

ECO-BIYOTEKNOLOJİ
AKADEMİK DERS GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ
MİKROORGANİZMALAR – ZORLUKLAR VE
SINIRLAMALAR

R & D Center Biointech Ltd.

Doç. Dr. ANNA KUJUMDZIEVA
Yard. Doç. Dr. VENTSİSLAVA PETROVA

ÖÇ3: GIDA ÜRETİMİ VE GÜVENLİĞİ GDO

1. Giriş

Günümüzde, Yeşil Barış (Green Peace), Dünya'nın dostları (Friends of the Earth) ve diğer ilgili grupların aktif bir anti-GM teknoloji politikası nedeniyle küresel tarımda, gıda ve yem temininde genetik modifikasyon teknolojisinin kullanımı oldukça karmaşıktır. Bu eylemin bir sonucu olarak insanların tüketimi için üretilen büyük miktardaki (GDO'lu maddeler), AB tarafından ortadan kaldırılmıştır. Bu anti-GDO varsayımı, son zamanlarda çiftlik hayvanlarının üretiminde genetiği değiştirilmiş bileşenlerin kullanımına yönelik olmaya başlamıştır. Hayvan yeminde genetiği değiştirilmiş yağlı tohum ve tahıl girişi ile Avrupa Komisyonu (EC), 2001 yılında GDO tabanlı teknolojilerin sürecini yeniden başlatmak için yasal değişiklikler önermiştir. Bu politikanın başarısı durumunda ise, EC'nin ekonomisi üzerinde önemli ekonomik sonuçlar doğuracaktır. Böylece, GDO'lar ile ilişkili bilimsel ve güvenlik konularıyla ilgili soruların açıklığa kavuşturulması, büyük önem taşımaktadır.

2. Genetiği değiştirilmiş gıdaların güvenliği üzerine tanımlar

GDO kullanarak elde edilen bu gıdalar dâhil olmak üzere, gıdaların güvenlik ve risk değerlendirmesi, genel risk değerlendirmesi aralığında kabul edilmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization) ve Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization) üyesi ülkelerinin, genetiği değiştirilmiş gıdaların doğası ve güvenliği ile ilgili çözüm bulmak için bazı tanımları açıklamıştır.

Tanımlar aşağıdaki şekilde belirtilmiştir:

- **"Genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar (GDM)"** – Çoğaltım doğal rekombinasyon yoluyla ve/ya da doğal olmayan bir yaklaşımla genetik materyalinin (DNA) değiştirildiği mikroorganizmalardır (bakteriler, mayalar veya ipliksi mantarlar). Bu teknoloji, genellikle "Modern biyoteknoloji", "gen teknolojisi", "rekombinant DNA teknolojisi" veya "genetik mühendisliği" olarak adlandırılmaktadır.
- **"Modern biyoteknoloji"**, *in vitro* (yapay koşullarda) nükleik asit teknikleri ve hücre füzyonu (protoplast füzyonu ve hibridizasyon) ile rekombinant da dâhil olmak üzere hücrelere ya da organellere nükleik asit direkt transfer uygulaması anlamına gelmektedir.

GDM'lar vasıtasıyla üretilen gıda ve gıda maddeleri ile ilgili olarak, aşağıdaki sınıflandırmalar önerilmiştir:

- Canlı GDM'lar içeren ya da bunlardan oluşan ürünler.
- Cansız GDM'lar içeren ya da bunlardan oluşan ürünler.
- GDM ile fermantasyon işlemleri vasıtası ile elde edilen ürünler. Fermantasyon işlemi sonrasında, GDM'lar ortadan kaldırılmıştır.

3. Gıda güvenliği değerlendirme süreci

3.1. İlke

Mikrobik fermentasyon teknolojisi, tarihsel olarak da kanıtlanmış olan, besin değeri yüksek ve hijyenik kalitede gıda üretimi için rasyonel bir mekanizma sağlamaktadır. Mikrobiyal fermentasyon işlemleri, genel gıda üretiminin yaklaşık ¼ 'ünü sağlamaktadır. Bu fermentasyon süreci; ekmek, ekşi hamur, kefir ve krema, yoğurt, peynir, turşu, fermente et, sirke, şarap ve bira gibi besinleri içermektedir. Modern biyoteknolojik yaklaşımların son zamanlarda gıda üretimine girişi, gıda güvenliği için yeni konuların detaylandırılmasını gerektirmektedir.

Bu amaçla uygulanan genel geçer prensiplere istinaden gıdada GDM'ların güvenlik değerlendirmesinin genel prensipleri, mikroorganizmaların doğasına ve gıdadaki kullanımına özgüdür. Bu ilkeler, GDM'ları içeren yeni gıdaların güvenlik değerlendirmesiyle ilgili anlaşmalar ve büyük ölçüde eşdeğerlik kullanımına ilişkin öneriler yoluyla FAO / WHO, OECD, WHO / ILSI, EC tarafından kabul edilmiştir. Bunlar, özel durumlarda gerekli olan testlerin kapsamının belirlenmesi için güvenlik değerlendirme sürecinin ve karar şemasının hazırlanması için bir rehber geliştirmenin yanı sıra, büyük ölçüde eşdeğerlik kavramını kullanarak entegre edilmiş adım adım yaklaşımının ve vaka bazlı çalışmaların uygulanmasını hedeflemektedir. EC Yönetmeliği 1829/2003 uyarınca, piyasaya GD gıda ve yem sürülmesine, çevrenin yanı sıra insan ve hayvan sağlığı üzerinde yol açabilecekleri herhangi bir riskin tanımlanmış bilimsel değerlendirmesinden sonra yetki verilmektedir (Direktif 2001 / 18 / EC).

3.2. Belirli hususlar

GDO(M)'lardan üretilen gıdaların güvenliğinin değerlendirilmesi için değerlendirme prosedürünün hazırlanması, aşağıdaki önemli ilkelere tabi tutulmaktadır:

- Dezavantajlı olanlar (bağışıklık sistemi zayıflamış kişiler, yaşlılar ve bebekler) dâhil olmak üzere insan nüfusunun sağlık açısından değerlendirilmesi.
- Değerlendirme yöntemleri açısından bilimsel verilerin, güvenlik değerlendirmesinin ve iyi uygulamaların gerçekleştirilmesinin arka planı olarak uygulanması. Güvenlik değerlendirmesinin, elde edilen yeni verilere göre revize edilmesi.

- Genetik modifikasyon işleminin detaylı tanımlanması – örn; eksik veya fazla DNA dizileri, alıcı mikroorganizmaları, nihai donör organizmaları, GDM’ların yapımında uygulanan vektörlerin yapıları; kontrakt; elde edilen GDM’nun tanımı.

Bu ilkeler, GDM’ların uygulanması ile üretilmiş olan gıdaların güvenlik değerlendirmesi için birkaç önemli nedeni dikkate alarak uygulanmalıdır:

- İnsanların gıdaya ya da GDM’nun kendisine maruz kalma yolu.
- Gen ifadesinden, konaktaki metabolik yollardan DNA bozulmasından gelen olası ikincil etkilerle ilgili bilgiler.
- Kullanılan besin ortamının (makro ve mikro besinleri) detaylı özellikleri ve yan ürünlerin üretimi: endojen toksik maddeler, alerjenler ve fizyolojik aktif maddeler.
- Mikroplar ve bitkiler arasındaki doğal farklılıkların ve GDM üzerindeki gıda matrisinin etkisinin tanımı.

3.3. Ek unsurlar

Güvenlik değerlendirmesinde aşağıdaki unsurlar dikkate alınmalıdır:

- Metodolojik özellikler: Genetik modifikasyon için kullanılan teknikler, yeni DNA’nın beklenen protein ekspresyon ürününün nitelendirilmesi; suş belirlenmesi ve karakterizasyonu (alıcı, verici, GDM’nun kendisi).
- Konukçu suş: Doğal yaşam alanı, insanlar tarafından kullanım geçmişi, patojenik potansiyeli, güvenlik ve besin değerlendirme (potansiyel toksisite ve besleyici yönleri).
- Çevresel olaylar: Gen transferi ve genetik istikrar.
- GDM’den elde edilen gıdalar: GDM içeren gıda bileşimi, işleme, pişirme ve saklama etkileri.
- GDM: GDM’nın, gastrointestinal flora ve memeli konak arasındaki etkileşimi; bağışıklık sistemi üzerindeki etkisi.

4. Genetiği değiştirilmiş gıdalar ve insan sağlığı - potansiyel riskler

4.1. Genetiği değiştirilmiş gıdaların uygulanmasının insan sağlığı üzerinde yarattığı riskler

GDM’ların yardımı ile elde edilen gıdaların güvenliğinin değerlendirilmesi, genellikle aşağıdaki araştırmalar sonucunda gerçekleştirilmektedir:

- Doğrudan sağlık etkileri (toksikite).
- Alerjik reaksiyona neden olma olasılığı (alerjik özellikler).
- Beslenmeyle ilgili ya da toksik etkilere neden olan belirli bileşenlerin tanımlanması.
- Eklenen gen stabilitesinin değerlendirilmesi.
- Genetik modifikasyon ile ilişkili beslenme etkilerinin tanımlanması.
- Gen eklemekten kaynaklanan beklenmedik etkiler.

4.2. Risk değerlendirme yaklaşımları

Genetiği değiştirilmiş gıda uygulamasının, insan sağlığı üzerindeki başlıca etkileri, alerjik reaksiyona neden olma (alerjen özellikler), gen transferi ve açık döllenme olmak üzere üç ana yönde özetlenir.

- **Alerjen özellikler:** Geleneksel olarak yetiştirilen gıdalar, genellikle alerjenik özellikleri bakımından test edilmez. GDM'lu gıdalar için temel sorun, aktarılan genin protein ürününün, alerjik olmadığını kanıtlamaktır. GDM'lu gıdaların test edilmesi için olan protokoller, FAO ve WHO tarafından değerlendirilmiştir. Şu anda piyasada bulunan GDM'lu gıdaların alerjik etkisi görülmemiştir.
- **Gen aktarımı:** GD gıdalardan, insan vücudundaki hücrelere ya da gastrointestinal sistemde oluşan mikroorganizmalara gen aktarılma imkânı, aktarılan genetik materyalin, insan sağlığını olumsuz etkileyip etkilemeyeceği konusunda endişe yaratmaktadır. Bu olay, yukarıda da bahsedildiği gibi, makro/mikro düzeyde GDM'ların oluşumunda kullanılan antibiyotik direnci için genlerin organizmaların içine transferiyle ilgilidir. Bu nedenle, antibiyotik direnç genlerini dâhil etmeden teknolojilerin kullanılması, bu transfer için olasılığın düşük olduğuna bakılmaksızın, cesaret vericidir. En son yapılan FAO /WHO uzman paneli, bu alanda çalışan bilimsel topluma bu politikayı önermektedir.

Aşağıdaki örnekte, bu olayın bir açıklaması verilmiştir. Antibiyotiklerin tıpta ve tarımda yaygın halde kullanılmasından dolayı antibiyotik direnci yaygın hale gelmiştir. Bununla ilgili, mideye girmiş bitki DNA'sından bağırsak mikroflorasına yapılan herhangi bir nadir transfer olayının, insan sağlığı üzerinde önemli bir etkiye sahip olmayacağı konusunda görüş birliği vardır. Ama bazı transgenik mısır çeşitlerinde meydana gelen ampisilin direnç geni *bla* - TEM, ruminal *E.coli* suşlarında zaten bulunmaktadır ve insan bağırsak suşlarının % 10 - 50 de ampisiline karşı zaten dirençlidir. Böyle bir olay olursa ve insan patojenleri, gen transferi yoluyla

antibiyotik direnç kazanırsa, transgenik malzemeleri besleyerek yeni bir rotanın açılması mümkün olacaktır.

- **Dış dozlaşma (Kendi soyu dışından üreme):** Bu terim, GD bitkilerden geleneksel ürünlere ya da ilgili türlere gen transferi olarak tanımlanmaktadır. Bu, gıda güvenliği ve emniyeti üzerine dolaylı etkisi nedeniyle, GDO kullanılarak elde edilen ürünlerin geleneksel tohumlardan elde edilen ürünlerle karıştırılmasıyla gerçekleşebilir. Böyle bir riskin olabileceği gerçeğini gösteren bazı olaylar vardır: Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri'nde insan tüketimi için üretilmiş olan mısır ürünlerinde, sadece yem amaçlı kullanılan bir mısır türünün izleri ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, bazı ülkeler (Arjantin, Kanada, Güney Afrika, ABD, AB), her iki türün (GD ve konvansiyonel) de yetiştirildiği (mısır, soya fasulyesi, kolza tohumu, hindiba, kabak, patates) alanların düzgün bir şekilde ayrılması dâhil olmak üzere karıştırmayı azaltmak için bazı önlemler uygulamıştır. Şuanda uluslararası piyasada bulunan tüm GD ürünler, mikroorganizmalardan gelen genler kullanılarak tasarlanmıştır. Üç temel özelliklerden birisi ile nitelendirilmektedirler: böcek hasarına karşı direnç, viral enfeksiyonlara karşı direnç ve bazı herbisitlere (bitki öldürücülere) karşı direnç.

