

Fermente Türk Sucuklarında Et Orijininin İndirekt Kompetatif ELISA ile Belirlenmesi^{1,2}

Ufuk KAMBER¹, Ergün ÖZALP²

¹ Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Kars-TÜRK YE

² Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara-TÜRK YE

Özet: Et ürünlerine hile amacıyla yabancı hayvan etlerinin katılması eskiden olduğu gibi günümüzde de önemli bir sorundur. Bu çalışmada hayvansal ürünlerimiz içerisinde en çok üretim payına sahip Türk fermente sucuklarında olası at ve domuz eti karışımları yapılabilecek miktarların belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada teknik olarak, et orijinlerinin yada et ürünlerine katılan yabancı hayvan etlerinin tespitinde son yıllarda pek çok ülkede duyarlı, hızlı, ucuz ve pratik metotlardan biri olan Enzim Linked Immuno Assay (ELISA) test kullanılmıştır. ELISA testi için gerekli olan türe özgü monospesifik antiserumlar affinite kromatografi yöntemiyle saflaştırılmıştır. Deneysel yürütülen bu çalışmada, sırasıyla % 1, 3, 5, 10 ve 15 oranlarında at ve domuz eti karışımları yapılmıştır. Fermente Türk Sucuklarında, indirekt kompetatif ELISA ile at ve domuz etinin 10 mg gr⁻¹lık karışımlar tespit edilmiştir. Saf at ve domuz albüminleri ile yapılan deneylerde ise duyarlılık 2 µg ml⁻¹ olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: At eti, domuz eti, ELISA, et orijin, identifikasyon, sırasıyla eti

Determination of Meat Origins in Turkish Fermented Sausage Using Indirect Competitive ELISA

Summary: Mixing meat products with other animal meats as fraud is an important problem today as it was in the past. The purpose of this study was to determine the origin of meats mixed with pork or horse meats as fraud and their possible mixing rate in Turkish fermented sausages. In this study as technique, in recent years, the origin of meat and meat products mixed with other animal meats has been determined, in many countries, using Enzyme Linked Immune Assay (ELISA) which was a sensitive, quick, cheap and practical method. Mono-specific antibodies for each species required for the ELISA test, were purified using affinity chromatography method. In this experimental study, Turkish fermented sausage was prepared with beef containing 1%, 3%, 5%, 10% and 15% pork or horse meat and 10 mg g⁻¹ mixture of pork or horse meats were detected in the sausage using competitive indirect ELISA (CI-ELISA). Furthermore the sensitivity of the test for pure pig or horse albumin's was found to be 2 µg ml⁻¹.

Key Words: Beef, ELISA, horse meat, identification, meat origin, pork

Giri

Et ve ürünlerinin, kalitesiz ucuz etler kullanılarak hileli üretimleri eskiden olduğu gibi günümüzde de çoğu ülkede gıda kontrol hizmetlerinde problem olan ve halk sağlığını tehdit eden önemli sorunlardan birisidir (10). Bu sorun sosyal etik (bireysel, yöresel, dini, etnik) ve yasal açıdan da oldukça önemlidir. Etlerin orijinlerini yada et ürünlerine katılan yabancı hayvan etlerinin tespiti, immünolojik (2, 4, 5) elektroforetik (15,18,19), kromatografik (27) ve RIA (12) gibi pek çok metot kullanılmaktadır. Son yıllarda etlerin identifikasyonunda daha duyarlı, hızlı, ucuz ve pratik olan Enzim Linked Immuno Assay (ELISA) tekniği (3, 7, 8, 11, 12, 13, 23, 24, 26, 28, 29) yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Etlerin identifikasyonunun da ELISA, ilk defa 1982 yılında ilk kez Whittaker and ark. (28, 29) Kangethe ve ark. (17) tarafından kullanılmıştır.

Kangethe ve ark. (17) etlerin ayırt edilmesinde indirekt ELISA'yı kullanarak sırasıyla, at, koyun ve domuz etlerinin identifikasyonunu yapmışlar ve % 3'lük karışımları ayırt ettiklerini bildirmişlerdir. Aynı yıl Whittaker ve ark.(28), ELISA ile çeşitli etlerin ayrımında sırasıyla, koyun, kanguru, at, deve, domuz etleri üzerine çalışmışlar ve % 10'nun altındaki karışımların tespit edilebileceğini bildirmişlerdir. Bir yıl sonra Patterson ve Spencer (25), yaptıkları çalışmaları kapsamında at eti içerisindeinek, koyun eti içerisindekeçi etini % 0,1 oranında, dana eti içerisinde bufalo etini % 1 oranında ayırt ettiklerini bildirmişlerdir.

Et türlerinin orijinlerinin belirlenmesinde ELISA'nın farklı teknikleri üzerinde yapılan çalışmalarda (3,7, 14, 20, 21, 26) double sandwich ELISA tekniğini kullanan Jones ve Patterson (14) dana eti içerisinde % 1-3 oranındaki domuz etini, Patterson ve ark. (26) ise inlenmemiş etlerde at, kanguru, domuz, deve, bufalo, koyun vb. türlerin ayrımında, % 1'den daha az karışımları tesbit ettiklerini bildirmişlerdir. Ayob ve ark. (3) indirekt kompetatif ELISA ve direkt nonkompetatif ELISA'nın, Dinçer ve ark. (7) ise kompetatif ve indirekt ELISA'yı karıştırmalarını ve et ürünlerinde kütleme ve pişirmenin ELISA'ya etkisini incelemiştir.

