

<b>Bakanlık Adı</b>	:	Tarım ve Köyişleri Bakanlığı
<b>Tebliğ Adı</b>	:	Yem Analiz Metodları
<b>Tebliğ No</b>	:	Tebliğ No: 2004/33
<b>R. Gazete Tarihi</b>	:	2/9/2004
<b>R. Gazete Sayısı</b>	:	25571

## Tarım ve Köyişleri Bakanlığından :

### **Yem Analiz Metodları (Tebliğ No: 2004/ 33 )**

**Madde 1-** 1734 Sayılı Yem Kanunu ve buna bağlı Yem Yönetmeliđinin 32 inci maddesi uyarınca yemlerin resmi kontrollerinde, bu tebliğ ekinde verilen referanslara göre hazırlanan; Yemlerde hayvansal orijinli yapıların belirlenmesi için mikroskobik analiz, Kanatlı hayvan yemlerinde enerji tayini, Yem ve yem katkı maddelerinde A ve E vitaminlerinin HPLC ile analizi, Yakma metodu ile ham protein tayini ve Bitkisel ve hayvansal ham yağ tayinlerinde uygulanacak metodlar aşağıda belirtilmiştir.

**Madde 2-**Yem Kanunu ve Yem Yönetmeliđinin uygulanmasında görevlendirilen bütün laboratuvarlarda bu metodlar resmi analiz metodları olarak uygulanır.

**Madde 3-** Bu Tebliğ yayımı tarihinde yürürlüğe girer.

**Madde 4-** Bu Tebliğ hükümlerini Tarım ve Köyişleri Bakanı yürütür.

#### **YEMLERDE HAYVANSAL ORİJİNLİ YAPILARIN BELİRLENMESİ İÇİN MİKROSKOBİK ANALİZ METODU**

##### **1- Amaç ve uygulama alanı**

Yemlerde bulunan hayvansal orijinli yapıların (memeli hayvanların, kanatlı hayvanların ve balıkların işlenmesi ile elde edilen ürünler ve bu hayvanların vücut parçaları) mikroskobik analizle belirlenmesi amacıyla hazırlanmıştır.

##### **2- Hassasiyet**

Hayvansal orijinli yapının özelliğine bağlı olarak yemlerdeki çok küçük miktarların (< 0,1 %) ölçülmesi mümkündür.

##### **3- Prensipler**

Resmi kontroller için belirlenmiş yöntemle usulüne uygun bir örnek numune alınır ve analizi yapılmak üzere hazırlanır. Mikroskobik analizle saptanabilecek hayvansal orijinli yapılar ( örneğin: kas lifleri ve diğer et partikülleri, kıkırdak, kemik, boynuz, saç, kıl, kan, tüyler, yumurta kabuğu, balık kemikleri, deri pulları) belirlenir. Bu hayvansal orijinli yapıların belirlenmesi madde 6.1'de anlatılan eleklerle ayırma ve madde 6.2'de anlatılan örnekten çöktürme ile yapılır.

##### **4- Reaktifler**

###### **4.1 Parlaticı maddeler**

4.1.1 Chloral hydrate (sıvı, 60 % w/v)

4.1.2 Lye (Alkali sıvı) (NaOH 2,5% w / v veya KOH 2,5% w / v), elek fraksiyonları için

4.1.3 Parafin yağı veya gliserol (viskozite:68-81) çökteltilerin mikroskopla izlenmesi için

###### **4.2 Yıkama maddeleri**

4.2.1 Alkol, %96

4.2.2 Aseton

- 4.3 Konsantr (yoğunlaştırma) maddesi
- 4.3.1 Tetrachloroethylene (yoğunluk, 1,62)
- 4.4 Boyama kimyasalları
- 4.4.1 İyot / potasyum iyodad solusyonu ( 100 ml suya 2 gr. potasyum iyodad katılarak çözündürülür ve düzenli olarak çalkalanırken 1 gr. iyot ilave edilir)
- 4.4.2 Alizarin Kırmızısı (2.5 ml, 1M hidroklorik asit 100 ml suda seyreltilir ve bu çözeltiliye 200 mg alizarine kırmızısı ilave edilir.
- 4.4.3 Cystine kimyasalı (2 gr. Kurşun asetat, 10 gr. NaOH / 100 ml H<sub>2</sub>O)
- 4.4.4 İyot / potasyum iyodad solusyonu ( %70'lik etanolde çözünmüş)
- 4.5 Bleaching kimyasalı
- 4.5.1 Ticari sodyum hipoklorid çözeltisi (%9.6 aktif klor)