4.3. GDM'lara özgü güvenlik konuları

Bitkileri değiştirmek için kullanılan rekombinant DNA teknikleri, genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların tasarımında kullanılanlara benzemektedir. Yukarıda belirtildiği gibi, mikroorganizmaların farklı genetik özellikleri karıştırılmaktadır ve güvenlik nedenleriyle dikkate alınmalıdırlar. Gıda üretimine uygun mikroorganizmalar Gram + ve Gram - bakteriler, maya ve filamentli mantarlardır. Bazı ortak teknikler mevcut olmasına rağmen, genomlarının ve rekombinant genetik teknolojilerinin farklılıkları bulunmaktadır.

Tasarımla bir birleştirme alanı uygulanabileceği ve istenmeyen bir DNA, kolayca çıkarılabileceği için, bakterilerde homolog (eştürel) rekombinasyonunun kullanılmasının, önemli bir avantajı vardır. Böylece, tanıtilen DNA'nın seçimi ve bakımı için güvenli gıda kullanımı ile uyum içinde olan uygun seçim yöntemlerinin geliştirilmesi ile bir homolog gen sistemi tasarlanabilir. Bu özellikler, genetik modifikasyon prosedürleri üzerinde kontrolü kolaylaştırmaktadır.

Bazı bakteri ve mayaların genom dizisi verilerinin var olması sebebiyle son zamanlarda GDM'ların güvenlik değerlendirmesi artmıştır. Belirli bir mikroorganizma için tam genom dizisinin elde edilmesi, belirli bir gen teknolojisinin ölçülmesi ve değerlendirilmesi için

gerçekçi bir bilimsel temel oluşturmaktadır. Genom sonrası analitik yöntem ve teknik cihazların geliştirilmesi, tüm genom düzeyinde gen ekspresyonu analizi için güvenilir bir fırsat vermektedir. Mikro dizi DNA teknolojisinin başarısı, nükleik asit problemleri aracılığıyla genomun bütün genlerinin araştırılmasını sağlamıştır. Bu nedenle, farklı suşlar ve ortamlarda bireysel genlerin varlığı ve gen ekspresyonu gösterilebilir. Proteomikteki gelişmeler, bütün hücrelerden izole edilmiş proteinlerin, iki boyutlu jel elektroforezi ile ayrılmasını ve analiz edilmesini sağlamaktadır. Bu şekilde, farklı ortamlardan gelen suşlar arasında bir karşılaştırma yapılabilmektedir. Kütle spektrometresi kullanılarak, tek bir protein tespit edilebilir ve böylece ayrılan protein noktalarının belirli genlerle olan ilişkisini kolaylaştırabilir. Gıda işlemede kullanılan mikroorganizmalar, nihai üründe canlı bulunabilmektedir ve tüketicinin içine sokulabilmektedir. Bu nedenle, organizmalar ve tüketici arasındaki etkileşim (doğrudan veya dolaylı) için bir potansiyel gerçekten de bulunmaktadır. Bu nedenle, gıda işlemede kullanılan mikroorganizmaların; patojenik, toksijenik veya alerjik olmadığını ve genetik modifikasyonun bu organizmaların güvenli durumlarını değiştirmediğini kesin olarak kanıtlamak çok önemlidir. Bu bağlamda tüketilen GDM'lerin akıbeti ve gastrointestinal sistem ve bağırsak mikroflorası üzerindeki etkileri dikkate alınmalıdır. Burada, beslenme yoluyla insanlar üzerindeki etkilerini göz önünde bulundurarak GDM'lerin hayvan sağlığı düzeyi üzerine de etkilerine dikkat etmek önemlidir. İfade edilmiş olan en genel endişelerden birisi de değiştirilmiş gen dizilerinin, bağırsak mikroorganizmalarına ya da konukçu hücrelere transferi olasılığıdır. Beslenme kaynaklı DNA parçalarının nadir kazanımı, göz ardı edilemez ve ruminant beslenmelerde normalde mevcut olmayan genlerin olası etkileri göz önünde bulundurulmalıdır.

5. Gıda üretiminde GDM 'lar

Gıda güvenliğinin belirli bir yönü, esas olarak gıda üretiminde GDM 'lerin uygulanmasını ilgilendirmektedir. Burada, GDM ve yiyecekte ya da mide-bağırsak yolunda yer alan diğer mikroorganizmalar arasında olası bir gen transferi tartışılmaktadır. Ayrıca, seçim için kullanılan genetik belirleyicilerin güvenliği (örneğin - antimikrobiyal direnç geni) ve bağırsak mikroflorası ile potansiyel GDM etkileşimi ve bağışıklık sisteminin tepkisi değerlendirilmektedir. Bu bağlamda, bu alandaki mevcut bilgi durumuna dair ve bilimsel yöntemlere dayalı olası sağlık risklerinin tahmini için bir değerlendirme yapılmıştır.

5.1. Genetik değiştirme teknikleri

5.1.1. Klasik yöntemler

Mikroorganizmaların genom modifikasyonu için klasik yöntemler iki tipe ayrılır:

- Kendiliğinden ortaya çıkan ve çevredeki farklı fiziksel ve kimyasal faktörlerin neden olduğu mutasyonların seçimi. Kendiliğinden olan mutasyonlar, bir nükleotidin diğerinin yerine konması, bir veya daha fazla nükleotidin eklenmesi ya da çıkarılması ya da diğer yeniden oluşum tipleri nedeniyle kalıtsal DNA molekülündeki düzenlenmelerin sonucudur. Çift iplikli DNA'da hareketli (transpozıblı) elementlerin yeni yerlere doğru hareketi nedeniyle bir sürü kendiliğinden olan mutantlar ortaya çıkmaktadır. Bu tür elementler; bitkiler, hayvanlar ve mikroplar için tipiktir.
- Yakından ilişkili organizmalar arasında DNA değişimi. Mikroorganizmalarda bu tip bir gen modifikasyonu, kromozomal ya da plazmid DNA aracılığı ile yeni genetik bilgi girişini ilgilendirmektedir. Bu olay, donör mikroorganizmanın kromozomundan alınan DNA'nın alıcı mikroorganizmanın DNA'sına entegre edildiği zaman gerçekleşmektedir. Kendi kendine çoğalan plazmidler, donörün DNA'sını, alıcının kromozomal DNA ile entegre edilmeden alıcıya transfer etmektedir. Bu nedenle, plazmit DNA, donör olanlara kıyasla çok farklı organizmalara aktarılabilmektedir. Kendi molekülünde bulunan belirleyiciler (örneğin antibiyotik direnci) sayesinde plazmidin hareketi kolayca gözlenebilmektedir. Gen transferinin üç farklı klasik tipi, bakterilerin ayırt edici özelliğidir. Bu üç mekanizmanın doğal olarak oluştuğu düşünölmektedir:
 - DNA aracılı transformasyon (DNA, "çıplak" DNA olarak aktarılmaktadır).
 - Transdüksiyon - DNA transferine bir virüs aracılık etmektedir.
 - Konjugasyon – DNA, donör ve alıcı hücreler arasında hücre-hücre teması sırasında aktarılmaktadır.

5.1.2. Moleküler teknikler

Mutagenез ve gen aktarım yöntemlerindeki son moleküler teknolojik gelişmeler, oldukça ilgisiz organizmalardan gelen DNA'nın sokulabildiği mikroorganizma yelpazesini ciddi derecede genişletmiştir. Tür bariyeri ve alem bariyeri artık aşılmaz engeller değildir.

Bakterilerde kullanılan mevcut yöntemler, eklenen gen rekombinant yapıların, belirli bölgelerden kromozom ya da plazmide entegre edilmesini sağlar. Bununla birlikte, gen değiştirme süreçleri, güvenlik değerlendirmelerine tabi tutulmalıdır. şu önemli özellikler, bir

tartışma konusudur: eklenen gen(ler) açısından konakçı mikroorganizmanın kendine has özellikleri, vektör ve konstrağın özellikleri; DNA transferi yöntemleri.

Bakteriler, konukçu mikroorganizmalar olarak kullanıldığı zaman, güvenlik değerlendirmesi prosedürü, bir yiyecek ya da bir gıda bileşeni olarak bu mikroorganizmanın güvenli tüketim geçmişini gerektirmektedir. Bu kanıt yok ise, konağın güvenliği sağlanmalıdır. Ökaryotik konakçı için, aynı güvenlik değerlendirmeleri uygulanmaktadır.

Eklenen gen(ler), aynı mikrobik türden ya da evrimsel olarak daha uzak bir organizmadan alınabilir. Eklenen gen ürünlerinin, gıdada güvenli kullanım öyküsü olmalıdır ya da güvenliği ispat edilmelidir. Eklenen DNA parçası ne kadar kısa olursa, gıda güvenliği değerlendirilme prosedürü o kadar azaltılmış/ kolaylaştırılmış olacaktır.

Vektör ve yapının özellikleri ile ilgili olarak - kullanılan vektör, GDM genomunun bir parçası ise, replikonlar, promotör, seçici belirleyiciler, bağlayıcılar ve DNA'nın herhangi bir başka parçası dâhil olmak üzere tüm DNA dizisi karakterize edilmelidir. Vektör, gıdada güvenli kullanım geçmişi olan mikroorganizmalardan nükleotid dizisi içermelidir. Seçici belirleyiciler, çok titizlikle ve güvenli kullanıma dayalı olarak seçilmeli ve antimikrobiyal direnç belirleyicilerden kaçınılmalıdır. Kullanım durumunda, GDM genomundan uzaklaştırılması için özel yöntemlerin uygulanmalıdır (örn, diziye özgü rekombinasyon). Ökaryotlar için, sentromer plazmidler, maya yapay kromozomu, öldürücü faktör belirleyicilerine dayalı plazmidler gibi belirli klonlama vektörleri tasarlanmıştır.

DNA transferi yöntemlerinden bahsetmişken - konukçu genomda başlıca genetik düzenlemeleri en aza indiren fiziksel, kimyasal ve biyolojik doğanın DNA transferi yöntemlerini kullanmak için öneriler bulunmaktadır. Bütünleştirici vektörlerin kullanılması durumunda, kromozomun entegrasyon alanında yan bölgelerin nükleotid dizileri, karakterize edilmelidir. Bu bilgiler, kullanılan yöntemlerin riskini tahmin etmek için gereklidir.

Ökaryotlarda, *in vitro* değiştirilmiş ya da oluşturulmuş gen yapılarının, spesifik kromozomal bölgelere yöneltilmiş entegrasyonu için ve bazı türlerde uygulanabilen genlerin silinmesi için güvenilir yöntemler vardır.

Bu yöntemlere dayanarak, transgenik yapılar oluşturulmuştur ve bu yapılar, hücrelerin bitkisel büyüme dönemlerinde oldukça istikrarlıdır. Yerel mikrofloranın ilgili suşları ile eşleştirme yoluyla rekombinasyon olasılığı bulunmaktadır. Kullanılan suşların genetik özellikleri iyi bilinmediği zaman, olası rekombinant olaylarıyla ilgili yetersiz bilgi, yabancı genlerin mekanizmasını ve entegrasyon bölgesini öngörmeyi imkansız kılar. Bu nedenle, maya ve filamentli mantarların genetik manipülasyonunda kullanılan yöntemin, çeşitli bölgelerde

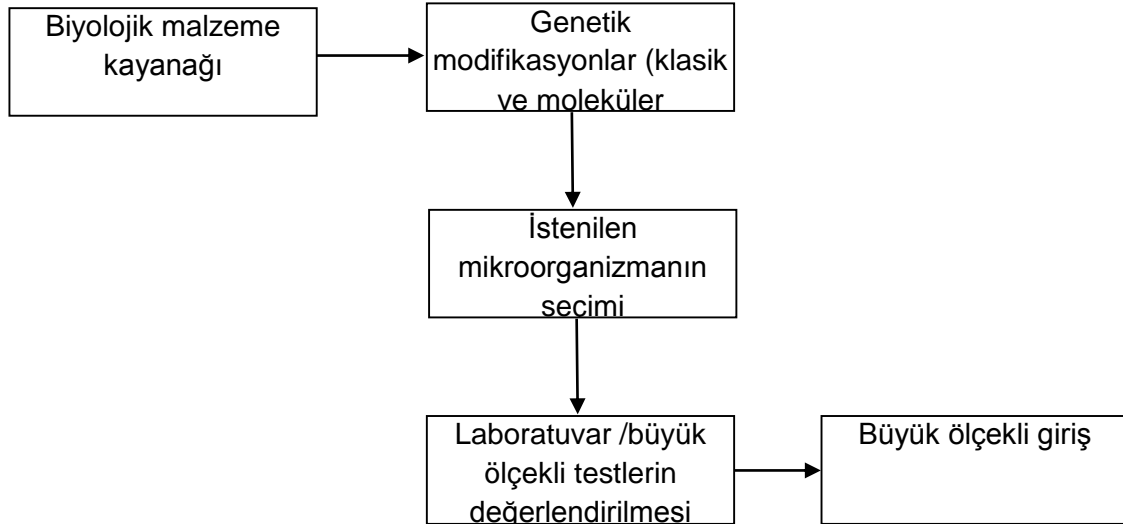
entegrasyon sağlaması mümkündür, bu da GDM'lerin biyoteknolojik özelliklerinde ve genetik dengesinde farklılıkların oluşmasına neden olabilir.