Geliş Tarihi/Submission Date : 15.06.2009

Kabul Tarihi/Accepted Date : 02.10.2009

¹ Doktora tezinden yayına hazırlanmış olan bu çalışmada A.Ü. Araştırma Fonu tarafından (Proje No: 90.30.00.23) desteklenmiştir.

² 19-21 Ekim 1994 Ankara III. Ulusal Nükleer Tarım ve Hayvancılık Kongresinde sözlü sunulmuştur.

Gereç ve Yöntem

Materyal olarak, içerisinde % 1, 3, 5, 10 ve 15 oranlarında at ve domuz eti karı tırarak yapımı oldu umuz deneysel Türk fermente sucuklar (6) kullanıldı. Sucuklarda kullanılan domuz eti; Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalına muayene için getirilen yabancı domuz etlerinden, at eti; patoloji kürsümüzün otopsi salonundan, sı ır eti; Altında Belediyesi Et Satı Merkezinden temin edildi. Her bir karı ım için 0,5'er kg sucuk hamuru hazırlanmı ve sucuk yapımı iki kez tekrar edildi.

Antiserumların elde edilmesi: ELISA'da kullanılan antiserumlar tarafımızca deney hayvanlarından elde edildi. Türe özgü domuz, at ve sı ır antiserumların üretimi, Ayob ve ark. (3), Herbert (9), Minden ve Fair'in (22) önerilerine göre yapıldı. Antiserum elde etmek için iki erli üç grup ekinde olu turulan tav anların (Beyaz Yeni Zelanda, 14 haftalık) birinci grubundakilere 5'er mg domuz (Sigma A2764), ikinci grubundakilere 5'er mg at (Sigma A9888), üçüncü grubundakilere 5'er mg sı ır antijeni (Sigma A8022), 0,5 ml emülsifiye [0,5 M NaCl ve Freund's complete adjuvant (Sigma F5881) (1/1, v/v)] içerisinde intramuskular olarak enjekte edildi. mmunizasyona 4. 8. ve 12. haftalarda aynı i lemler tekrarlanarak devam edildi. Son enjeksiyondan sonra yeterli düzeyde antikor olu -ması beklendikten sonra tav anların kanları intrakardial olarak alınıp, serumları ayrı tırıldı. Ayrılan serumlar 2500 x g. devirde +4° C de 30 dakika santrifüj edildi ve serumun üst kısmı tüplere alınarak -20° C de depolandı.

Antiserumların safıa tırılması: Elde edilen antiserumlar CNBr aktiveli sepharoz 4B'nin kullanıldı ı affinite kromatografiyle (1,16) safıa tırıldı. Bunun için firmanın CNBr-aktiveli sefaroz 4B prospektüsünde belirtti i ekilde hazırlanan domuz, at ve sı ır antijenleriyle birle tırilmi CNBr- sefaroz 4B (Pharmacia) jel süspansiyonları ayrı ayrı kolonlara (Pharmacia 19-5002-01 Column C 10/20) doldurulup +4° C de bir gece bekletildi. Önce domuz antiserumunu safıa tırılmak için at ve sı ır albüminleri içeren kolonlar birbirine tubinglerle seri paralel olarak ba landı. Domuz antiserumundan 4 ml ilk kolonun üstünde bulunan reservuara konarak peristaltik pompa 15 ml/saat hızla çalı tırılıp, 48 saat sirkülasyona tabi tutuldu. Domuz antiserumu daha sonra, kendi antijenini içeren kolona aktarıldı ve 24 saat da burada sirkülasyonu yapıldı. Sonra Glisin-HCl (pH:2,5) solüsyonu kolona ilave edilerek birle mi olan antijen-antikor kompleksinden domuz antikorları ayrı tırılarak serumlar kolektör aracılı ıyla (UV-1 Monitör 280nm Pharmacia) tüplere toplandı. Bu domuz antikorlarını içeren ekstrakt

diyaliz torbasına konup +4° C de bir gece diyalize bırakıldı. Sonra ekstrakt +4° C de 3000 x g. devirde 5 dakika santrifüj edildi. Üste kalan tortusuz berrak kısım ELISA'da kullanılmak üzere -20° C de depolandı. Depolanmadan önce antiserumun titresini indirek ELISA ile saptandı. At ve sı ır antiserumlarının da safıa tırılması aynı ekilde yapıldı. Çalı mada türler arasında kross reaksiyonlarının olup olmadığını tespit etmek için sı ır, at ve domuz antijenleri heterolog antiserumlarla kar ıla tırılarak ELISA'da OD de erleri ölçüldü.

Numune ekstraktlarının hazırlanması: ELISA testi için sucuk numunesi ekstraktları Patterson ve ark. (26), bildirdi i ekilde hazırlandı. ki ayrı parti halinde yapılmı deneysel sucuklardan her bir yapım için 3 ayrı sucuk örne i analize alındı. Her örnekten 20 gr alınarak 80 ml PBS (pH:7,2, 0,01 M Na₂HPO₄, 0,01 M NaH₂PO₄, 0,15 M NaCl) içerisinde homojenize edildikten sonra 3000 x g. 30 dakika santrifüj edildi. Daha sonra ekstraktın üst kısmı Whatman No: 3 filtre ka ıdından süzülerek ya larından ve kaba partiküllerinden uzakla tırıldı. Bu numune ekstraktları ELISA'da kullanılmak üzere -20° C de depolandı. Bu ekstraktlar, standart antijenlerle test edilerek reaksiyon veren minimum dilasyonları hesaplandı 1:10-1:40 arasındaki dilasyonların uygun aralıklar oldu u saptandı.

