

## MÜNİH'TE TÜKETİME SUNULAN KOYUN VE KEÇİ PEYNİRLERİNDE İNEK SÜTÜ KARIŞIMININ ENZİM-İMMUNOLOJİK SANDWICH-EIA TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

### A STUDY ON THE DETERMINATION OF MIX OF COW MILK BY THE TEST OF ENZYME IMMUNOLOGICAL SANDWICH-EIA IN GOAT AND SHEEP CHEESE SAMPLES MARKETED IN MUNIH

Özer ERGÜN

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı-İSTANBUL

**ÖZET:** Münih piyasasında market ve dükkanlarda satışa sunulan yerli veya ithal koyun keçi peynirlerinden 48 adet toplanmış ve Enzimimmunolojik Sandwich-EIA testi ile inek sütü karışımı yönünden incelenmiştir. Numunelerin 27 tanesinde (% 56'da) inek sütü karışımı tesbit edilmiş olup uygulanan testin hassasiyeti % 1'dir.

**SUMMARY:** 48 imported or locally produced goat and sheep cheese samples marketed in Munich, were collected and examined in point of mix of cow milk by the test of Enzyme Immunological Sandwich-EIA. In the 27 cheese samples (56 %) were determined mix of cow milk. The sensitivity of the applied test is 1 %.

## GİRİŞ

Koyun keçi sütlerinin sezona göre miktarlarındaki azalmalar ve inek sütüne kıyasla daha pahalı olması inek sütünün, koyun ve keçi sütüne tarıştırılmasına yol açmaktadır.

Koyun peyniri üretimine önemli ölçüde yansıyan bu hileliğin tespitinde şimdiye kadar koramatografik ve elektroforetik metodlar kullanıla gelmiştir (KRAUSE ve ark., 1989; RAMOS ve JAUREZ, 1986). Ancak, bu metodlar oldukça zaman alıcı, zahmetli olup, pahalı ekipman gerektirmektedir.

Şimdiye kadar uygulanana gelen immunolojik metodlarda ya immundiffuzyon, ya da immunelektroforez baza dayalı metodlardır (ELBERTZHAGEN ve WENZEL, 1982; GAMBOCZ, 1981; SATT HORST ve ark., 1983 RADFORD ve ark., 1981).

Son zamanlarda da bu metodlara alternatif olarak daha çabuk ve kolay uygulanabilen, otomize edilebilen enzimimmunolojik tesbit metodları (Enzymimmunoassay, EIA) geliştirilmeye çalışılmıştır (GARCIA ve ark., 1991; RODRIGUEZ ve ark., 1990; SAUER ve ark., 1991).

Bu çalışmada SAURE'in, 1991 geliştirdiği Enzimimmunolojik Sandwich-EIA Testi ile Münih piyasasında satışa sunulan yerli ve ithal koyun-keçi peynirlerinde inek sütü karışımı aranmıştır.

## MATERYAL VE METOD

### Materyal

**Kimyasal Malzeme ve Çözeltiler:** Antikoyun IgG-Enzim-konjugat, Bicarbonat Puffer, yıkama çözeltisi, Jelatin/PBS çözeltisi, Tetramethylbenzidin çözeltisi, Substrat çözeltisi ve Sandwich-EIA için gerekli diğer malzemeler.

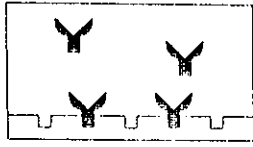
**Aletler:** Variabl mikropipetler, variabl 12 kanallı mikropipet, Taumler, Mikrotiter plakalar, ELISA Autorieder, Stomacher, Sogutmalı santrifüj, etüv.

**Numuneler:** Münih piyasasında market ve dükkanlarda satışa sunulan koyun veya keçi sütünden imal edilmiş 48 adet numune toplanmıştır. Peynir numunelerinin orijinleri itibariyle dağılımı şu şekildedir: Türkiye (6), Yunanistan (16), Bulgaristan (12), Fransa (8), Korsika (2), Almanya (1), İspanya (1), Danimarka (1).