5.1.3. Klasik ve moleküler yaklaşımların karşılaştırılması

Mikroorganizmaların genetik modifikasyon metodolojisi ile ilgili "klasik" ve "moleküler" terimleri, zaten belirtildiği gibi, genetik değişkenliğin artırılması ile ilgilidir. Bu etki, spontan veya mutajenle başlatılmış değişim, hibridizasyon ya da gen transferi ile klasik yöntemler kullanılarak elde edilmektedir. Bu yöntemler, gen değişiklikleri için moleküler yöntemlerle karşılaştırıldığında doğru değildir ve herhangi bir şeye yönelik değildir ve daha az etkilidir. Ama DNA değişiklikleri ve gen transferine neden olan klasik ya da moleküler tekniklerle mikroorganizmaların genetik modifikasyonları arasında kavramsal olarak hiçbir ayrım olmadığına hiç şüphe yoktur.

Şekil 1, mikroorganizmaların genetik modifikasyonunu ve çevreye girmeleri için yolları göstermektedir. Burada; laboratuvar, alanda ya da büyük ölçekli ortam girişlerinde değerlendirme aşamalarında klasik ya da moleküler ıslah yöntemlerinin uygulanıp uygulanmaması noktasında her iki yöntem de bütünleşmiştir.

Şekil 1:



Bu kavramı karakterize eden temel biyolojik ilkeler, 'Saha Testi Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar: Karar Çerçevesi (1989)' raporunda açıklanmıştır:

- Ortama girmesi konusunda karar vermek için birincil odak noktası, sürecin kendisi ile değil, genetik modifikasyon ve seçim ile elde edilen üründür.

- Ürünün nitelendirilmesinde, kullanılan süreçle ilgili bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır. Ama sürecin doğası, ürünün az ya da çok denetlenip denetlenmemesine karar vermek için yeterli bir kriter değildir.
- Moleküler ya da klasik yöntemlerle değiştirilmiş mikroorganizmaların tepkileri, aynı fiziksel ve biyolojik yasalara dayanmaktadır. Klasik değişikliklerin ürünleri hakkındaki bilgi birikimi; göreceli güvenlik ve risk değerlendirmesi açısından moleküler tekniklerin uygulanması ile elde edilen bir ürün üzerinde uygulanabilir.

5.2. Genetiği değiştirilmiş gıdaların kontrolü için moleküler yöntemler

5.2.1. Suş belirleme yöntemleri

Konukçu mikroorganizmanın taksonomik durumu, güvenlik değerlendirmesinin öneminin bir özelliği olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, genetik manipülasyonlar için kullanılan mikroorganizmalar, uygun bir yöntem kullanılarak taksonomik olarak incelenmelidir. Bu, bilimsel, üretim ve güvenlik açısından yeterli bir şekilde karakterize edilmelidir. Şu anda, mikroorganizmaların taksonomik durumunun uygun karakterizasyonu için en kesin araç, DNA/DNA hibridizasyon tekniği ve 16S rRNA dizi tespitidir. Bu yöntemler, araştırma altındaki mikroorganizmaların taksonomik durumu hakkında önemli bilgiler vermektedir. Şu anda, fenotipik karakterizasyonu için standart biyokimyasal / fizyolojik yöntemler, piyasadadır ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Suş karakterizasyonu için önemli bir özellik de, patojenik özellikleri hakkındaki bilgidir.

Genetik modifikasyon işleminin uygulanmasından sonra, elde edilen GDM suşları, konukçu mikroorganizmaların güvenli özelliklerini sürdürmelidir. Yeni suş, güvenliğini değerlendirmek için fenotipik ve genotipik özellikler dâhil olmak üzere aynı yöntemler ve doğruluk ile karakterize edilmelidir. Konukçu ve GDM arasındaki doğru bir karşılaştırma; restriksiyon analizi, rastgele arttırılmış polimorfik DNA analizi (RAPD PCR), amplifiye parça uzunluk polimorfizmi (AFLP), protein profillemeye gibi mevcut moleküler teknikler kullanılarak yapılabilir. Analiz, ayrıca genom sıralamasına genişletilebilir.

GDM güvenlik değerlendirmesi açısından incelenmesi gereken diğer önemli faktörler de şunlardır: genetik modifikasyonun, konukçu mikroorganizmanın özellikleri, genetik sistemin stabilitesi, gen yapısının işlevsel özellikleri üzerine etkisi.

Tüm bu özellikler, GDM'lar tarafından elde edilen ürünlerin ve çevre üzerindeki etkilerinin güvenlik değerlendirmesi sürecinde önemlidir.

Üretim suşları, kirletici suşları ya da patojenleri tanımlama yöntemleri, genotip ve fenotip düzeyde uygulanan tekniklerden oluşmaktadır. Genotip yöntemler, rDNA dizileme analizi, DNA baz kompozisyonu ve DNA/DNA hibridizasyon gibi araçları içermektedir.

DNA dizileme, özellikle *rDNA dizileme analizi*, rDNA dizilerinin karşılaştırmalı çalışmalarını amaçlamaktadır. Bu, uygun primerler kullanılarak PCR ile parçaları ya da hemen hemen tüm 16S veya 23S rDNA molekülünü doğrudan dizileme yoluyla gerçekleştirilir.

DNA baz oranı (mol yüzdesi G + C), bakteri taksonlarının standart tanımının bir parçası olan klasik bir genotipleme yöntemidir. Gözlenen aralık, tür içinde en fazla % 3 ve bir familya içinde en fazla % 10'dur. Bakteriler arasında G + C içeriği, % 24 ve 76 arasında değişmektedir.

DNA/DNA hibridizasyonu, hem çok çeşitli mayalar ve mantarların, hem de hemen hemen tüm bakterilerin belirlenmesi için uygulanmaktadır.

Bu yöntemlerin taksonomik çözünürlüğü ile ilgili olarak DNA/DNA hibridizasyonu, sadece türlerin karakterizasyonu için kullanılırken, rDNA dizileme analizi ve DNA baz kompozisyonu, familya ve türlerin tanımlanması için kolayca uygulanmaktadır. Genotipleme yöntemlerinin, bakteri ve mayalar için ve küçük ölçüde de mantarlar (sadece rDNA dizileme analizi) için yararlı uygulamaları bulunmaktadır.

Fenotipleme moleküler yöntemler, hücresel yağ asitleri parmak izi ve toplam hücresel protein elektroforetik desenleri içermektedir. Bu yöntemler özellikle bakteri tanımlamada kullanılmaktadır ve ilki familya ve türlerin seviyesi için geçerliken, ikincisi rutin olarak türlerin tanımlaması için kullanılmaktadır.

5.2.2. Tipleme yöntemleri

Moleküler biyoloji tekniklerinin tanıtılmasıyla türleri ve ayrıca belli bir türün izolatlarını birbirinden ayırt etmek için DNA tabanlı tipleme yöntemleri, tasarlanmıştır. Bu yöntemleri uygulayarak elde edilen veriler, sadece çevrede değil aynı zamanda gıdalardaki besin bozucu mikroorganizmaların ya da patojenik olanların yaygınlaştırılması ve sürerliği hakkında bilgi sağlayabilir. Bu nedenle, DNA tabanlı tipleme yöntemleri, epidemiyolojik amaçlı kullanılabilir ve tek bir izolattan kaynaklanan çakışık fakat bağımsız enfeksiyonları ve salgın hastalıkları ayırt etmeye yardımcı olabilir. Bu, koruyucu ve hijyenik tedbirlerin uygulanışını kolaylaştırabildiği için özel bir önem taşımaktadır.

Genotipleme yöntemleri genellikle teknik yönlerle dayanarak kategorize edilmektedir. Buna göre, aşağıdakiler listelenebilir:

- DNA dizileme;

- Plazmid ve/veya genomik DNA'nın endonükleaz desen analizini kısıtlama (örneğin Kısıtlama Parçası Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Pulse Field (Darbeli alan) Jel Elektroforezi (PFGE));
- Prob-tabanlı teknikler (etiketleme yöntemleri);
- PCR temelli teknikler (örneğin, Rastgele arttırılmış polimorf DNA (RAPD) ve Arttırılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP) gibi amplifiye yöntemleri).

Kısıtlama Parçası Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), bu molekül boyunca 6- ve 8- mer dizisinin konumu ve sayısı ile ilgili DNA moleküllerinin (kromozomlar, plazmidler ve ökaryotlardaki mitokondrial DNA) doğal değişkenliği araştırmaktadır. Böyle bir DNA'yı restriksiyon endonükleazı ile kesme, Agaroz Jel Elektroforezi (AGE) ile ayrılabilen ve etidyum bromid ile boyamadan hemen sonra (sınırlı sayıda parçanın, olması durumunda, örneğin 50'den az) ya da etiketlenmiş belirli proplar ile hibridizasyondan (melezleme) sonra görülebilen farklı uzunluktaki parçaların üretimiyle sonuçlanır.

Pulse-Field Jel elektroforezi (PFGE), kromozomlar gibi büyük DNA moleküllerinin ayrılmasında başvurulan bir tekniktir. Bu, sınırlı sayıda parça üreten nadir kesme restriksiyon endonükleazlarıyla kesim sonrası elde edilen büyük DNA parçalarının ayrılması için de uygulanabilir. Son derece polimorfik olan kromozomlar/büyük parça desenleri, suş tanımlanması için çok yararlıdır.

Prob tabanlı yöntemler (etiketleme yöntemleri). Bu yöntemler, bir nükleik asit parçasının içine ya da sonuna prob ekleme ile ilgilidir. Temel yöntemin farklı varyasyonları, çeşitli faktörlere bağlı olarak bulunmaktadır. Nükleik asit türü, büyüklüğü ve miktarıyla ilgili olarak 3 've 5' uç etiketleme, çentik translasyonu ile rastgele etiketleme ve rastgele birincil etiketleme olmak üzere 4 etiketleme yöntemi sıralanabilir. Etiketleme molekülü hususunda, yani doğasıyla ilgili, radyoaktif ve radyoaktif olmayan etiketlemeler keşfedilebilir. Radyoaktif olmayan etiketleme floresan, kemo-luminesans ya da enzimatik reaksiyonları kullanırken, radyoaktif etiketlemede ise radyoizotoplar, otoradyografi ile tespit edilmektedir.

PCR tabanlı teknikler (amplifikasyon yöntemleri). Bu yöntemlerde, nükleotid dizisinin *in vitro* enzimatik amplifikasyonu, suş tanımlama amacıyla incelenmektedir. Temel PCR protokolü ve modifikasyonları, bir DNA'nın ilgi dizisinin, saptama ve üretim tiplerinin, kirletici ve patojenik suşların çoğaltılması için güçlü araçlardır. Bir gıda ürününde bulunan bir organizmanın doğrudan tanımlanmasını hedefleyen PCR tabanlı yöntemlerin geniş çeşitliliği içinde, RAPD ve AFLP analizleri, en yaygın olarak kullanılanlardır.

Rastgele arttırılmış polimorf DNA (RAPD), bir hedef sekans ile ilgili öncesinde herhangi bir bilgi olmaksızın bir DNA bölgesinin çoğaltılmasına dayalı rastgele bir tip PCR yöntemidir. Rastgele 10-mer primerlerin tasarlanması ve düşük kesinlikte kontrol amplifikasyon koşullarının uygulanmasıyla genel olarak tek özgün bir dizi amplifiye dizisi elde edilebilir. Bu son durum, RAPD-PCR'nin, mikroorganizma populasyonları arasındaki farkı ortaya koymak için güvenilir bir yöntem olarak kullanımına katkıda bulunmaktadır.