#### 5- Ekipman, araç ve gereçler

- 5.1 Hassas terazi (0,001 gr . tartabilecek doğrulukta)
- 5.2 Öğütme aracı ( değirmen vb )
- 5.3 Maksimum 0,50 mm genişliğinde gözenekleri olan elek
- 5.4 Ayırma hunisi veya konik tabanlı beaker
- 5.5 Stereomikroskop ( en az 40 kat büyütebilecek kapasitede)
- 5.6 Compound (yüksek çözünürlü) Mikroskop (400 kat büyütebilen) ışığı ve polarize ışığı yansıtabilen
- 5.7 Standard laboratuvar gözlüğü

Kullanım öncesi bütün araç ve gereçler iyice temizlenmiş olmalıdır.

#### 6- İşlem

En az 50 gr örnek alınarak dikkatlice öğütülür. Uygun bir şekilde öğütülmüş numuneden elek fraksiyonlarını incelemek için en az 5 gr. ve yoğunlaştırılmış çökeltiyi incelemek için de en az 5 gr.'lık temsili porsiyon alınır. Mikroskopik analiz için boya maddeleriyle boyanma işlemi de yapılabilir.

##### 6.1 Elek fraksiyonlarında hayvansal orijinli yapıların belirlenmesi

En az 5 gr.'lık örnek elekten geçirilerek iki fraksiyona ayrılır.

İri parçalı fraksiyonlar uygun bir şekilde ince tabakaya yerleştirilerek, stereomikroskop altında hayvansal orijinli yapıları belirlemek için değişik büyüklüklerde tarama yapılır.

Elekten geçen ince fraksiyonlar slaydlara yerleştirilerek yüksek çözünürlüklü mikroskop altında hayvansal orijinli yapıları belirlemek için değişik büyüklüklerde tarama yapılır.

##### 6.2 Yoğunlaştırılmış çökeltide hayvansal orijinli yapıların belirlenmesi

En az 5 gr. örnek tartılarak seperasyon (ayırma) hunisine veya konik tabanlı beaker'a aktarılır ve en az 50 ml tetrakloretilen ile muamele edilir. Karışım iyice çalkalanır ya da karıştırılır.

- Eğer kapalı ayırma hunisi kullanılırsa, çökelti ayrılmadan önce çökeltinin tutması için en az üç dakika bekletilir. Çalkalama işlemi tekrar edilir ve çökeltinin tutması için yine en az üç dakika bekletilir. Daha sonra ayırma hunisi boşaltılarak çökelti ayrılır.

- Eğer açık ayırma hunisi ya da konik beaker kullanılıyor ise çökelti ayrılmadan çökeltinin tutması için en az 5'dakika beklenir.

Çökelti bir fırın kabında kurutulur ve tartılır. Tartma işlemi eğer yemdeki hayvansal orijinli maddenin tahmini miktarı belirlenecekse yapılır, aksi halde buna gerek yoktur. Eğer çökelti fazla miktarda iri parçalardan oluşursa elekten geçirilerek iki fraksiyona ayrılır. Kurutulan çökelti kemik yapıların belirlenmesi için stereomikroskop ve yüksek çözünürlük mikroskobu altında incelenir.

### 6.3 Parlatıcı maddeler ile boyayıcı kimyasalların kullanımı

Mikroskopik analizde özel parlatma maddeleri ve boyayıcı kimyasallar kullanılarak hayvansal orijinli yapıların daha iyi belirlenmesi sağlanabilir.

Chloral hydrate : Dikkatlice ısıtıldığında nişasta tanecikleri jelatinize olacağından ve istenmeyen hücre yapıları uzaklaştırılacağından hücre yapıları daha net bir şekilde görülecektir.

Lye : NaOH veya KOH, yem materyallerini temizleyerek kas liflerinin, kıl ve diğer keratin yapıların belirlenmesine yardımcı olur.

Parafin yağı ve gliserol : Kemik yapılar bu parlatıcı madde içinde daha kolaylıkla ayırd edilebilir, çünkü kemiklerdeki ince boşluklar hava ile dolu kalacağından bu boşluklar 5-15 mikrometrelik siyah delikler şeklinde görünürler.