İndirekt kompetatif ELISA testinin yapılı ı: Ayob ve ark. (3), önerdi i indirekt kompetatif ELISA tekni i kullanıldı. Kaplayıcı tamponda [pH: 9,6, (0,05 M NaHCO₃, 0,05 M Na₂CO₃)] hazırlanmı at ve domuz antijenlerinden mikrotitrasyon plakalarının (U form polystyrene, Dynatec Typ 24 A) oyuklarına 375 µl kondu ve oda ısısında 3 saat inkübasyona bırakıldı. nkübasyondan sonra plaka bo altılarak kaplayıcı tampon ile üç kez yıkayıp kurutuldu. Daha sonra 10 mg ml⁻¹ ya sız sütozu içeren solüsyondan 375 µl bütün oyuklara konarak 30 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı. nkübasyondan sonra mikroplakalar bo altıp kurularak teste hazır hale getirildi. PBST [pH: 7,2 (0,01 M Na₂HPO₄, 0,01 M NaH₂PO₄, 0,15 M NaCl)] ile ikili dilasyonları hazırlanmı test örneklerinden (1:20 ve 1:40'lık dilasyonları) ve aranan hayvan etine özgü monospesifik serumdan (sı ır antiserumu için 1:100, at antiserumu için 1:500, domuz antiserumu için 1:200) her oyu a 50' er µl kondu. Plakanın ilk 8 oyu una (çift paralel olarak) ise numunelerin yerine aranan hayvan türüne ait standart antijenin onlu dilasyonları (0, 0,01µg, 0,1µg, 1µg, 10µg, 100µg, 1mg,10mg) ve üzerine kendisine özgü antiserumdan 50' er µl kondu. Oda ısısında 10 dakika inkübasyona bırakıldı. nkübasyondan sonra PBST ile yıkandı ve kurutuldu. 1:1000 titreli konjugattan (Sigma-8275) plaka-

nın oyuklarına 100'er µl konarak 10 dakika inkube edildi ve sonunda plaka bo altılıp yine PBST ile yıkanıp kurutuldu. Substrat solüsyonundan (Sigma P 1526) plakanın oyuklarına 100'er µl kondu ve 10 dakika oda ısısında inkube edildi. Yüzde 12,5'lük H₂SO₄ solüsyonundan 50'er µl oyuklara konarak reaksiyon durduruldu. ELISA okuyucusu ile (Titertek Multiscan Plus) 492 nanometrede plaka-oda renginin OD ölçüldü.

Verilerin de erlendirilmesi: Testlerle birlikte, numunelerdeki karı ımların varlı ını ve miktarlarının saptanmasında yararlanılacak standart e rinin olu turmak için standart olarak kullanılan at ve domuz albüminlerinden elde edilen OD de erleri (Tablo 1), Kangethe ve ark. (17), önerdi i ekilde $Y = a + bx_{\log}/b$ formülüyle do ru grafikleri hazırlandı. Buradaki 'x' de erleri $x_{\log} = a-y/b$ formülü ile hesaplandı. Plaktaki minimum (+) standart OD de erlerin ortalaması alınıp 2 ile çarpılarak "pozitiflik sınır de eri" bulunup, bu de eri geçen serumlar (+) kabul edildi. Elde edilen veriler Hewlett Packard software programı ile de erlendirilerek t testi ile analiz edildi.

Bulgular

Fermente Türk Sucukları içerisinde % 1, 3, 5, 10 ve 15 oranlarında at ve domuz eti karı tırarak yapılan sucukların ELISA testi sonucunda numune dilüsyonlarında okunan OD de erlerinin standartların maksimum duyarlılık sınırlarına göre okunabilirlikleri ekil 1'de gösterilmiştir. Numunelerde hesaplanan karı ım miktarları ile olması gereken miktarlar (% 1, 3, 5, 10, 15) arasında student t testi yapılmı "t" testi sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tartı ma ve Sonuç

Bu çalı mada ELISA'nın seçilmesinin nedeni, safla tırılmı antiserum kullanılması nedeniyle kross reaksiyonların çok az olması, az miktarda antiseruma gereksinim duyulması ve böylelikle de oldukça fazla numune i lenebilmesi ve dolayısıyla güncel sorunlardan biri olan maliyetin dü ük olmasındandır (8, 14, 21, 25, 26, 28, 29). Örnek hazırlama i inin daha basit olması, sonucun gözle ya da basit araçlarla (spektrofotometre) okunabilmesi, di er yöntemlerdeki gibi uzman veya fazla sayıda personele gereksinim duymaması (24,29), test sonuçlarının testi yapan ki iye göre de i memesi (28), sistemin otomatik hale getirilebilmesi, ELISA'nın laboratuvarlarda kolayca yapılabilmesi (3, 7, 21, 24, 29) di er avantajlarındadır. ndirekt kompetatif ELISA tekni in seçilmesinin nedeni ise, bu teknikte

mikroplakaların önceden antijenlerle kaplanması olayı, di er ELISA tekniklerindeki mikroplakaların numunelerle kaplanmasıyla geçen 3-4 saatlik gibi uzun bir süreyi ortadan kaldırıp test zamanını 30 dakikaya kadar kısaltarak zaman tasarfuna neden olması, yine di er metotlarda mikroplakaların numunelerle kaplanmasından dolayı çalı ma hatalarının çoklu unun bunda antijenle kaplanmasından dolayı az olması, +4° C'de en az 6 ay saklanabilmesi (3, 13) özelliklerinin bulunmasıdır. Yine Dinçer ve ark. (7), double sandwich ve kompetatif ELISA teknikleri ile i lenmi ve çi sı ır etlerinde domuz ve koyun eti ayırımının % 1'e kadar mümkün oldu unu, fakat her iki metotla pi irilmi dana eti içerisinde koyun etinin ayırımının ise mümkün olmadığını, ısı i lemi görmü dana eti içerisinde domuz etinin te hisinin ise ancak kompetatif ELISA ile % 25 oranında mümkün oldu unu belirtmi ler, bu nedenle i lem görmü olan ürünlerde kompetatif ELISA'da kross reaksiyonların daha az görülmesi nedeniyle de indirekt ELISA tercih edilmiştir.