Amplified (Çoğaltılmış) Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP), türler arası ve tür içi ayırım için uygulanabilen, bireyler arasındaki polimorfizm tespiti için son derece hassas bir yöntemdir. Bu, bir havuzdan seçilmiş DNA parçalarının PCR geçişli RFLP'idir. AFLP, bazı parçaların seçici amplifikasyon (çoğaltılması) ile arttırılmış parçaların uzunluğunda polimorfizm için inceleme yapar. Yöntem, elde edilen parçalarının PCR amplifikasyonunu takiben genomik DNA'nın 2 restriksiyon endonükleazı ile sindirimini içerir. Restriksiyon parçaları, deneyde kullanılan endonükleazlara özel adaptörlerle (çoğaltılmanın) amplifikasyonunun öncesinde modifiye edilir ve böylece primer bağlanma yerleri olarak görev yapar. Sadece primerler sekansı ile tam olarak eşleşen parçaların amplifiye edilecek olması nedeniyle, primerlerin kendisi adaptörlere bağlanacak ve çok özel bir amplifikasyon (çoğaltma) sağlayacak şekilde tasarlanırlar.

5.2.3. Suş tespit ve izleme yöntemleri

Burada, sadece genotipleme yöntemleri, yani ayırt etme etkisinin; bakteriler, mayalar ve mantarlarda familya, tür ve suş düzeyinde tespitini kapsayan DNA problemleri üzerinde durularak yukarıda listelenmiş olan tüm tipleme teknikleri incelenmiştir.

5.3. GDM'lerin tespiti ve ölçülmesi için moleküler yöntemler

5.3.1. GDM tespiti

Sağlık ya da endüstriyel amaçlı kullanılacak ilk Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO) modifiye edilmiş suşlar olan *Escherichia coli* ve insülin üreten *Saccharomyces cerevisiae*'dir. Bu dönemden itibaren çok sayıda rekombinant mikroorganizma hayata geçirilmiştir. Sınırlandırıcı koşullar altında endüstriyel biyoreaktörlerde kullanılırlar ve bu tür işlemler, genellikle bir GDO tespit teknolojisi gerçekleştirilmesini gerektirmemektedir.

Böyle özel bir ihtiyacın sonucu, doksanların ortasında doğal ortamda genetiği değiştirilmiş (GD) hayvan ve bitkilerin girmesi ile ortaya çıktı.

GDO'lu ürünler, ağırlıklı olarak gıdalarda güvenlik değerlendirmesi ve çevrenin potansiyel değişikliği için, özellikle Batı Avrupa'da, önemli bir tartışma başlatmıştır. Tüketicilerin

endişelerini gidermek için GDO bulundurmadığı garanti edilen gıdalar öne sürülmüştür. Ancak, gıda hazırlamada sadece hammaddeler değil, aynı zamanda, nihai ürünün içinde küçük miktarlarda bulunabilen, bitki kökenli çok sayıda katkı maddeleri de kullanılabilir. Bu, örneğin soya fasulyesinden elde edilen lesitin ile olan durumudur. Lesitin, çikolatalı hazırlıklarda kullanılan birçok endüstriyel tariflerde, çikolatalarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Analiz edilecek hedef, saflaştırılmış lesitinin kendisi (genetiği değiştirilmemiş soya fasulyesinden elde edilen lesitinle aynıdır) değildir, ancak değiştirilmiş bazı DNA dizileri ya da onlar tarafından kodlanmış olan rekombinant protein(ler)dir. İkinci bahsedilen, sadece eser (iz) miktarda bulunabilir, bu nedenle tespit edilmeleri için çok hassas yöntemler gereklidir.

5.3.2. Tespit yöntemlerinin çeşitleri

GDO ya da onun türevinin saptanması, özellikle genetik modifikasyon ya da ürünü ile bağlantılı olan (genetik değişim ile bağlantılı rekombinant protein) başlıca hedef (DNA dizisinin kendisi ve en sonunda da RNA) olan molekülünün tespit edilmesi ile gerçekleştirilebilir. Mevcut yöntemlerin büyük bir kısmı, DNA tespiti ile ilgilidir ve sadece birkaç teknik, RNA ve protein tespiti uygulanmaktadır. Bu durumun nedenleri şu şekildedir:

- DNA, PCR kullanılarak hızlı ve etkin bir şekilde çoğaltılabilir ve saflaştırılabilir. RNA ve proteinlerin çoğaltımı, daha karmaşık ve zaman alıcı bir süreçtir.
- RNA stabil değilken, DNA stabil bir moleküldür. Protein, gıda işleme sırasında kolayca sıcaklık denatürasyonuna tabi tutulur, böylece stabilitesi çeşitli dış faktörlere bağlıdır.
- Modifikasyon unsuru, nükleer DNA ise, onun miktarı ve GDO miktarının doğrusal bağımlılığı vardır. Ancak, bu tür bir ilişki, GDO miktarı ve RNA/Protein arasında nerdeyse hiç gözlenmez.
- Genetik modifikasyon, DNA düzeyinde yapıldığı için, bu değişimi aynı seviyede tespit etmek mantıklıdır.

Günümüzde, tüm ticari GDO'lar, yabancı nükleer DNA'ya sahiptir.

5.3.3. Protein bazlı yöntemler

Bu yöntemlerin temeli, immünolojiktir ve "antijen-antikor" türünü ve klasik ELISA analizinin spesifik bağlanmasında yatmaktadır. Antijen-antikor reaksiyonu, yabancı molekülü ayırt eder, buna bağlanır ve böylece de elde edilen bağlanmış kompleks, genellikle bir kromojenik reaksiyon ile tespit edilir. Antijeni tespit etmek için gereken antikor, saflaştırılmış antikorun kendisine ulaşmadan geliştirilemez, saflaştırılmış antikor, ya yapay olarak amino asit dizisinde sentezlenebilir ya da çalışılan GDO'dan saflaştırılır.

Genel olarak, bir transgenin ürünü, küçük bir polipeptid ya da herhangi bir dokuda ve bitkinin yaşam döngüsünün herhangi bir anında kuvvetli bir yapısal promotörün kontrolü altında ifade edilebilen bir proteindir. Bu şekilde, protein analitik bir hedef oluşturmak için yeterli miktarda bulunmaktadır. Ancak, daha yeni GD bitkilerde, istenen protein, sadece uyarılabilir bir promoterin kontrolü altında (örneğin, baskı altında, belirlenen yaşam süresi boyunca, vb.) üretilir. Bu durumda, rekombinant proteinin varlığının tespit ve analizi genellikle yeterli değildir.

5.3.4. RNA temelli yöntemler

Bu yöntemlerde, RNA molekülü ve bir primer (RNA ya da DNA sentetik oligonükleotid) arasındaki özel bağlanma gerçekleştirilir. RNA molekülünün başlangıcının tamamlayıcısı olan primer, onunla eşleşir ve bu da DNA'ya benzer bir çift sarmallı heterodubleks ile sonuçlanır. Ters transkriptaz kullanılarak bir DNA molekülü yeniden sentezlenebilir, bu da daha sonra PCR ile çoğaltılabilir ve tespit edilebilir. Bu yöntemin bir dezavantajı, özel primerlerin, tespit edilecek RNA bileşimi hakkında bilgi sahibi olmadan tasarlanamayacağı gerçeğidir.

5.3.5. DNA tabanlı yöntemler - PCR uygulaması

DNA tabanlı yöntemler, esas olarak spesifik bir DNA parçasının PCR tekniği ile çoğaltılmasına dayanmaktadır. Jel elektroforezi, çoğaltılmış ürünlerinin görüntülenmesi için rutin olarak kullanılmaktadır. Bu tek başına da gerçekleştirilebilir ya da restriksiyon endonükleaz kesimi (RFLP-PCR) ile birleştirilebilir. Temel PCR protokolünün daha sofistike bir varyantı, çift sarmallı DNA boya interkalasyonu vasıtasıyla ve floresan ışığı yayarak Tm profilinin belirlenmesini içermektedir. Sıcaklığın artmasıyla, DNA'nın İki ipliği ayrılmaya başlar ve buna bağlı olarak da ölçülebilir ışık emisyonu azalır. Tm, DNA uzunluğundan çok bir DNA dizisine özgü bir özelliktir. Son olarak da, bunun alternatifi, probları kullanmak ve DNA ya da RNA ile hibridizasyon gerçekleştirmektir. Bir prob, uygun tasarlanmış ise, doğal ve herhangi bir yabancı dizisi arasında ayırım yapabilir. Probu, radyoaktif ya da radyoaktif olmayan bileşiklerle etiketlemek, mevcut molekülün tespitini kolaylaştırmaktadır. GDO analizi için, jel elektroforezi ve hibridizasyon teknikleri şu anda en sık kullanılan tekniklerdir.

Temel PCR protokolü kullanılarak GDO'ların varlığı için gıda örneklerinin taranması, aşağıdaki prosedürden oluşmaktadır:

- Numunelerden alınan DNA ekstraktı ve bilinmeyen GDO içeriğinin standartları;
- Birkaç PCR'nin spesifik primerler ile birleşmesi (viral 35S CaMV ya da Tnos destekleyicileri gibi genellikle düzenleyici dizileri ile bilinen);
- DNA parçalarının, bir agaroz jel elektroforezi üzerinde görüntülenmesi;

- Görüntü analizi yazılımı kullanılarak analiz ve yarı-nicel analiz.

Multipleks PCR bazlı yöntemlerle birkaç DNA dizisi taranabilir ve tek bir reaksiyonda tespit edilebilir. Ancak, multipleks testin geliştirilmesi, dikkatli test etme ve onaylama gerektirir. Çeşitli ampliconları ayırt etmek için, amplifikasyon parçaları havuzunun, analiz edilmesi gerekmektedir. Bu, jel elektroforeziyle ve parça boyutunun karşılaştırılmasıyla özel hibridizasyon problemlerinin yardımıyla ya da özel olarak etiketlenmiş primerler kullanılarak yapılabilir.

Bu tekniğin büyük bir avantajı, GDO'dan türetilmiş DNA'nın varlığına dair numuneyi test etmek için daha az reaksiyonun gerekli olmasıdır. Ayrıca, daha fazla miktar analizleri gerçekleştirmek gerekirse, prosedür nispeten pahalı olduğu için, hangi GDO'nun niceliğini belirleyeceğini bilerseniz iyi olur. Belirli bir GDO'nun tespiti, onaylanmış ve onaylanmamış GDO'lar hakkındaki bilgimiz bağlamında da önemlidir.

Diğer bir yaklaşım da **PCR tabanlı miktar belirleme yöntemlerini** uygulamaktır. PCR bazlı miktar belirleme, hem çoğaltma işlemi boyunca (gerçek zamanlı PCR) hem de işlem sonunda (son nokta PCR) gerçekleştirilebilir.

Son ürün analizleri, genellikle miktarı belirlenecek olan ve PCR'den önce amplifikasyon karışımına ilave edilen (bilinen az miktarda) ve miktarı belirlenecek hedef ile birlikte çoğaltılan bir rakip olmak üzere iki DNA hedefine ait amplifiye DNA birleşiminin karşılaştırılmasına dayanmaktadır: Bu sürece aynı zamanda rekabetçi nicel PCR denmektedir. Bu, hedef DNA ve rekabetçi DNA, aynı miktarda amplifikasyon ürünü verirse, DNA 'nın başlangıç miktarının da aynı olduğu varsayımına dayanmaktadır.

Gerçek zamanlı PCR analizinde, PCR sırasında sentezlenen bir ürünün miktarı, PCR'daki floresan ölçümü ile doğrudan tahmin edilir. Sentezlenen DNA miktarı ile ilgili floresan yayan, ticari olarak temin edilebilen melezleştirme problemleri bulunmaktadır. Sentezlenen ürünün miktarı, eklenen floresan boyanın yayılmasıyla da tahmin edilebilir ama burada özel olan ve özel olmayan ürünler arasında ayırım yapmak mümkün değildir. Bu yöntemin avantajı şudur: dinamiklerde, oluşturulan ürünün sadece miktarı takip edilmekle kalmaz, aynı zamanda, belirli bir miktar PCR ürünü oluşturmak için gerekli olan belirlenmiş döngü sayısı da tespit edilebilir. Gerçek zamanlı PCR daha karmaşık ve pahalı ekipman gerektirmektedir; rekabetçi PCR'dan daha hızlı ve daha spesifiktir.

