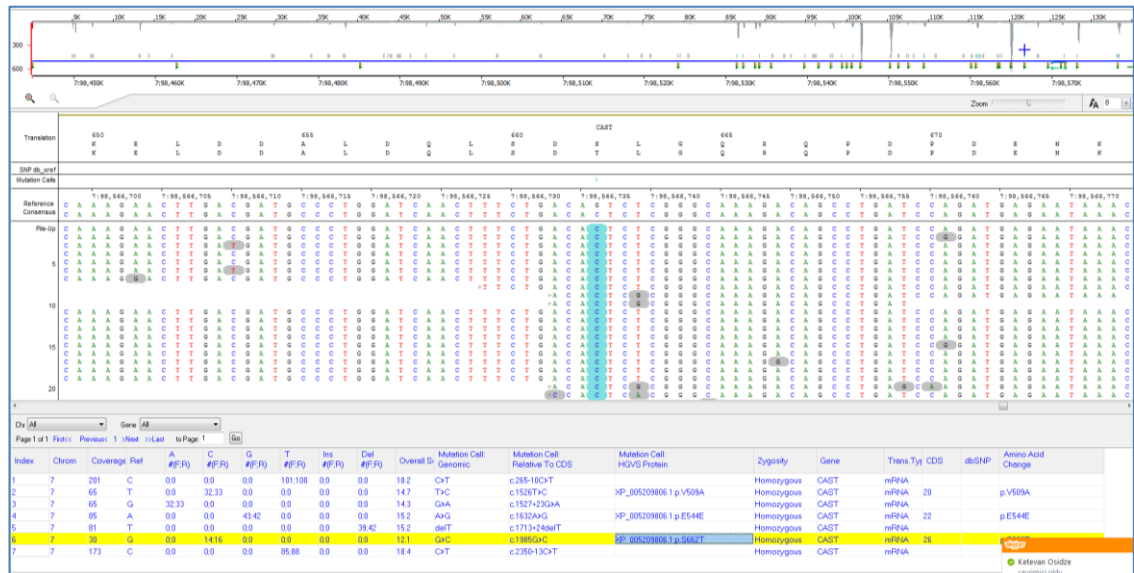


Biyoinformatik değerdendirmeyle elde edilen 42 nolu Brangus ırkına ait varyasyon (B42- INTRON 6 c.373-3C>T Heterozigot)

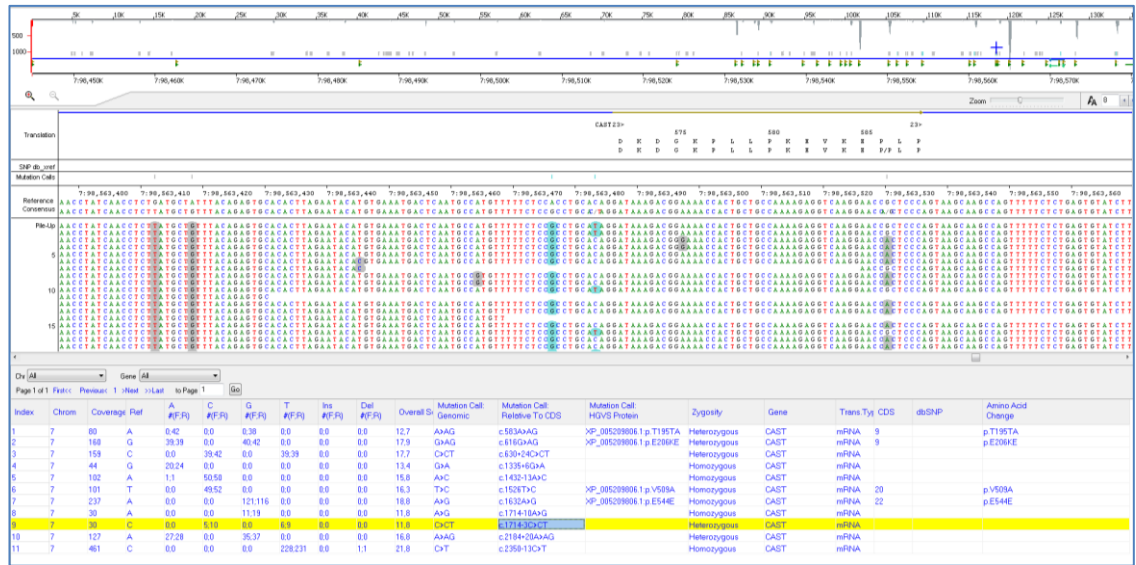
EK 2 Simmental Irkına Ait Saptanan Varyasyonların Surveyor Görüntüsü