Iyot / Potasyum iyodad solusyonu (4.4.1): Nişasta (mavi-mor renk oluşturur) ve proteinin (sarı portakal rengi oluşturur) belirlenmesinde kullanılır. Gerekirse seyreltme yapılabilir.

Alizarin Kırmızısı Solusyonu: Kemikleri, balık kemiği ve pullarını kırmızı/pembe renge boyar.

Cystin kimyasalı: Dikkatlice ısıtıldığında cystin içeren yapılar (saç, tüy, vs.) siyah-kahverengi bir renge döner.

### 6.4 İçeriğinde balık unu bulunabilecek yemlerin incelenmesi

İnce elek fraksiyonu ve ince çökelti fraksiyonundan en az bir slayd hazırlanarak yüksek çözünürlüklü mikroskop altında incelenir.

Eğer yemin etiketinde balık unu içerdiği yazılı ise veya balık unu bulunması ihtimali varsa orijinal örnekten ilave olarak elekten geçirilen iki ince fraksiyon ve toplam çökelti fraksiyonu incelenir.

### 7- Hesaplama ve değerlendirme

Yemlerde bulunan hayvansal dokuların mikroskopta incelenerek belirlenmesi yukarıda açıklanmıştır. Eğer yemlerdeki hayvansal orijinli yapıların miktarlarının tahmin edilmesi gerekiyorsa aşağıda belirtilen hususlara göre işlem yapılır.

Hesaplama ancak hayvansal orijinli yapılarda kemik parçacıkları bulunması halinde yapılabilir.

Sıcak kanlı kara hayvanlarının (ör: memeli hayvanlar ve kanatlılar) kemik parçacıkları, mikroskopik slaytlarda kemik içi ince boşluklar sayesinde değişik türlerde balık kemiklerinden ayırd edilebilir. Yem örneğinde hayvansal orijinli yapıların oranı iki şekilde tahmin edilebilir.

- Çökeltide (tortuda) bulunan kemik parçacıklarının tahmini oranı (% ağırlık ) ile ve,
- Hayvansal orijinli yapılarda kemik parçacıklarının oranı (% ağırlık ) ile

Miktar tayini en azından üç slayda bakarak ve her bir slayd için beş ayrı alan taranarak yapılmalıdır. Karma yemlerden elde edilen çökeltide sadece kara hayvanları ve balıkların kemik parçacıkları bulunmaz aynı zamanda yüksek yoğunlukta ör: mineraller, kum, ligninleşmiş bitki parçacıkları ve benzeri diğer bazı parçacıklar da bulunur.

#### 7.1 Kemik parçacıkları oranının tahmini miktarı

$$\% \text{ kara hayvanlarının kemik parçacıkları} = (S \times c) / W$$

$$\% \text{ balık kemikleri ve pulları} = (S \times d) / W$$

( S= çökelti ağırlığı (mg), c= düzeltme faktörü (%) çökeltide bulunan kara hayvan kemiklerinin tahmini oranını, d= düzeltme faktörü (%) çökeltide bulunan balık kemikleri ve pullarının tahmini oranı, W = çöktürmeden önce alınan örnek ağırlığı (mg))

#### 7.2 Hayvansal orijinli yapıların tahmini miktarı

Hayvansal ürünlerde kemik oranı çok değişkendir. (Kemik unlarında kemik oranı %50-60 arasında; et unlarında %20-30 arasında; balık unlarında, kemik ve pul içeriği, balık unu kategorisi ve orijinine göre %10-20 arasında değişkenlik göstermektedir.

Eğer yem örneğinde bulunan hayvansal unun tipi bilinirse, bunun miktarını da tahmin etmek mümkündür.

Yem örneğindeki kara hayvan ürünlerinin tahmini miktarının hesaplanması

$$(\%) = [ (S \times c) / (W \times f) ] \times 100$$

Yem örneğindeki balık ürünlerinin tahmini miktarının hesaplanması

$$(\%) = [ (S \times d) / (W \times f) ] \times 100$$

S= çökelti ağırlığı (mg); c= düzeltme faktörü (%), çökeltide bulunan kara hayvan kemiklerinin tahmini oranı; d= düzeltme faktörü (%), çökeltide bulunan balık kemikleri ve pullarının tahmini oranı; f= düzeltme faktörü, örnekteki hayvansal orijinli yapılar içinde yer alan kemiklerin oranı (Et-kemik unu için tahmini oran %40, balık unu için %15'dir, eğer gerçek oranlar bilinirse gerçek kemik oranları dikkate alınır.); W = Çöktürmeden önce alınan örnek ağırlığı (mg)

### 8- İnceleme sonuçlarının açıklanması

Mikroskopla yapılan yem analizi aşağıdaki şekillerde rapor edilebilir.