5.3.6. Tespit etme süreci

Tespit etme işlemi, aşağıdaki bireysel aşamalardan oluşan bir prosedürü içermektedir:

1. *Örnekleme*. Numune alma stratejisi, GDO ya da türevlerinin miktarına dair güvenilir bir şekilde tahmin yürütmek için karmaşık istatistikleri içerir.
2. *Homojenizasyon*. Bu aşama, numunenin homojenizasyonunu içerir.
3. *İzolasyon/saflaştırma*. Bu adım, bir DNA, RNA ya da proteinin izolasyonu ve saflaştırılması ile ilgilidir. Bu adımdaki en kritik faktörler, test edilecek makromoleküllerin miktarı (konsantrasyonu), saflığı ve kalitesidir. Burada yine istatistikler bulunmaktadır.
4. *Mevcut olma/yokluk analizi*. Bu aşamada, GDO'nun veya türevinin varlığının ya da yokluğunun belirlenmesi için analizler gerçekleştirilir. Yukarıda da belirtildiği gibi, çeşitli alternatif yöntemler mevcuttur; bu yöntemlerin her birisi, farklı GDO türevleri arasında ayırım yapmak için farklı bir yetenek ve yanlış (+) ve (-) sonuçları ile ilgili farklı güvenilirlik sunmaktadır. Bir tespit yöntemi seçerken dikkate alınması gereken diğer önemli noktalar da şunlardır: Tespit edilecek olan molekülün tamamen bozulmuş olma olasılığı, yani artık tespit edilemez olması; gıda işleme sırasında tespit etme yönteminin saptamak için tasarlandığı molekülün, çıkarılmış olma olasılığı; bir GDO karışımı üzerinde gerçekleştirilecek olan analizin ve tanımlama işleminin daha karmaşık ve zaman alıcı olma olasılığı gibi konular dikkate alınmalıdır.
5. *Tanımlama*. Tespit edilen molekülün belirlenmesi amacıyla, yanlış (+) reaksiyonları çıkarmak ve bulunan molekülün kimliğini teyit etmek için genellikle herhangi bir (+) sonucun doğrulanması gerekmektedir.
6. *Miktar belirleme*. Modifiye edilmiş malzemenin nicel tahmini, bu aşamada gerçekleştirilir. Yine burada miktar belirleme, her zaman bazı standartları gerektirdiğinden istatistikler önemlidir.
7. *Analiz sonuçlarının yorumlanması*.

5.3.7. Tespit etme yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları

Tespit etme ve miktar belirlemenin sınırları, üç gruba ayrılabilir:

1. Mutlak limitler - % 95 doğru tespit olasılığı elde etmek için ilk döngünün başında var olması gereken en düşük kopya sayısı;
2. Bağıl sınırları - tespit edilebilir genetiği değiştirilmiş malzemelerin en düşük nispi oranı;
3. Pratik sınırlar - tanımlı bir numune için geçerli sınırlar

Şu andaki mevcut DNA tabanlı yöntemlerin özgüllüğü, dört gruba ayrılabilir:

1. Geniş kapsamlı bir GDO'yu, onları tanımlamadan tespit eden tarama yöntemleri;
2. Belirli bir genetik modifikasyon türü için tarama yöntemleri;

3. GDO'ların tespiti için bazen kullanılan kontrakt özel yöntemler;
4. GDO'ların tespiti için kullanılan değişime özel yöntemler (hala laboratuvar geliştirme aşamasında; ticari amaçlı kullanılmamış).

5.4. Gen transferi değerlendirilmesi

5.4.1. Prokaryotik mikroorganizmalar

Çeşitli mekanizmalar, prokaryotlar içinde DNA transferi için tipiktir ve kalıtsal özelliklerin transferiyle sonuçlanabilir.

DNA transferinin bu mekanizmaları, bakterilere olumsuz seçici baskıyı sürdürmek için etkin bir araç sağlayabilen yeni genetik bilgilerin benimsenmesi ile çevresel değişikliklere tepki olarak bir avantaj sağlamaktadır. Bu tür bir olay; antimikrobiyal maddelerin tarım, sağlık, veterinerlik ve tıp alanlarına girmesi nedeniyle, antimikrobiyal direnç genlerinin mikroorganizmaların bütününe yayılmasıdır. Prokaryotik sistemler içinde yaygın bir gen transferi mekanizması, donör hücrelerinde bir plazmidin ya da kromozomda konjugatif transpozonların varlığına dayanan konjugasyondur. Hücreler arası doğrudan iletişim, bu genetik unsurlara, plazmidin ya da transpozonun (lerin) kopyasını (larını) alıcı hücrelere aktarmalarını sağlar. Bakterilerde, birçok plazmid tanımlanmıştır ve bazıları, kendi transfer imkânlarından yoksundur. Bu durumda, bu, diğer plazmidler tarafından kolaylaştırılmaktadır. Bakteri hücreleri içinde mevcut olan plazmid sayısı, farklı olabilir ve bu özellik, farklı nişlerde yaşayan bakteriyel popülasyonlarda yaygındır. Hareketli olan bu genetik unsurlar - plazmidler ve transpozonlar- genellikle hücrelere yeni özellikler kazandırabilmektedir. Doğadaki benzersiz bir olay da (aynı zamanda deneysel koşullarda da) bakterilerden ökaryotik hücrelere (mayalar, ipliksi mantar, bitki ve hayvan hücreleri) konjugatif gen transferidir.

Bakterilerin, hücre dışı DNA'yı sitoplazmaları içine aktif alımlarını temel alan başka bir gen transfer süreci de doğal dönüşümdür. Bu durumun, büyük trofik ve taksonomik gruplarda meydana gelen sınırlı sayıdaki bakterilerin bir özelliği olduğu bulunmuştur. Bu sürecin (transferin), "kompetans" olarak adlandırılan nüfus artışının belirli bir büyüme fazında etkili bir şekilde gerçekleşebileceği tespit edilmiştir. Dönüşüm, kromozomal DNA parçaları ya da plazmidleriyle gerçekleştirilebilir. Bu süreç, yabancı DNA'ların bakteri hücrelerine girebileceği kompetans fazını karakterize eden belirli fiziksel ya da kimyasal koşullarda gerçekleşebilir. Bu tür bir dönüşüm, genellikle gen teknolojisinin gerçekleştirilmesinde kullanılmaktadır.

Gen transferinin üçüncü türü – transdüksiyon- da mikrobiyal nüfuslarda ve topluluklarda meydana gelmektedir. Buraya kadar, buna, son konakçı hücrenin DNA'sını, tesadüfi bir şekilde dolduran ve o hücreyi donör yapan ve sonrasında da alıcı bir hücreye aktaran bakteriyel virüsler aracılık etmiştir.

Yukarıda açıklanan üç mekanizmanın özgünlüğü, donör/alıcı hücrelerin genetik ilişkisine bağlıdır. Gen transferi, bu mekanizmalar kullanılarak bir türün üyeleri arasında olduğu gibi farklı cins ve türlerin üyeleri arasında da gerçekleşebilir. Bu mekanizmalar tarafından gerçekleştirilen "yatay gen transferi" geniş çaplı çalışılmakta ve bakteri türlerinin genomik yapısı için çok önemli olarak kabul edilmektedir. Bu olguya dair yapılan araştırmalar, ayrıca tüm genom sekans analizini de kapsamaktadır.

Doğal gen transferi alanındaki araştırmalar, çeşitli transfer olaylarının; toprak, rizosfer, yaprak yüzeyi, sediment, nehir epitoplari, gıda maddeleri, bağırsak yolu ve memeli ağız boşluğu dâhil olmak üzere bakterilerin doğal habitatlarında meydana gelebileceğini işaret etmiştir.

Yabancı DNA'nın, alıcı hücreye verimli transferinden sonra, bu DNA, genomik entegrasyon yoluyla (örn; homolog rekombinasyon) ya da plasmid oluşumu ile (replikasyon kaynağının varlığı durumunda) genoma yerleştirilebilir. Bu işlem, farklı sebeplerle (nükleotid dizi homolojisi eksikliği ya da restriksiyon endonükleazlarının varlığı gibi) askıya alınabilir. Yeni genetik bilginin, alıcıya bir avantaj sağlaması ve doğal ekosistemdeki değişiklikler boyunca canlı kalmasını sağlaması durumunda, selektif basıncın dayanılabilir olduğu nüfus düzeyinde muhafaza edilme eğilimi gösterdiği açıktır. Bu nedenle, gen transferi, prokaryotik mikroorganizmaların doğasının tipik bir olgusu olarak kabul edilebilir. Bu, birkaç gen takımı üretiminin yanı sıra, bir gen ya da gen kombinasyonunun dolaşımının, mikrobiyal nüfusların yaşayabilmesinde iyi fırsatlar sağladığı ortamın seçici basıncındaki değişikliklere doğal bir tepkidir.

Rekombinant yapıların büyük çapta yayılmasını sağlayabilecek olan bakteriyel topluluk içindeki gen transferinin doğal karakterini göz önünde bulundurarak genetik değişiklik uygulama süreci boyunca bir kromozomal entegrasyon yaklaşımı kullanmak daha iyidir. Belirli koşullar altında seçici avantajlar sağlayabilecek olan genlerin, hedef yapıyı taşıyan yapıların içine dâhil edilmesinden de kaçınılmalıdır (örn, antibiyotik direnci belirleyicileri). İstenen bir konstraktın hazırlanması sürecinde, diğer genomların içine rastgele entegrasyonu teşvik edebilen her gen dizisinin elenme süreci uygulanmalıdır.

5.4.2. Ökaryotik mikroorganizmalar

Ökaryotik hücreler, daha karmaşık yapılarıyla prokaryotik hücrelerden ayrılmaktadır: Onlar, iyi gelişmiş çekirdeğe sahiptir.

Bu mikroorganizmalarda (maya ve filamentli mantarlar) gen transferi işlemi, bakteriler için önceden tanımlanmış olanlardan da farklıdır.

Doğal hücre melezleme ve genetik rekombinasyon, esas olarak seksüel ya da paraseksüel hücre döngüsünü sahip türler içinde gerçekleşmektedir. Bu olaylar, çiftleşme, mayoz bölünme ve sporülasyon yoluyla eşeyli üreme ile ökaryotik hücrelerde sürmektedir. Eşeyli yaşam döngüsü ve anastomoz, nükleer füzyon ve haploidizasyona sahip mikroorganizmalarda gen transferi, kromozomların kademeli kaybı ile gerçekleşmektedir. Bazı cinslerde, türler arası melezleme, aynı zamanda yakından ilişkili türler arasında da oluşabilir.

Mayadan, memeli hücrelerine sentetik gen aktarımı, maya yapay kromozomları (YAC 'lar) kullanılarak yapılmıştır. Bunlar, gen tedavisinde vektörler olarak mükemmel potansiyellere sahiptir.

5.5. Mikroorganizmaların genetik stabilizasyonu

Mikroorganizmalar, yüksek ökaryotlarda sıkı düzenlenmiş kromozomlardan genetik olarak çok daha az stabildir. Hızlı büyüme oranına sahiptirler ve tek hücreli varlıklar olmalarıyla değişen ortama çabuk uyum sağlayabilmektedirler. Böylece, daha yüksek ökaryotlara kıyasla genetik olarak daha kolay değişebilmektedirler. Yukarıda da belirtildiği gibi, yatay gen transferi için olan birkaç mekanizma, daha önce tanımlanmıştır. Hareketli DNA partikülleri; genellikle yeni fenotipik özelliklerin, genlerin inaktivasyonunun, gen kayıplarının ve genomunun dengesizliğinin ortaya çıkmasına yol açan bakteriyel genetik materyalin değişikliklerinden sorumludur. Bu hareketli DNA parçacıkları; ekleme dizisini (IS), plazmidleri, profajları, transpozonları içermektedir. Birçok bakteri suşu, çok sayıda farklı IS unsurlarına sahiptir ve bunların bir bölümü, genellikle aktif bir şekilde transpozisyona neden olmaktadır.

Ökaryotik mikroorganizmaların genomu da DNA değişikliklerine tabi tutulmaktadır. Bunlar da fiziksel, kimyasal koşullara ve yetiştirme sistemine bağlı olarak büyüme süreci boyunca bir dizi düzenlenmelerden geçmektedir. Bazı durumlarda, sürekli kültürler, kabul edilen yeni DNA dizilerinin stabilizasyonu için etkili seçici araçlardır. Genellikle bu değişiklikler, hareketli unsurların (örn; Ty retrotranspozonları) ve kromozom segmentlerinin kendiliğinden oluşan

transpozisyonları ile ortaya çıkmaktadır. Son olay, kromozomal uzunluk polimorfizminde açıkça ortaya konmuştur.