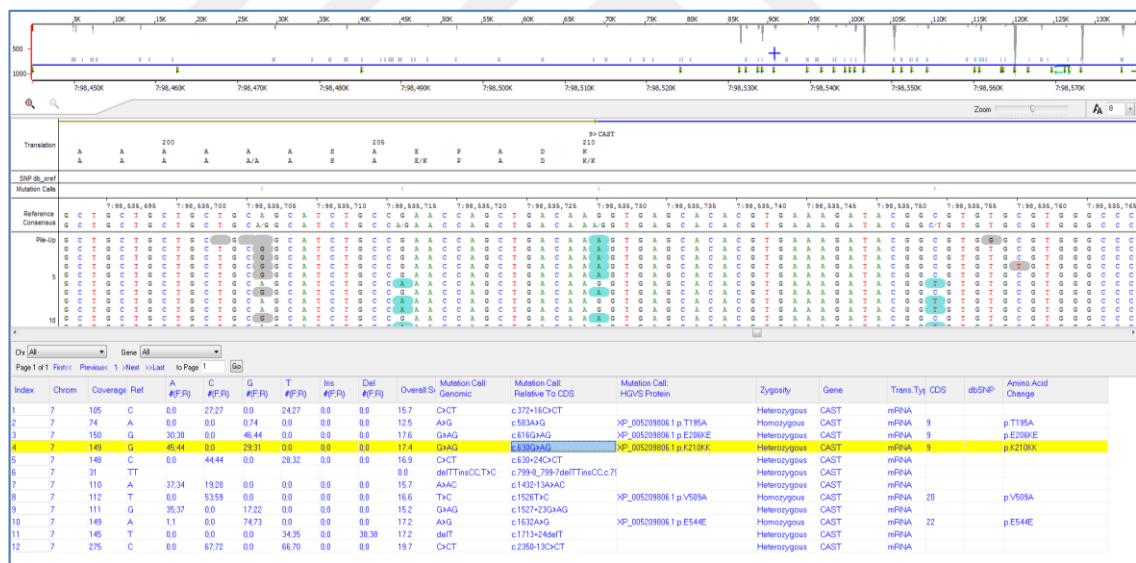
Biyoinformatik değerlendirmeyle elde edilen 4 nolu Simmental ırkına ait varyasyon (S24- INTRON 22 c.1714-3C>CT Heterozigot)