Numunelerdeki karı ım miktarlarını bulmak için Ayob ve ark. (3), Dinçer ve ark. (7), Kangethe ve ark. (17) önerdi i gibi mikroplakalarda numunelerle birlikte standart antijenler kullanılmı ve standart antijenlerden elde edilen e rilerden yararlanılarak karı ım miktarları hesaplanmıştır. Yine standartlara dayanarak do rudan numunelerdeki karı ım miktarını bulmak mümkün olmasına ra men, güvenilir sonuçları söyleyebilmek için standart e riden geçen 6 noktanın bulunması gerekti ini Kangethe ve ark. (17) bildirmektedirler. Standart e rilere göre testin 0,1 µg-100 µg arasında duyarlılı a sahip oldu u tesbit edilmiştir. At ve domuz albuminleri ile yapılan deneylerde ise duyarlılı ın 2 µg ml⁻¹ oldu u bulunmu tur. Numunelerde hesaplanan karı ım miktarları ile olması gereken miktarlar (% 1, 3, 5, 10, 15) arasında student t testi yapılmı "t" testi sonuçlarına göre (Tablo 2) at etinin I. yapımına ait örneklerde hesaplanan miktarlar beklenen miktarlara göre p de eri (p<0,01) önemsiz bulunmu tur. II. yapımına ait örneklerde ise % 1, 3 ve 5 karı ımlarda (p<0,01) miktarlar önemli, % 10 ve 15 karı ımlarda önemsiz bulunmu tur. Domuz eti karı ımlarının 1. ve 2. yapımına ait örneklerinde ise sadece % 1'lik karı ım miktarları beklenen miktarlardan (p<0,01) farklı bulunmu tur. Her iki et karı ımına ait toplam örneklerin ortalamalarında ise % 1 ve 3'lük karı ımlarda miktarlar (p<0,01) önemli bulunmu tur. Deney sonuçları Ayob ve ark. (3) Patterson ve ark. (23, 26), Dinçer ve ark. (7) ve Ayob ve ark. (3) etlerde % 1'lik karı ımların ayırt edilebilece i görü ünü desteklemektedir. Yine etlerdeki % 1'lik karı ımların tesbit edilmeleri

Tablo 1. Standart at ve domuz antijenlerinde okunan optik dansite değerleri.

		I. YAPIM			II. YAPIM		
		A	B	C	A	B	C
A T	0	1,333	2,821	1,756	1,190	2,810	1,236
	0,01 µg	1,384	2,803	1,804	1,182	2,730	1,207
	0,1 µg	1,372	2,710	1,824	0,870	2,640	1,189
	1 µg	0,625	1,400	0,804	0,450	1,370	0,524
	10 µg	0,336	0,750	0,399	0,362	0,780	0,412
	100 µg	0,275	0,440	0,278	0,255	0,390	0,242
	1000 µg	0,228	0,260	0,199	0,211	0,250	0,185
	10 000 µg	0,220	0,270	0,195	0,209	0,230	0,185
D O M U Z	0	2,317	1,502	2,043	2,314	1,379	1,734
	0,01 µg	2,230	1,400	1,932	2,203	1,349	1,741
	0,1 µg	2,284	1,484	1,941	2,269	1,281	1,519
	1 µg	2,092	1,086	1,372	1,736	0,915	1,126
	10 µg	1,338	0,766	1,005	0,309	0,685	0,862
	100 µg	0,423	0,306	0,298	0,398	0,281	0,271
	1000 µg	0,309	0,258	0,230	0,279	0,240	0,198
	10 000 µg	0,299	0,270	0,232	0,317	0,268	0,237

üzerine Whittaker ve ark. (28), Griffiths ve Billington'un (8), Jones ve Patterson (14), Patterson ve Spencer'in (25) yaptıkları çalı maların sonuçlarıyla aynı do rultudur. Standart antijenlerle mikropalakaların kaplandı ı bu bizim kullandı mız indirekt kompetatif ELISA tekni i, Kangethe ve ark. (17), Whittaker ve ark. (29), Jones ve Patterson (13) tarafından kullanılan ELISA tekniklerinden çok daha iyi performans sa lamı tır. Ayrıca Patterson ve ark. (26) di er ELISA tekniklerine göre çok yüksek sensitiviteli (% 1'in altındaki karı ımları) olarak bildirdi i sandwich ELISA kadar indirekt kompetatif ELISA'da duyarlı bulunmu tur. Fakat dü ük düzeylerdeki karı ımların ayırt edilmesinde numunenin ekstraksiyonu ile homojenizasyon önemlidir. Ürünler içerisindeki % 3'den fazla at ve domuz eti karı ımları kolayca ayırt edilebilmekte ve karı ım miktarları hesaplanabilmektedir. Bizim sonuçlarımıza göre % 3'den a a ı %1'lik karı ımların bile ayırt edilebildi ini ve elde mevcut kontrol gruplarının bulunması halinde bu karı ım miktarlarının bile miktarlarının tesbit edilebilene ini göstermektedir. Bu nedenle deneysel olarak % 1'lik karı ımlar tesbit edildi i halde saha çalı malarında numunelerdeki % 1'lik karı ımların homojen olmamalarından dolayı 10 mg gr⁻¹ karı ımlarda miktar tayini yapmak ko ullara göre de i e bilece inden güvenli olmayabilir. Fakat % 3'ün altındaki miktarları tesbit edilememesine kar ın karı ımların varlı ını ortaya koymak mümkündür. Çünkü her ne kadar homojenizasyonun dü ük karı ımlar üzerine