Mikroorganizmaların genetik değişkenlik olgusu, GDM'larda rekombinant DNA'nın dengesini etkileyebilir. Bu olasılık, GDM'ların genetik dengesinin değerlendirilmesi durumunda dikkate alınmalıdır.

Klonlanmış genin (lerin) lokalizasyonu (kromozomal ya da plazmit), rekombinant DNA molekülünün genetik dengesini ciddi derecede etkilemektedir. Bu, rekombinant DNA'nın akıbeti için uygun vektör sistemi seçimini çok önemli kılmaktadır. Yüksek kopya sayılı bir vektör ya da kromozom rekombinant DNA'ya entegre olan bir vektör kullanıldığında, yeni genetik bilginin stabilitesi, temel biyolojik mekanizmalara bağlı olacaktır. Transfer edilen genetik materyalin genetik dengesi, konak mikroorganizmasının gibi olacaktır. Transfer edilen genetik malzemenin yüksek dengesi; ılıman fazların bağlanma yerinin yanı sıra, transposonların konumuna ve IS unsurunun eklenmesine dair derin bilgi gerektirmektedir.

5.6. Mikrobiyal patojenite

Genellikle, fermente gıdaların (örn; laktik, propiyonik, asetik asit bakterileri, mayalar (*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*), *Penicillium*, *Aspergillus* gibi bazı ipliksi mantarlar) üretimi için biyoteknolojide kullanılan mikroorganizmalar, insan kullanımı için güvenli kabul edilmektedir. İnsanlarla uzun bir ortak yaşam hikâyeleri bulunmaktadır ve genellikle güvenli ve nonpatojen olarak kabul edilmektedir. Şiddetli kor hastalığı olan hastalarda bazı enterik laktik asit bakterilerin neden olduğu çok nadir bakteriyemi ve endokardit durumlarıyla ilgili bazı veriler vardır. Bu vakalar, bu mikroorganizmaların hiçbir şekilde gıda kaynaklı patojenler olduğunu göstermez.

Gıda kaynaklı patojenlerin, gıdada ya da insan mide-bağırsak kanalında istilacı ve/veya toksik etkisi bulunmaktadır. Diğer bir grup mikroorganizma olan fırsatçı patojenler, genel olarak sağlıklı bir kişi için tehlikeli değildir, ancak sağlık riski taşıyan kişilerin durumunda, bazı riskler teşkil etmektedir. Son zamanlarda, moleküler teknikler kullanılarak birçok gıda kaynaklı ve fırsatçı patojenlerin genomları, tamamen sekanslanmıştır ve patojenik etkiden sorumlu olan genler belirlenmiştir. Bu başarılar, gıda endüstrisinde kullanılan farklı mikroorganizmaların genomlarında, benzer genetik bilginin tanımlanması için bir fırsat sunmaktadır. Gıda fermantasyonun da kullanılan mikroorganizmaların sekanslanmış birkaç genomuna ait verilerinin değerlendirilmesi, bilinen patojenite özelliklerine sahip olmayan iki örneği (*Saccharomyces cerevisiae*, *Lactococcus lactis*) göstermektedir.

Sonuç olarak, uzun vadeli güvenli kullanım ve yakın zamanda elde edilen genetik kanıtlar, gıda endüstrisinde kullanılan mikroorganizmaların çoğunluğunun genetik geçmişinin, patojenite adalarına ve patojenite için diğer belirleyicilere sahip olmadığını göstermektedir.

Patojenite için bu ana hususların yanı sıra, dikkate alınması gereken bazı ek etkiler de bulunmaktadır.

Metabolik tutarsızlık, "sessiz" genlerin ifadesi, mikrop ve bağırsak bağışıklık sistemi arasındaki cross-talk iletişiminin değişimi gibi genetik manipülasyon sonuçlarından kaynaklanan genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların bazı istenmeyen etkileri, ana hatlarıyla belirtilebilir. Bu etkiler, Laktik asit bakterileri, mayalar (asetaldehid, formik asit, biyojenik aminler) ve mantarlar *Penicillium camamberti (roqueforti) (siklopiazonik asit veya roquefortin)*, toksinleri kodlayan bazı genlerin ifadelerinde; istenmeyen immün tepkilerinin ortaya çıkmasında; GI yolunun diğer hücrelerinde (örn. enterositler) istenmeyen reaksiyonlarda temelde toksik etkisi olmayan ortak metabolitlerin miktarını, kabul edilemez bir miktara çıkarmakla ilgilidir.

6. KAYNAKLAR

A decade of EU-funded GMO research (2001-2010) (PDF). Directorate-General for Research and Innovation. Biotechnologies, Agriculture, Food. European Union. 2010.

FAO (2008) GM Food safety Assessment: tools for trainers.

WHO (2001) *Safety assessment of foods derived from genetically modified microorganisms*. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology

OECD - 1993a. Safety Considerations for Biotechnology: Scale-up of Crop Plants. Paris, OECD Report. 40 pp.

OECD - 1993b. Traditional crop breeding practices: an historical review to serve as a baseline for assessing the role of modern biotechnology. Paris, OECD. 235 pp.

ILSI, Safety assessment of viable genetically modified micro-organisms used in food, 1999

EFSA Scientific Colloquium on QPS (2004) available at: <http://www.efsa.europa.eu/de/supporting/pub/109e>

EFSA (2015) Guidance for renewal applications of genetically modified food and feed authorised under Regulation (EC) No 1829/2003.

EFSA (2011) Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use.

Tepfer, M., Andow, D. A. and Ammann, K. (2002) Environmental biosafety research. *Environ. Biosafety Res.* 1:3-4

Bawa A.S., Anilakumar K.R. (2013). Genetically modified foods: safety, risks and public concerns-a review. *J Food Sci Technol.*, 50(6):1035-46

Parekh S.R. (2004) *The GMO Handbook: Genetically modified animals, microbes and plants in biotechnology*, Human Press Inc.

Devos Y., Aguilera J., Diveki Z., Gomes A., Liu Y., Paoletti C., du Jardin P., Herman L., Perry J.N., Waigmann E. (2014) EFSA's scientific activities and achievements on the risk assessment of genetically modified organisms (GMOs) during its first decade of existence: looking back and ahead. *Transgenic Res.*, 23(1):1-25

Aymerich T., Martin B., Garriga M and Hugas M. Microbial Quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic Staphylococci from artisanal low-acid sausages. 2003, *Appl. Environ. Microbiol.* 69, (8), 4583 – 4594.

Alberts B et al. (2013) Standing Up for GMOs. *Science* 341(6152):1320.

Gaskell G, Allansdottir A, Allum N, Castro P, Esmer Y, Fischler C, Jackson J, Kronberger N, Hampel J, Mejlgard N, Quintanilha A, Rammer A, Revuelta G, Stares S, Torgersen H, Wager W; Allansdottir; Allum; Castro; Esmer; Fischler; Jackson; Kronberger; Hampel; Mejlgard; Quintanilha; Rammer; Revuelta; Stares; Torgersen; Wager (February 2011). "The 2010 Eurobarometer on the life sciences". *Nat. Biotechnol.* 29 (2): 113–4.

Web sources:

<http://www.genetic-id.com>

<http://www.genescan.com>

<http://www.identigen.com>

<http://www.identitypreserved.com>

<http://www.gmocert.com>

<http://www.investigen.com>

<http://www.alteca.com/index.htm>

<http://www.biprofilelabs.com>

<http://www.agbiotechnet.com/topics/GMsafety.asp>

<http://www.safetyalerts.com>

ÖÇ 4: TEHLİKELİ KİRLETİCİ MADDELERİN BİYOREMEDİASYONU

1. İnsan ve hayvan sağlığı için GDM'ların ve türevi ürünlerin risk değerlendirmesi

1.1. GDM'lar için büyük ölçüde eşdeğerlik kavramı

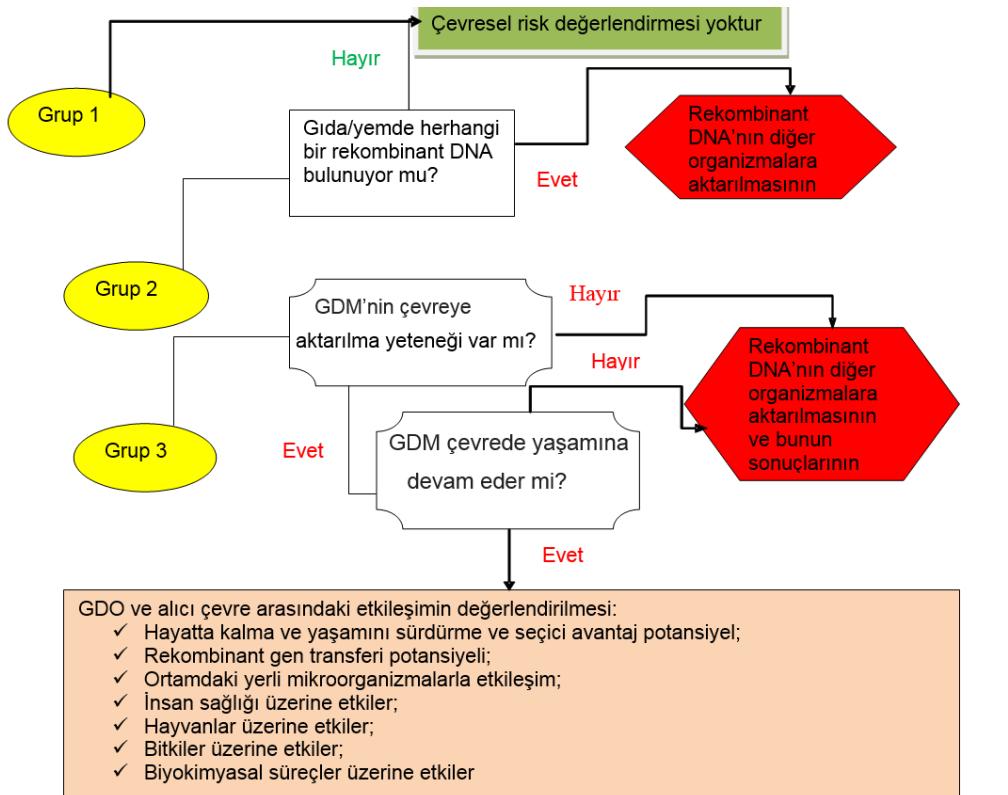
İnsan ve hayvan tüketimi için elde edilen ve uygulanan GDM ve ürünler, bir grup tek bileşikten canlı GDM'ların saf kültürlerine kadar değişiklik göstermektedir. Amino asitler ve vitaminler gibi saflaştırılmış ürünler, ilk grup için tipik birer örnektir, ama probiyotik kültür ya da süt ürünleri starterlar, ikinci grubu temsil etmektedir. Canlı GDM'lar bulunmayan ürünlerin yanı sıra canlı GDM'ların yaşamaya devam ettiği süt ürünleri gibi genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların her iki ikisine de ara bir yer verilir. Sonuncusu, mikrobiyal hücrelerinin parçalanması ile üretilen ham enzim preparatları gibi transgenik olayın izlerini içerebilir. Bu hususlar ışığında, üç grup GDM ya da türetilmiş gıdalar ve yemler ayırt edilebilir (bkz. Tablo 1).

Tablo 1:

<i>Grup</i>	<i>Tanım</i>
Grup 1	GDM'lardan elde edilen tanımlanmış tek bileşikler ya da bileşiklerin karışımı (örn; amino asitler, vitaminler, saf enzimler).
Grup 2	Canlı GDM'lar bulunmayan ve klonlanmış (yabancı) herhangi bir açık okuma çerçevesinin birim uzunluğunu içermeyen kompleks ürünler (örn; parçalanmış hücre ekstraktları, bazı yem enzimleri, şarap, bazı binalar, vs.).
Grup 3	Canlı GDM'ları ya da genetiği bozulmamış klonlanmış (yabancı) DNA'ları içeren kültürler ve ürünler (örn; canlı ya da ısı ile öldürülmüş starter kültürler ve probiyotik kültürler, bazı binalar, peynirler ve yoğurtlar, vs.)

Gıdalar ve yemler, yukarıda bahsedilmiş olan gruplardan elde edilen ürünleri içerdiği zaman, farklı değerlendirme prosedürleri uygulanabilir (Şekil. 2). En yoğun inceleme, canlı GDM içeren ürünler için öngörülmektedir. Tek bileşik üzerinde bir risk değerlendirmesi yapmak için, üretim sistemi ile ilgili sınırlı bir bilgi gerekmektedir. GDM'ların bir üründen elde edilememesi ancak ürünün saflaştırılmasının sınırlı olması durumunda, risk değerlendirmesi için gereken bilgiler, tek ürünler için gerekenden daha geniş kapsamlıdır. GDM'nun, ürün içinde inaktive edilmiş olduğu süreci ve transgenik olayın izlerinin üründe tespit edilebilme derecesini anlamak gereklidir. Canlı GDM'lar, bir üründe yaşamaya devam ediyorsa, gerekli bilgiler, bilimsel bir risk değerlendirmesi sağlamak amacıyla kapsamlı olacaktır.