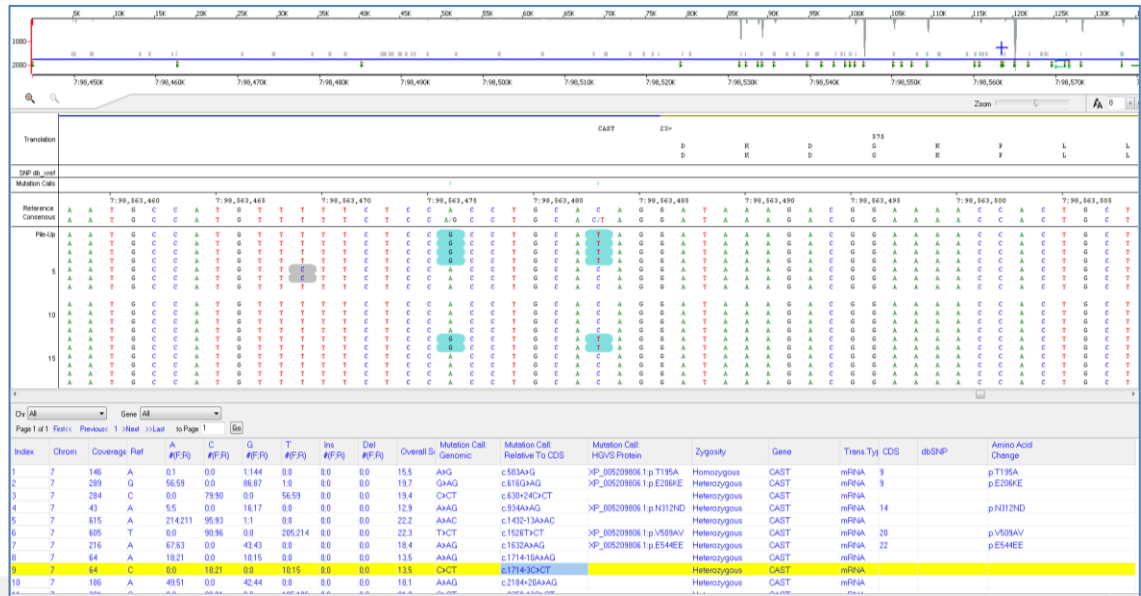
Biyoinformatik değerlendirmeyle elde edilen 9 nolu Simmental ırkına ait varyasyon (S9- EKZON 26 c.1985G>C/p.S662T Homozigot)



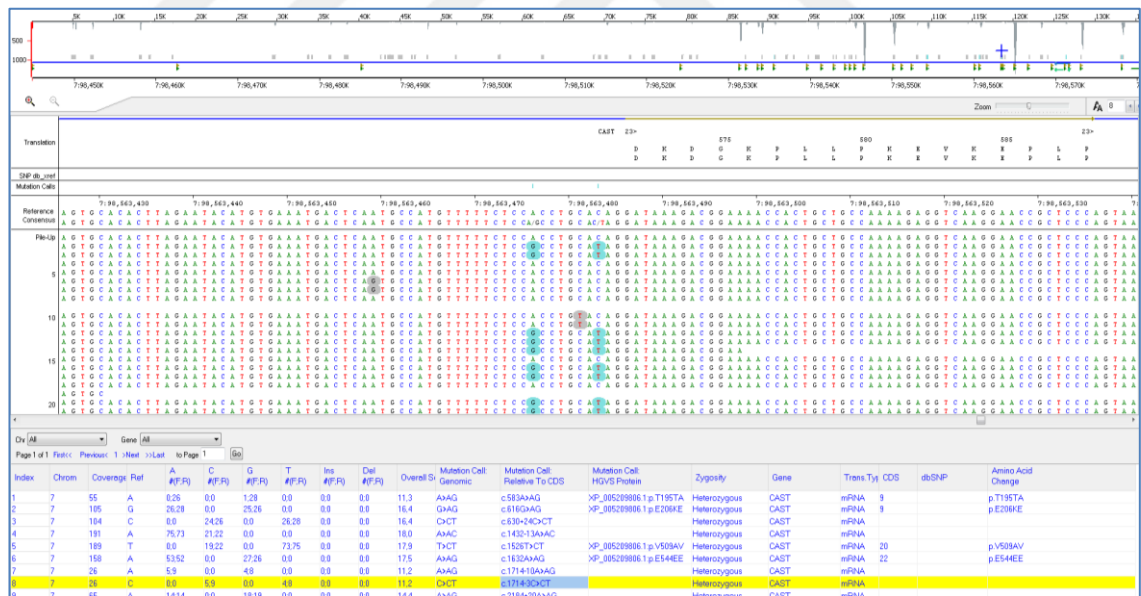
Biyoinformatik değerlendirmeyeyle elde edilen 10 nolu Simmental ırkına ait varyasyon (S10- INTRON 22 c.1714-3C>CT Heterozigot)