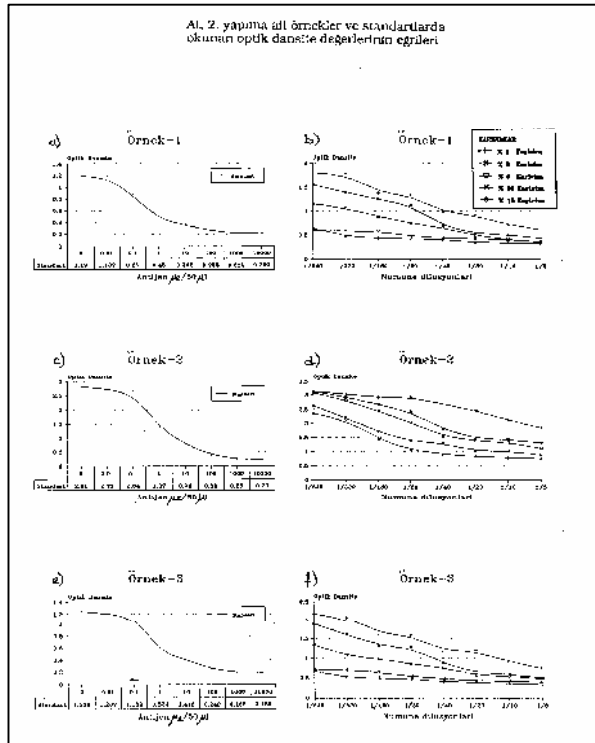
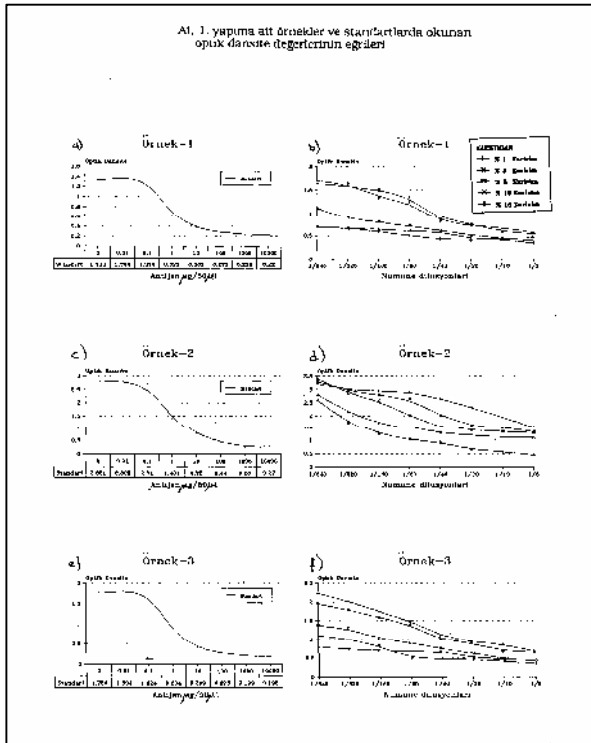
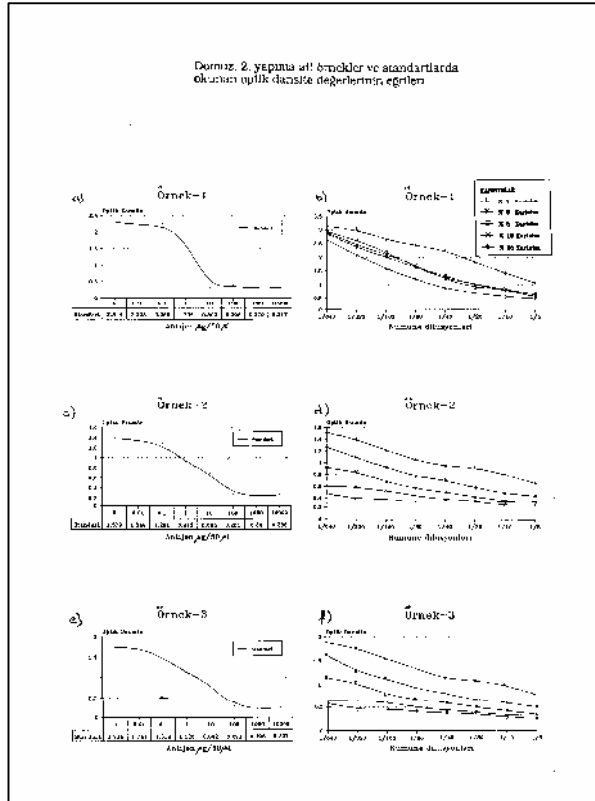
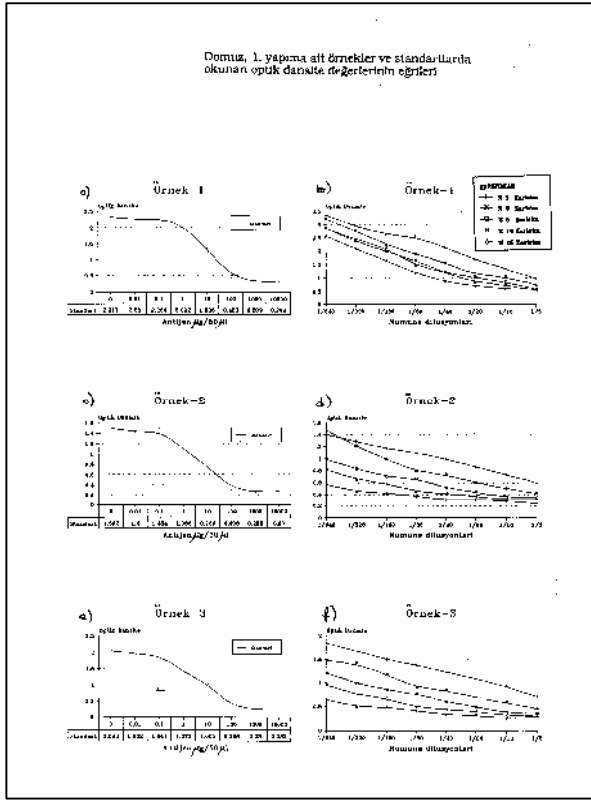
olumsuz etkisi de olsa çok duyarlı bir metod oldu u için pozitif sonuç alınmaktadır. Bu nedenle saha çalı maları için oldukça duyarlı ve güvenilir bir metottur. Sucuk numunesinin içinde bulunan kürlleme ajanları (NaCl, NaNO₃) ve baharatların ELISA'ya olumsuz etkileri olmamı tır. Bu sonuçlar Dinçer ve ark. (7) ile Jones ve Patterson'un (14) bildirdi i gibi i lenmi etlerde ELISA ile tür ayırımı yapılabilece i görü üyle aynı do rultudur. Yabancı et karı ımlarının tesbitinde ELISA kolay uygulanabilen hassas bir metod olmasına kar ın miktar ölçümlerinde ekstraktların iyi hazırlanması ve kullanılan antikorların monospesitesinin yüksek olması oldukça önemlidir.