Risk değerlendirmesinin incelenme düzeyi, modifikasyonu kendisinin yanı sıra alıcı ve verici suşların kullanım geçmişi ile ilgilidir (klonlanacak dizilere bağlı olarak). Gıda ve yem zincirlerindeki mikroorganizmaların güvenliğinin nitelikli karinesi (**qualified presumption of safety (QPS)**) yerleştirildiğinde, GDM'ların risk değerlendirme prosedürleri daha az incelenecektir. Böyle bir durumda, risk değerlendirmesi zaten parental/alıcı/verici suşlara ya da aynı nihai kullanım için QPS durumunda olan taksonomik gruba verilmiş olan QPS yeterliliğinde listelenmemiş olan ilgili bilgileri hedef almalıdır.



Şekil 2: GDM'ların ve ürünlerinin çevre risk değerlendirmesine yönelik yaklaşım

1.2. Karşılaştırmalı yaklaşımın uygulanması

GDM değerlendirme stratejisi, sadece amaçlanan değişikliklerin değerlendirilmesine değil, aynı zamanda, genetik manipülasyon işleminin beklenmedik sonuçlarına da dayanmaktadır. GDM'yu veya GD yiyeceği ya da yemi, geleneksel karşıtı (eşdeğeri) ile karşılaştırır. Bu karşılaştırmalı yaklaşım, güvenli kullanım geçmişi olan geleneksel bir karşıtın, belirli bir GDM'nun çevre, gıda ve yem riski değerlendirmesi için bir referans noktası olarak alınabileceği anlayışına dayanmaktadır. Bunu karakterize etmek için, OECD (OECD, 1993a ve OECD, 1993b), ILSI (ILSI, 1999) ve WHO/FAO (WHO/FAO 2008) tarafından daha detaylı geliştirilen "aşinalık" ve "büyük ölçüde eşdeğerlik" kavramlarını geliştirmiştir. Risk değerlendirme, geleneksel karşıtı ile ilgili yeni ya da değiştirilmiş tehlikeleri tanımlamayı hedeflemektedir. Bu karşılaştırmalı araştırmalar, risk değerlendirmesinin ilk adımı olarak kullanılabilir. Daha sonra, ikinci aşamada, hem amaçlanan hem de istenmeyen farklılıklar tespit edilmeli ve bunların çevre ve gıda /yem güvenliği ve beslenme etkileri değerlendirilmelidir. "Aşinalık", "bilgi tabanı", "güvenli kullanım geçmişi" ve "büyük ölçüde eşdeğerlik" kavramları hakkında aşağıda bilgi verilmiştir.

Ne "Bilgi kütlesi" kavramı, ne de "güvenli kullanım geçmişi" zarara yol açılmayacağını garanti edemez. Parental mikroorganizmaya, tanınmış bir QPS statüsü verilmesi halinde, güvenli kullanım geçmişiyle ilgili mevcut tüm bilgiler, zaten değerlendirilmiş olacaktır.

Mikrobiyal genomun doğal çeşitliliği, gıdalarda belirgin hale gelir ve bu, çok karmaşık mikrobiyal birlikler olarak işlenmeleri sırasında yaygın bir olay olabilir. Ayrıca, gıdaların kimyasal ve fiziksel faktörleri/özellikleri, gen ifadesini etkiler ve değişimlere sebep olur. Gıdalarla yapılan laboratuvar deneylerinde ya da sindirim sırasında mide-bağırsak sisteminde çeşitli veriler elde edilebildiği için, güvenlik değerlendirmesi sırasında bu özellik göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle, **büyük ölçüde eşdeğerlik** kavramı, GDM'ların kendisine ve GDM kullanılarak elde gıdalara uygulanmalıdır. Burada, çok küçük farklılıklar, mikroorganizmaların patojenik ve patojenik olmayan suşlarını ayırt edebileceği için, **büyük ölçüde eşdeğerlik** kavramının uygulamasının çok hassas yapılması gerektiğini belirtmek gerekmektedir.

Büyük ölçüde eşdeğerlik kavramının temel özellikleri, GDM'ların bileşimine ve fenotipine özgü bir analiz yapılmasının ve geleneksel parental suş analizi ile karşılaştırılmasının dâhil edilmesidir. Bu bağlamda, FAO ve WHO 2000 yılındaki raporlarında, yeni moleküler yöntemlerdeki ilerlemelerle temas halinde kalmanın gerekli olduğunu belirtmiştir. Bu yöntemlerin uygulamaları, ayrıntılı analitik bilgi elde etmek için güçlü bir araç sağlamakta ve

konvansiyonel ve genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar arasında başarılı bir karşılaştırmayı kolaylaştırabilmektedir. Bu bakımdan, DNA mikrodizilerini ve proteomik teknikleri kullanmak, özellikle uygundur. Mikroorganizmaların, bir dizi analitik teknikle metabolik profillemeleri, metabolik düzenlemenin, beklenen sonuç olduğu GDM değerlendirmelerinde özel bir değere sahip, gelişmiş bir yaklaşımdır.

Tablo 2

<i>The concept</i>	<i>Description</i>
“familiarity” and “body of knowledge”	Majority of GMM strains used for food / feed purposes belong to well characterized microbial species. Such “familiarity” permits the risk assessor to draw on previous knowledge and experience with the introduction of similar microorganisms into food and environment, as well as to the results from risk / safety analysis, performed before scale up of technologies (OECD, 1993a). This term is replaced by the new one – “body of knowledge”.
“substantial equivalence”	This concept is based on the underlying principle that an existing microorganism with a “history of safe use” as food or feed can serve as comparator when assessing the safety of GM food and feed (OECD, 1993b). Detailed description is given in ILSI (ILSI, 1999) and EFSA Scientific Colloquium on QPS (EFSA, 2004).

Bu tür bir tekniğin uygulanması, normal varyasyonlarda bir arka plan değerlendirmesi ve tespit farklılıkların değerlendirilmesi gerekliliği ile sınırlıdır. Rutin güvenlik değerlendirmelerinde, bu teknikleri dikkate almadan önce önemli adımlar gerçekleştirilmelidir:

- Kendi tekrarlanabilirliklerinin ve sağlamlıklarının garantisi için metodolojinin doğrulanması
- Performanslarını değerlendirmek için anlaşmaya varılması (örn; "normal değişim" olarak kabul edilebilen bir dizilimdeki/profildeki çeşitli farklılıkların tanımı)
- "Normal değişim" olarak kabul edilmeyen profildeki her bir farkın değerlendirilmesi.

1.3. Amaçlanan ve istenmeyen etkiler

Amaçlanan etkiler: Bu etkilerin, genlerin ya da DNA dizisinin girişinin ya da inaktivasyonunun sonucu olarak meydana gelmeleri beklenir ve genetik modifikasyonun hedefi ile yakın ilişkilidir. GDM bileşiminde amaçlanan bu modifikasyonlar, ebeveyn ile kıyaslandığında farklıdır ve tek bir bileşik (yeni elde edilen protein) olarak ölçülebilir ya da hücrenel metabolik akıda değişebilir.

İstenmeyen etkiler: Gerçekleştirilen gen manipülasyonunda beklenmeyen, GDM ve izogenik muadili arasındaki fenotipik farklılıklarda ortaya çıkan değişikliklerdir. Bu istenmeyen etkiler, aşağıdaki nedenlerden dolayı olabilir:

- Metabolik yolların entegrasyonu;
- Genetik düzenlenme;
- Metabolik düzensizlikler ve pleiotrofik etki;
- Yeni füzyon proteininin sentezi.

1.4 GDM'lara maruz kalma

Gıda üretiminde GDM uygulanmasının istenmeyen etkilerini önlemek için, ilk etapta, bir pazarlama öncesi güvenlik değerlendirmesi yapılmalıdır. Besin zinciri üzerindeki herhangi bir etkisi izlenmelidir. Güvenlik değerlendirmesi sırasında, şu önemli faktörler dikkate alınmalıdır: GDM tüketimi olasılığı; GDM/ürün/gen tipi; nüfus düzeyinde potansiyel tehlike değerlendirmesinin gerçekleştirilmesi.

Nüfusun GDM'lara maruz kalması durumunda potansiyel tehlikelerin ölçülmesi için olan yöntemler, belirlenmelidir. Bu bağlamda, önceki istişarelerden çıkan sonuçlara dikkat etmek önemlidir:

"Belirli bir kültür bitkisinin besin seviyelerinde gerçekleşen bir değişiklik, genel beslenmeyi etkileyebilir. Bu gibi durumlarda, besin içeriğindeki ve biyo-kullanılabilirlikteki ve zaman, işleme ve depolama dengelerindeki değişiklikleri belirlemek ve ayrıca genetiği değiştirilmiş gıda uygulanmasının bir sonucu olarak beslenme modellerindeki değişiklikleri izlemek ve tüketicilerin beslenme ve sağlık durumları üzerine potansiyel etkilerini değerlendirmek önemlidir. Ancak, tüketicilerin beslenme durumlarının etkilerinin değerlendirilmesi, tüm önemli beslenme değişiklikleri için önemlidir ve genetiği değiştirilmiş gıdaların uygulanmasına özgü değildir" (FAO / WHO, 2008).

FAO/WHO (2008) tarafından belirtildiği gibi, GDM'lar yardımıyla elde edilen gıdalar dâhil olmak üzere herhangi bir gıdanın, uzun vadeli potansiyel sağlık etkisini tahmin etmek çok

zordur. Bu, insan popülasyonundaki büyük genetik çeşitlilik ve izlenen etkilerin karmaşıklığı nedeniyledir. Belirli soruları cevaplandırmak için belirli araştırmalar planlanmadığı sürece, konvansiyonel gıdaların arka planına karşı herhangi bir etkiyi tespit etmenin çok zor olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, GDM'ya maruz kalmanın izlenebilirliği için özel yöntemlerin geliştirilmesi çok dikkat gerektirmektedir.

1.5 Bağırsak mikroflorası üzerine etkiler

Bir insanın ömrü boyunca gastrointestinal sisteminde, büyük miktarlarda canlı mikroorganizmalar (10^{14} 'e kadar) yaşamaktadır. Mikrofloranın oluşması, neredeyse 400 türü kapsamaktadır. Bunun büyük bir kısmı, yeterli tekniklerin olmayışı nedeniyle analiz edilemediği için iyi bilinmemektedir. Mevcut klasik ve moleküler yaklaşımların, tüm bu mikroorganizma çeşitliliğini açıklamak için yeterince etkili olmadığı düşünülmektedir. Mikrobiyal nüfusun tipi; ağız boşluğu oluşumuna ve miktarına (baskın mikrobik türleri; laktik asit bakterileri, streptokoklar ve bazı anaerobik türler olan) mideye (geçici asite karşı dayanıklı mikroplar), ince bağırsağa (mikroflora gib kolon tarafından doldurulan), mikrobiyal varlıkların, 10^{12} gram/kuru ağırlığa kadar ulaşabildiği kolona göre sonradan değişmektedir.

Kolonu kolonize eden nüfusa, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Bacteroides* ve *Clostridium* gibi anaeroblar hâkimdir. Laktobasil, enterokok ve koliform gibi mikroaerofilik ve fakültatif anaerobların büyüklükleri genellikle -3 ve 4 arasındadır. Gastrointestinal sistemde yaşayan bu endojen mikroflora, GI'yi işgal etme eğiliminde olan eksojen mikroflorasına karşı temel bir engel teşkil etmekte ve sözde kolonizasyon direncini sağlamaktadır.

Mide-bağırsak (GI) mikroflorasının, nicel ve nitel açıdan bileşimi, aşağıda bahsedilen bir dizi faktöre bağlıdır:

- çevresel faktörler - beslenme türü, uygulanan antimikrobiyal tedavi, dezenfektanlar, gıda katkı maddeleri, meslek, iklim
- Konak ilişkili faktörler - yaş, cinsiyet, bağırsak hareketliliği, transit zamanı, pH, safra asitleri savunması vb.
- GI mikroflorada türlerin karşılıklı ilişkisi - besin alım oranı, oksijen, H^+ , H_2S , antimikrobik maddelerin üretimi, organik asitler, NH_3

Tüm bu faktörler, GI mikroflorasının genel durumu hakkında ortak bir tutuma sahiptir.