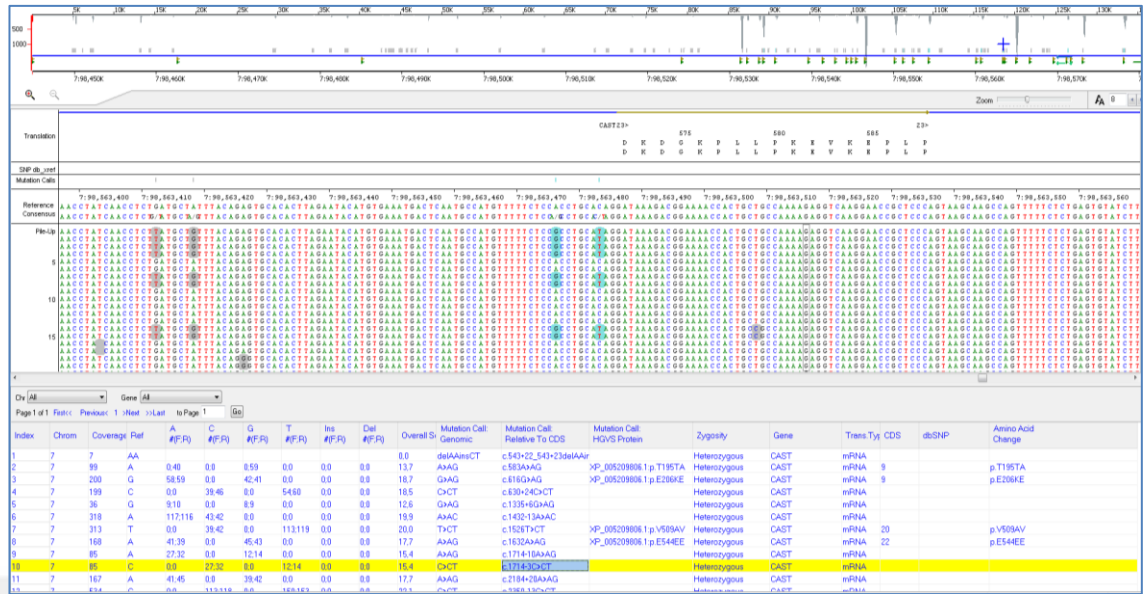
Biyoinformatik değerlendirmeyeyle elde edilen 12 nolu Simmental ırkına ait varyasyon (S12- EKZON 9 c.630G>AG/p.K210KK (Splice) Heterozigot)



Biyoinformatik değerlendirmeyle elde edilen 20 nolu Simmental ırkına ait varyasyon (S20- INTRON 22 c.1714-3C>CT Heterozigot)



Biyoinformatik değerlendirmeyle elde edilen 27 nolu Simmental ırkına ait varyasyon (S27- INTRON 22 c.1714-3C>CT Heterozigot)



Biyoinformatik değerlendirmeyle elde edilen 31 nolu Simmental ırkına ait varyasyon (S31- INTRON 22 c.1714-3C>CT Heterozigot)

EK 3 Duyusal değerlendirme formu

Dana eti duyusal değerlendirme formu

DANA BİFTEK DUYUSAL DEğERLENDİRME FORMU							
PANELİSTİN ADI SOYADI:.....				TARİH:.....			
ÜRÜN KODU:							
• Masanın üzerinde sunulan ürün için aşağıda belirtilen özellikleri skala üzerinde değerlendiriniz. • Değerlendirmeye başlamadan önce, örnekler arasında bir önceki örnekten ağızınızda kalan tadı su ve krakerle gideriniz.							
Sertlik: Gıdayı ağızınıza aldıktan sonra dil ve damakla sıkıştırma için gerekli kuvvet ve gıdayı azı dişler ile ikiye bölmek için gerekli kuvvet							
I Aşırı sert (1)	I Çok sert (2)	I Orta sert (3)	I Hafif sert (4)	I Hafif gevrek (5)	I Orta gevrek (6)	I Çok gevrek (7)	I Aşırı gevrek (8)
Sululuk: Ağıza alındığında ilk 5 çiğneme esnasında örnekten ağıza yayılan su miktarı							
I Aşırı kuru (1)	I Çok kuru (2)	I Orta kuru (3)	I Hafif kuru (4)	I Hafif sulu (5)	I Orta sulu (6)	I Çok sulu (7)	I Aşırı sulu (8)
Lezzet (flavor) yoğunluğu: Üründe arzu edilen tat ve koku miktarı							
I Aşırı zayıf (1)	I Çok zayıf (2)	I Orta zayıf (3)	I Hafif zayıf (4)	I Hafif güçlü (5)	I Orta güçlü (6)	I Çok güçlü (7)	I Aşırı güçlü (8)
Ek Notlar:							
KATILIMINIZ İÇİN TEŞEKKÜRLER...							