Türler arasındaki kross reaksiyonun varlı ının tesbit edildi i ELISA testlerinde okunan OD de erlerinin homolog antijen-antikor reaksiyonlarında yüksek, farklı türlerin antijenleri arasında ise dü ük gözlenmi (ekil 2 ve 3) ve istatistiksel olarak önemsiz bulunmu tur. Safila tırarak kullandı mız at, domuz ve sı ır antiserumları, türüne özgü antijenler di ndaki albuminlerle çapraz reaksiyon göstermemi tir. Bu Ayob ve ark. (3), sonuçları ile aynı do rultudur. Fakat Dinçer ve ark. (7), Kangethe ve ark. (17), Patterson ve Jones (23) affinite kromatografi ile safila tırlımı antiserumlar kullanıldı nda bile yakın tür hayvan etleri arasında kross reaksiyonların gözükmedi ini bildirmektedirler. Yine Dinçer ve ark. (7), i lenmin ELISA için olumsuz etki göstermedi ini ve kross reaksiyonların indirekt ELISA'ya oranla kompetatif ELISA'da daha dü ük oldu unu bildirmi lerdir.

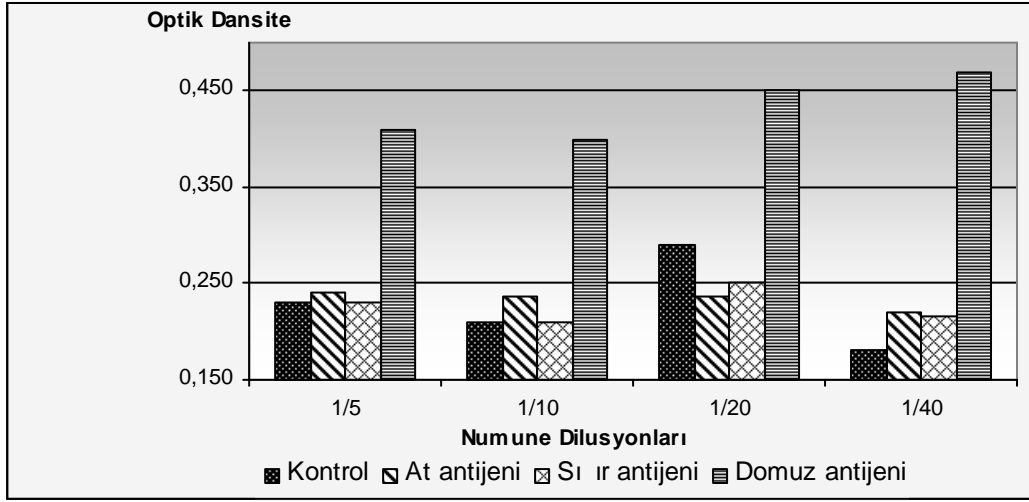
Tablo 2. Örneklerde hesaplanan karışım miktarları, standart sapmaları ve beklenen miktarlar arasında t değeri sonuçları