#### 8.1 Kara hayvanlarından elde edilen yapıların bulunmasıyla ilgili olarak:

- Mikroskopla açıkça görülebildiği kadarıyla, yem örneğinde kara hayvanlarına ait bir yapı bulunamamıştır.
- Mikroskopla açıkça görülebildiği kadarıyla, yem örneğinde kara hayvanlarına ait yapılar bulunmuştur.

#### 8.2 Balık unu bulunmasıyla ilgili olarak:

- Mikroskopla açıkça görülebildiği kadarıyla, yem örneğinde balıktan elde edilen bir yapı bulunamamıştır.
- Mikroskopla açıkça görülebildiği kadarıyla, yem örneğinde balıktan elde edilen yapılar bulunmuştur.

Eğer incelenen yemde hayvansal orijinli yapılara rastlanırsa hazırlanan raporda tahmini miktarlarda belirtilebilir (% x , < % 0.1, % 0.1-0.5, %0.5-5 veya > %5 gibi).

Daha ayrıntılı rapor için, belirlenebildiği takdirde kara hayvanlarına ait yapıların orijini ve hayvansal yapıların neler olduğu ( kas lifleri, kıkırdak, kemikler, boynuz, saç, kıl, tüyler, kan, yumurta kabukları, balık kemikleri ve pulları gibi) rapora eklenir.

## KANATLI HAYVAN YEMLERİNDE ENERJİ TAYINI

Kanatlı karma yemlerinin enerji değerleri, yemlerin belirli besin maddeleri oranları dikkate alınarak aşağıda verilen formülasyona göre hesaplanır. Hesaplanan metabolik enerji değeri kcal / kg karmayem olarak elde edilir.

Kcal/kg, ME = [ (0,1551 × % ham protein + 0,3431 × % ham yağ + 0,1669 × % Nişasta + 0,1301 × % toplam şeker (sukroz)) / 4.184 ] x 1000

## YEM VE YEM KATKI MADDELERİNDE A VİTAMİNLERİNİN HPLC İLE ANALİZİ

### VİTAMİN A BELİRLENMESİ

Bu metot yem ve yem katkı maddelerinde, premikslerde Vit A (retinol) belirlenmesinde uygulanabilir. Bu metotla tespit edilen Vitamin A tüm trans-retinil alkol ve cis izomerlerini kapsamaktadır. Vit A içeriği IU/kg cinsinden ifade edilmektedir ve bir IU 0,300 mikrogram all-trans-vitamin A aktivitesine veya 0,344 mikrogram all-trans vitamin A asetat veya 0,550 mikrogram all-trans-vitamin A palmitat aktivitesine denktir. Belirleme limiti 2000 IU Vit A/kg olarak tespit edilmiştir.

### 1. İLKE

Numune etanolik potasyum hidroksit çözeltisi ile hidrolize edilir ve Vit A petrol eterine ekstrakte edilir. Solvent evaporasyonla uzaklaştırılır, kalıntı metanol içerisinde çözündürülür ve gerekli görüldüğünde uygun konsantrasyona seyreltilir. UV veya flüoresans detektör kullanılarak ters faz yüksek performans sıvı kromatografisi ile Vitamin A içeriği tespit edilir. Kromatografik şartlar all-trans vitamin a alkollerini ve cis izomerleri arasında bir ayrılma gerçekleşmeyecek biçimde ayarlanır.

### 2. ARAÇ VE GEREÇLER

- 2.1. vakum rotary evaporatör
- 2.2. amber cam malzeme
- 2.3. 500 mL'lik amber renkli, şilifli ve kapaklı balonjojeler
- 2.4. 10, 25, 100, 500 mL'lik balonjojeler
- 2.5. konik, 1000 mL'lik ayırma hunileri
- 2.6. armudi balonlar 250 mL
- 2.7. Geri soğutucular
- 2.8. Otomatik pipet
- 2.9. Süzme düzeneği