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Esin ÇALIK

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 25.10.1969

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Mustafa Kemal Lisesi (1986)

Ön Lisans : AÖF Turizm ve Otel İşletmeciliği (2019 - Devam)

Lisans : Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği (1991)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği
Anabilim Dalı (1996)

Doktora : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği
Anabilim Dalı (2020)

Üyesi olduğu mesleki ve bilimsel kuruluş

Ankara Üniversiteler Derneği

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

- L.E.S. Mikrogen Genetik Tanı Merkezi. (2018-2019)
- Başkent Üniversitesi Sosyal Bilimler Meslek Yüksek Okulu Aşçılık Bölümü
Öğretim Görevlisi (2016–2018)
- Kuki Protokol Cafe ve Patisserie (2015-2016)
- Gen-Art Tüp Bebek Merkezi-Les Mikrogen Genetik Tanı Merkezi (2008–2016)
- Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi (2002-2004)
- Coca-Cola A.Ş. (1999)
- Honda Bora Otomotiv (1997)
- Mustafa Nevzat İlaç Sanayi A.Ş. (1993-1996)
- Kavaklıdere Şarapları A.Ş. (1993)

Mesleki Gelişim Etkinlikleri

“Proteomik Teknolojilerinin Et Biliminde Uygulama Alanları”. Danışman: Prof. Dr. Kezban CANDÖĞAN, Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği, A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye. (Doktora Semineri).

“Buyotu (*Trigonella foenum graceum-L.*)’un Kalite Kriterlerinin Belirlenmesi”. Prof. Dr. Ali BAYRAK, Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği, A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye. (Yüksek Lisans Tezi).

“Doğal Orijinli Tat ve Koku Veren Maddeler”. Danışman: Prof. Dr. Ali BAYRAK, Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği, A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye. (Yüksek Lisans Semineri).

Bilimsel Makaleler

E. Çalık, V. Baltacı, K. Candoğan. 2019. Next generation sequencing (NGS) based variation analysis: A new practical biomarker for beef tenderness assessment.. International Journal of Agriculture, Environment and Food Sciences, 3(4):233-239, DOI: 10.31015/jaefs.4.6

Ulusal ve Uluslararası Kongrelerde Sunulan Poster Bildirileri

- 1) **E. Çalık**, V. Baltacı, K. Candoğan. 2020. Assessing the relationship between tenderness and polymorphisms in calpastatin gene (CAST) in two beef cattle breeds. SHIFT 20 Annual Event & Food Expo, Technical Research Paper, 12–15 July, 2020 (Poster bildirisi).
- 2) **E. Çalık**, V. Baltacı, K. Candoğan. 2019. Detection of polymorphisms in the cast gene from Brangus and Simmental cattle using Next Generation Sequencing. 65th International Congress of Meat Science and Technology, Potsdam/Berlin, Germany 04–09 August, 2019 (Poster bildirisi).
- 3) **E. Çalık**, K. Candoğan. 2018. Proteomics approach for poultry meat quality assessment. International Poultry Science Congress of WPSA Turkish Branch, 09-12 May 2018-Niğde, Kapadokya – TÜRKİYE.