%	Beklenen mg	I. YAPIM					I. YAPIM					TOPLAM					AT-DOMUZ TOPLAM				
		n	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	Sd, 0,01't	n	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	Sd, 0,01't	n	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	Sd, 0,01't	n	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	Sd, 0,01't	n	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	Sd, 0,01't	n	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	Sd, 0,01't		
1	1000	3	621 ± 521	0,727	3	28 ± 7	138,857*	6	325 ± 268	2,518-	12	379 ± 146	4,253*								
3	3000	3	722 ± 560	4,069-	3	235 ± 69	40,072*	6	480 ± 275	9,163*	12	1110 ± 346	5,462*								
5	5000	3	3231 ± 2711	0,623-	3	322 ± 66	70,878*	6	1777 ± 1376	2,342-	12	3318 ± 1138	1,478-								
10	10 000	3	8945 ± 7199	0,147-	3	1949 ± 963	8,360-	6	5447 ± 3601	1,264-	12	10334 ± 3707	0,090-								
15	15 000	3	9956 ± 7873	0,641-	3	4143 ± 2071	5,029-	6	7050 ± 3866	2,056-	12	24393 ± 9888	0,949-								
1	1000	3	746 ± 17	14,941*	3	123 ± 73	12,013*	6	434 ± 143	3,958-											
3	3000	3	2618 ± 564	0,677-	3	866 ± 608	3,509-	6	1742 ± 539	2,330-											
5	5000	3	6858 ± 2127	0,873-	3	2858 ± 2400	0,892-	6	4858 ± 1690	0,084-											
10	10 000	3	18323 ± 7590	1,096-	3	12119 ± 11065	0,191-	6	15221 ± 6159	0,847-											
15	15 000	3	56540 ± 25297	1,642-	3	26934 ± 24809	0,482-	6	41737 ± 17173	1,556-											

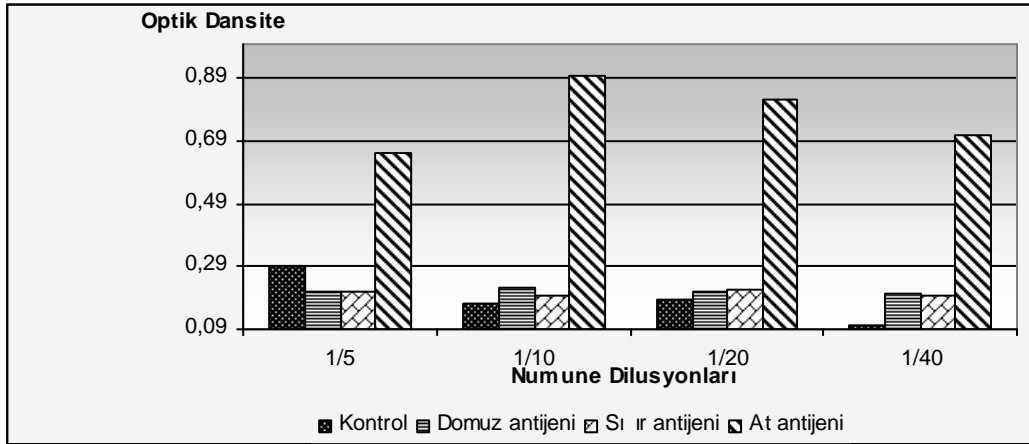
- Fark önemsiz



ekil 1. At ve domuz antijeni standartların ve örneklerin OD e rileri



ekil 2. Domuz antikorunun at ve sı ır etleriyle arasındaki kross reaksiyon



ekil 3. At antikorunun domuz ve sı ır etleriyle arasındaki kross reaksiyon

Ayob ve ark. (3) ise sı ır eti içerisinde domuz eti karışımlarının analizini yaptıkları indirekt kompetatif ELISA'da kross reaksiyonun daha az görüldü ü sonuçları bu ara tırma sonuçlarına paralellik göstermektedir.

Ucuz etlerin pahalı etler içerisinde karı tırma oranının genelde % 20 civarında oldu u tahmin edilmektedir. Çünkü % 20'nin altındaki karı ımlar hile bakımından ekonomik olmadı ı dü ünülüp bu yüzden di er kaba immunolojik metotların kullanılması yeterli görülse de, yakın tür hayvan etlerinin ayırımı mümkün kılmaması, sa lık açısından % 20'nin altındaki karı ımların önemli

olması ve sosyal etik (yöresel, dini ve etnik kurallar gibi) nedenler bu amaçla kullanılacak metodun daha duyarlı olmasını zorunlu kılmaktadır. Bunun için de etlerin türlerine göre ayırt edilmesinde spesifitesi yüksek bir metot olan ELISA tercih edilmelidir. Yine ELISA'nın önemli bir ba ka özelli i de, aynı anda oldukça fazla numunenin analiz edilebilmesidir. Bu özelli inden dolayı gıda kontrol laboratuvarlarına bu sistemin getirilmesi ile bugüne kadar masraflı ve uzun zaman alan identifikasyon analizleri daha pratik ekle sokularak, piyasada etlerin orjin yönünden kontrollerinde süreklilik sa layacaktır.

Te ekür

Doktora tezimin yürütülmesinde eme i geçen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi kürsünün bütün çalı anlarına ve maddi deste ini sa layan Ankara Üniversitesi Ara tırma Fonuna te ekür ederim.