GI mikroflora ve farklı memeli konaklar - ilişkili yapılar ve fonksiyonlar arasında bazı etkileşimler vardır. Bu etkileşimler, organlar, hücre ve moleküler gibi farklı düzeylerde bulunabilir ve hücresel düzeyde prokaryotik-ökaryotik çapraz bağlantıları; organik asitler,

nükleotitler vb. üretimi; enterohepatik dolaşım ile etkileşim; gutla ilişkili bağışıklık sisteminin (GAIS) gelişimi; intestinal motilite ve enterocystic mitoz üzerine etkisi olarak özetlenebilir. Bunlar, bireyin yaşı ve sağlık durumuna bağlıdır. Bu nedenle, eksojen mikrofloranın hayatta kalması (GDM'lar dâhil), yerli GI mikrofloranın ve yukarıda belirtilen konak-ilişkili faktörlerin etkisini bastırma kabiliyetlerine tabidir. Ayrıca, kolonizasyon direnci, hayatta kalmanın değerlendirilmesinde yer almaktadır, ama bu mekanizmalar, iyi anlaşılammıştır. Bazen mikroplar, bağırsak lümeninden çıkıp başka bir yerde görünebilir. Bu davranışı tanımlayan terim, translokasyondur. Yapay ortamda, mikropların bağırsakta hayatta kalmasını belirlemek zor bir iştir. Bu nedenle, insan GI sistemini uyaran uygun hayvan modellerinin seçimi ve hastalarla deneyler gerekmektedir. Bu araştırmalar, güvenilir suş belirleme metodolojisi ile desteklenmelidir.

GI sistemi içine girmiş GDM'ların, sindirimde hayatta kalması durumunda, bu organizmalar geçici olarak ortaya çıkabilir ya da farklı bir zaman için kendini bağırsağa yerleştirebilir. Bu durum, ilgili bir zaman dilimi için tespit edilen mikroorganizmaların sabit bir seviyesi ile ölçülmüş olan kolonizasyon terimi ile tanımlanmaktadır.

Yetişkinlerin gastrointestinal sisteminin, eksojen mikroorganizmalarla uzun ömürlü (daimi) kolonizasyonu çok nadirdir. Ancak eğer olursa, bazı probiyotik suşların uygulanması, normal mikrofloranın, oral uygulamadan haftalar sonra fasiyesden ve kolon mukozasından alınabileceğini işaret etmektedir. İki bağırsak geçiş süresinden daha uzun bir süre, mikroorganizmaların GI sistemde hayatta kalmalarını tanımlamak için, "devamlılık" terimi kullanılmıştır.

Gastrointestinal sisteme yerleşmesinden bağımsız olarak (tespit edilmiş olan ya da olmayan) GDOM girişi olması durumunda, memeli konakçının, mikroflora ile etkileşime girme olasılığı bulunmaktadır. Bağırsak florası üzerine beklenen etkisi, kısmen GDM tarafından ifade edilen fonksiyonlara (fenotipik ifadesi) ve dolayısıyla yatay gen transferine bağlı olabilir.

GDO'nun, memeli konak üzerindeki etkisi, doğrudan ve dolaylı olarak tanımlanabilir. Doğrudan etkisi, yukarıda belirtilmiş olan tüm yapılar ve fonksiyonlar üzerindeki toplam etkisi ile karakterize olmaktadır ve dolaylı etkiye ise, endojen mikroflora ile ve özellikle de aktif unsurlarla etkileşime girerek aracılık edilebilir. Her iki tür etkileşim (doğrudan/dolaylı) de, canlı olmayan mikroorganizmalar, fonksiyonel özelliklerini (yani bağışıklık modülasyonu, kimyasal bağlayıcı, hücre yapışması) korudukları için, bu mikroorganizmalar tarafından provoke edilebilmektedir. Toksinler ve enzimler gibi biyolojik olarak etkin bileşiklerin bazı salgıları öngörülebilir.

Gen transferi olasılığı, daha önce tartışılmıştır. Bu yüzden, GDM'nun, bağırsak mikroflorası ve gastrointestinal sistemde yaşaması ile ilişkisine dayanan bağırsaktaki mikroorganizmalar arasındaki konjuge transferini düşünmek mantıklıdır. Bu etki, kalıcı ya da kolonize eden suşlar ile beklenebilir. Geçici suşların, bu bağlamda düşük etkisi bulunmaktadır. Şu anda, bağırsak sisteminde ölçülebilir bir DNA sürekliliğinin var olduğuna dair hiçbir şüphe yoktur. Bitki ve rekombinant DNA'nın; kan sistemine, doku hücrelerine ve hatta memeli konakçının çekirdeğine bile girebildiği tespit edilmiştir.

1.6 Bağışıklık sistemi üzerine etki

Bağışıklık modüle potansiyelinin değerlendirmesine ilişkin FAO/WHO danışma sonucu, vaka bazlı hususların gerekli olmasıdır. Örneğin, bu kuruluşlar, alerjik özelliklerle ilgili, çeşitli önerilerde bulunmuştur.

Bağırsak mikroflorası ve bağışıklık sisteminin durumu arasındaki etkileşimi gösteren bulgular vardır. GD bitkilerin aksine, GDM'ların da GI sisteme yerleşmiş olduğuna, böylece de potansiyel bağışıklığı modüle edici etkilere neden olduğuna dikkat edilmelidir.

2. Geleceğe dair öngörüler

GDO ve türevlerinin tespiti için günümüzde mevcut olan yöntemler, bir gıda maddesindeki iki farklı malzemeyi ayırt edemez. Bu yöntemler, sadece tür düzeyinde GDO içeriğini tespit etmek ve ölçmek için kullanılabilir.

Şu anda Avrupa'da GDO'ları için onay isteyen şirketlerin, kendi GDO'larını açıklayan sekans bilgilerini gizli tutmalarına izin verilmektedir. Bu şekilde, bilim adamlarının, tespit etme yöntemleri tasarlamak için gereken temel bilgileri eksiktir.

Tespit edilecek ilgili moleküllerin izolasyonu ve bunların nicel ve nitel analizleri için daha iyi yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır ve son zamanda da gelişme aşamasındadır. Gelişmelerin çoğu, aşağıdakiler aracılığıyla artmış özgüllük sağlayabilen DNA yöntemleri üzerinde durmaktadır:

- Ekleme ve entegrasyon kısmı arasındaki kavşağı hedefleyen PCR yöntemleri;
- Suçlular için kullanılanlara benzer GDO'ya özgü parmak izi yöntemleri;
- Kalıtsal hastalık yatkınlığını belirleyenlere benzer teşhis edici mikro-diziler.

Son olarak endüstri kontrol yetkilileri ve uluslararası standartları kullanan akredite laboratuvarlar tarafından yapılan GDO analizlerini satın alan diğerleri için yeterlilik testleri organize edilmelidir.

3. Kapanış sözleri

Güvenlik değerlendirme süreci aşağıdakileri esas almalıdır:

- İyi tanımlanmış bir dizi sorunun uygulanması yoluyla vaka bazlı temel
- Pratik araçlar sağlayan, büyük ölçüde eşdeğerlik kavramının uygulanması yoluyla klasik olarak elde edilmiş ve GDM gıdaları arasındaki benzerlik ve farkların belirlenmesi için karşılaştırmalı yaklaşım
- Gıda matrisi üzerinde GDM'ların etkilerinin değerlendirilmesi yoluyla mikroorganizmaların içsel özelliklerine ilişkin özel hususların tanıtımı
- Memeli GI sisteminde patojenite ve süreklilik gibi ek parametrelerin incelenmesi yoluyla üretilen gıdalara ve GDM'lara **büyük ölçüde eşdeğerlik** kavramının uygulanması
- GDM'nun özel kullanımlarının ve GDM'ya maruz kalmaların dikkate alınması- GDM'lar, canlı ya da cansız formdaki gıdaların ayrılmaz bir parçası olabilir.
- GDM değerlendirmesi, güvenlik ve beslenme açılarından yapılmalıdır - Gıda üretiminde kullanılan mikroorganizmalar, ürünün besin kalitesi ve güvenliği için temel öneme sahiptir.
- GDM'ların veya parçaların memeli konukçunun bağışıklık sistemi üzerindeki etkisinin değerlendirilmesinde ek dikkate ihtiyaç duyulmaktadır-GI sistemindeki mikroorganizmalar, bağışıklık sistemini etkilemektedir ve gıda üretiminde GDO(M) uygulanması, manipülasyon için kullanılan sistemle ilgili özel güvenlik değerlendirmesi ihtiyaç duymaktadır.
- GDM'dan gut mikroflorasına olası gen transferinin dikkatli değerlendirilmesi – gıdalardan gelen genetik materyalin, yapay ortamda bağırsak mikroflorasına ve memeli hücrelerine transfer potansiyeline sahiptir.
- Konak mikroorganizmanın gıdada güvenli kullanım geçmişine olan şiddetli gereklilik-kullanılan konak mikroorganizmalar, gıdada kullanılmaya üzere güvenli bir statüye sahip olmalıdır; güvenli kullanım açısından seçici bir işaret, çok dikkatli seçilmelidir ve son GDM'da antimikrobiyal direnç belirtici genlerden kaçınılmalıdır ve bu genler dâhil edilmemelidir.

Şekil 3'te, risk değerlendirme sürecinin önerilen gelecekteki gelişimine dair genel bir bakış açısı gösterilmiştir.



Şekil 3: Risk değerlendirme sürecinin önerilen gelecekteki gelişimine dair genel taslak

4. KAYNAKLAR

A decade of EU-funded GMO research (2001-2010) (PDF). Directorate-General for Research and Innovation. Biotechnologies, Agriculture, Food. European Union. 2010.

FAO (2008) GM Food safety Assessment: tools for trainers.

WHO (2001) *Safety assessment of foods derived from genetically modified microorganisms*. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology

OECD - 1993a. Safety Considerations for Biotechnology: Scale-up of Crop Plants. Paris, OECD Report. 40 pp.

OECD - 1993b. Traditional crop breeding practices: an historical review to serve as a baseline for assessing the role of modern biotechnology. Paris, OECD. 235 pp.

ILSI, Safety assessment of viable genetically modified micro-organisms used in food, 1999

EFSA Scientific Colloquium on QPS (2004) available at:

<http://www.efsa.europa.eu/de/supporting/pub/109e>

- EFSA (2015) Guidance for renewal applications of genetically modified food and feed authorised under Regulation (EC) No 1829/2003.
- EFSA (2011) Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use.
- Tepfer, M., Andow, D. A. and Ammann, K. (2002) Environmental biosafety research. *Environ. Biosafety Res.* **1**:3-4
- Bawa A.S., Anilakumar K.R. (2013). Genetically modified foods: safety, risks and public concerns-a review. *J Food Sci Technol.*, 50(6):1035-46
- Parekh S.R. (2004) The GMO Handbook: Genetically modified animals, microbes and plants in biotechnology, Human Press Inc.
- Devos Y., Aguilera J., Diveki Z., Gomes A., Liu Y., Paoletti C., du Jardin P., Herman L., Perry J.N., Waigmann E. (2014) EFSA's scientific activities and achievements on the risk assessment of genetically modified organisms (GMOs) during its first decade of existence: looking back and ahead. *Transgenic Res.*, 23(1):1-25
- Aymerich T., Martin B., Garriga M and Hugas M. Microbial Quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic Staphylococci from artisanal low-acid sausages. 2003, *Appl. Environm. Microbiol.* 69, (8), 4583 – 4594.
- Alberts B et al. (2013) Standing Up for GMOs. *Science* 341(6152):1320.
- Gaskell G, Allansdottir A, Allum N, Castro P, Esmer Y, Fischler C, Jackson J, Kronberger N, Hampel J, Mejlgaard N, Quintanilha A, Rammer A, Revuelta G, Stares S, Torgersen H, Wager W; Allansdottir; Allum; Castro; Esmer; Fischler; Jackson; Kronberger; Hampel; Mejlgaard; Quintanilha; Rammer; Revuelta; Stares; Torgersen; Wager (February 2011). "The 2010 Eurobarometer on the life sciences". *Nat. Biotechnol.* 29 (2): 113–4.

Web sources:

<http://www.genetic-id.com>

<http://www.genescan.com>

<http://www.identigen.com>

<http://www.identitypreserved.com>

<http://www.gmocert.com>

<http://www.investigen.com>

<http://www.alteca.com/index.htm>

<http://www.biprofilelabs.com>



Funded by the
Erasmus+ Programme
of the European Union

<http://www.agbiotechnet.com/topics/GMsafety.asp>

<http://www.safetyalerts.com>