Kaynaklar

1. Anonim, 1985. *Affinity Chromatography Principles and Methods*. Pharmacia. Sweden.
2. Ayaz Y, 1986. Agar-jel difüzyon yöntemi ile et nevelerinin ayırt edilmesi üzerine çalı malar. *Etilik Vet Mik Derg*, 6 (5): 73-80.
3. Ayob MK, Ragab AA, Allen JC, 1989. An improved rapid ELISA technique for detection of pork in meat product. *J Sci Food Agr*, 49 (1): 103-116.
4. Berkmen L, Demirer MA, 1963. Sı ır ve manda etlerinin presipitasyon metodu ile ayırt edilmesi üzerine ara tırmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, (1): 35-43.
5. Demirer MA, 1964. Koyun ve Keçi Etlerinin Presipitasyon Metodu ile Ayırt Edilmesi Üzerine Ara tırmalar. AÜ Vet Yay No:152, Sevinç Matbaası, Ankara.
6. Dinçer B, 1979. Türk fermente sucu unda fermentasyon ve kuruma sırasında bile imsel, organoleptik ve lipolitik de i iklikler üzerine çalı malar. VHG.457.TUBITAK, Ankara.
7. Dinçer B, Spearow JL, Canses RG, Graeser ML, 1987. The effects of curing on cooking on the detection of species origin of meat products by competitive and indirect ELISA techniques. *Meat Sci*, 20 (4): 253-267.
8. Griffiths NM, Billington JM, 1984. Evaluation of an ELISA for blood serum to determine indirectly the apparent beef content of beef joints and model mixtures. *J Sci Food Agr*, 35: 909-914.
9. Herbert WJ, 1973. Laboratory animal techniques for immunology. Appendix-3. Weir DM eds, *Immunochemistry*, Oxford, Blackwell Scientific Publications.
10. Herrmann C, Kotter L, 1972. Serologische differenzierung einer 4000 jahre alten fleischprobe. präzipitation. *Berl Mün Tierarztl Wochensh*, 85 (1): 11-14.
11. Hitchcock CHS, Bailey FJ, Crimen AA, Dean DAG, Davis PJ, 1981. Determination of Soya proteins in food using an ELISA procedure. *J Sci Food Agr*, 32: 157-165.
12. Johnston LAY, Trace-Patte PD, Pearson RD, 1985. Identification of the species of origin of meat in Australia by RIA and EIA. Morris BA, Clifford MN eds, *Immunoassay in Food Analysis*. Elsevier Applied Science Publishers, London.
13. Jones SJ, Patterson RLS, 1986. A Modified indirect ELISA procedure for raw meat speciation using crude anti-species antisera and stabilized immunoreagent. *J Sci Food Agr*, 37: 767-775.
14. Jones SJ, Patterson RLS, 1985. Double antibody ELISA for detection of trace amounts of pig meat in raw meat mixtures. *Meat Sci*, 15 (1): 1-13.
15. Kaiser K, Mathesis G, Dürmann CK, Belitz HD, 1980. Proteindifferenzierung mit elektrophoretisch Methoden bei Fleisch, fisch und abgeleiteten Produkten. *Z Lebensm Unters Forsch*, 171: 415-419.
16. Kamiyama T, Katsube Y, Imaizumi K, 1978. Serological identification of animal species of meat using species-specific antiserum albumin antibodies obtained by Immunoabsorbent Chromatography. *Jpn J Vet Sci*, 40 (6): 663-669.
17. Kangethe EK, Jones SJ, Patterson RLS, 1982. Identification of the species origin of fresh meat using an ELISA procedure. *Meat Sci*, 7 (3): 229-240.
18. Kim H, Shelef LA, 1986. Characterization and identification of raw beef pork, chicken and turkey meats by electroforetic, patterns of their sarcoplazmik proteins. *J Food Sci*, 51(31): 731-735.
19. Kurth L, Shaw FD, 1983. Identification of the species of origin meat electroforetic and immunological methods. *Aust Food Technol*, 35 (7): 328-331.
20. Martin R, Azcona JL, Cases C, Hernandez PE, Sanz B, 1988. Sandwich ELISA for detection of pig meat in raw beef using antisera to muscle soluble proteins. *J Food Prot*, 51 (10): 790-79.
21. Martin R, Azcona JL, Cases C, Hernandez PE, Sanz B, 1988. Sandwich ELISA for detection of horse meat in raw meat mixtures using antisera to muscle soluble proteins. *Meat Sci*, 22 (2): 143-153.

22. Minden P, Fair RS, 1973. The ammonium sulphate method to measure antigen-binding capacity. Weir DM eds, *Immunochemistry*, Oxford, Blackwell Scientific Publications.
23. Patterson RLS, Jones SJ, 1985. Species identification of meat in raw unheated meat products. Morris BD, Clifford MN eds, *Immunoassays in Food Analysis*. Elsevier Applied Science Publishers, London.
24. Patterson RM, Spencer TL, 1983. A rapid on side test for speciation of meat. *Aust Vet J*, 60 (12): 381-382.
25. Patterson RM, Spencer TL, 1983. Differentiation of raw meat pylogenically related species by ELISA. *Meat Sci*, 15: 119-123.
26. Patterson RM, Whittaker RG, Spencer TL, 1984. Improved species identification of raw meat by double sandwich ELISA. *J Sci Food Agric*, 35: 1018-1023.
27. Samy HA, Woadrow CM, Philip GS, 1988. Liquid Chromatographic identification of meats. *JAOAC*, 71 (2): 349-403.
28. Whittaker RG, Spencer TL, Copland JW, 1983. An ELISA for species identification of raw meat. *J Sci Food Agr*, 34: 1143-1146.
29. Whittaker RG, Spencer TL, Copland JW, 1983. ELISA for meat species testing. *Aust Vet J*, 59 (1): 125.

Yazı ma Adresi :

Yrd. Doç. Dr. Ufuk Kamber
Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı
Pa açayırı - KARS
Tlf: 0474.2426836-1182
E-mail: ufukkamber@hotmail.com