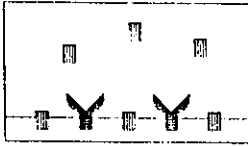
### Metod

**Numunelerin Hazırlanması:** 2 gr. Peynir numunesi, 10 ml % 0,5'lik Tween 20/PBS çözeltisi içerisinde stomacherde homojenize edildikten sonra kağıt filtreden geçirilerek filtre edilir.

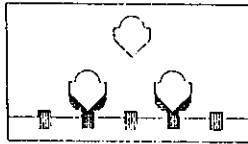
**Testin Uygulanışı:** Peynir örneklerinde elde edilen serumdaki sığır IgG'lerinin miktarı SAUER'in, 1992 geliştirdiği enzim immünojenik Sandwich-EIA testi ile araştırıldı. Testin uygulanışı safhalar halinde aşağıdaki gibidir.



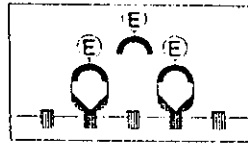
I. Mikrotiter plakaların antiserumla kaplanması  
(20 saat, 4°C'de)



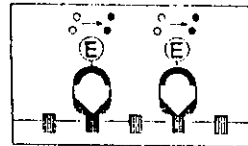
II. Boş kalan yerlerin doyurulması  
(30 dk., Oda ısısında)



III. Örneklerin plakaya verilmesi  
(60 dk., Oda ısısında)



IV. Antikor-Enzim-Konjugatın plakaya verilmesi  
(60 dk., Oda ısısında)



V. Substrat çözeltisinin verilmesi  
(20 dk., Oda ısısında)

VI. Renk reaksiyonunun IM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile durdurulması

VII. Autoriederde 450 nm. dalga boyunda ekstinksiyon değerinin ölçülmesi

Şekil 1. Sandwich-EIA testinin mikrotiter plakalarda uygulanma safhaları

numunesinin 45 tanesi (% 30) pozitif çıkmıştır.

Tüketicinin aldatılmasını önlemek için koyun peynirlerine inek sütü karıştırılıp karıştırılmadığı düzenli ve sürekli kontroller ile takip edilmelidir. Bu kontrollarda basit, çabuk ve kolay bir metodun uygulanması önem taşır. Bu gaye için şimdiye kadar elektroforetik, chromatografik, immünojenik metodlar uygulanagelmıştır.

Ancak 1980'li yılların sonlarından itibaren koyun ve ineksütü ayırımında enzimimmünojenik testler de uygulanmaya başlanmıştır (ARANDA ve ark., 1988; GARCIA ve ark., 1991). Enzimimmünojenik testler anılan diğer metodlara göre çok daha çabuk, hem malzeme ve hem de personel yönünden daha ucuzdur. Ayrıca diğer metodlarda numunelere uygulanan uzun ve zahmetli ekstraksiyon işlemleri enzimimmünojenik testlerde en basit hale getirilmiş, hassasiyet de mikrotiter plakalarda sütte % 0,001' indirilmiştir. Aynı hassasiyet peynirde % 1'dir. Termize veya pastörize edilmiş inek sütünün koyun ve keçi sütüne karıştırılması

## BULGULAR

Alınan sonuçlar Çizelge 1'de topluca gösterilmiştir.

## TARTIŞMA

Araştırma sonuçları göstermiştir ki; Münih piyasasında toplanan toplam 48 adet koyun ve keçi peynirinin 27 tanesi (%56) inek sütü karışımı yönünden pozitif sonuç vermiştir. Türkiye, Bulgaristan, Yunanistan gibi Balkan ülkeleri orijinli toplam 34 numunenin 21 adedi (%62) inek sütü ihtiva ederken, çeşitli Avrupa ülkelerinden gelen 14 numunenin 6 adedi (%42) inek sütü yönünden pozitif çıkmıştır.

Burada dikkati çeken Türkiye orijinli numunelerin hepsinin, Bulgaristan kaynaklı numunelerin büyük çoğunluğunun (% 75) inek sütü karışımı taşırken, Yunanistan orijinli Monouri peynir örneklerinin tamamının inek sütü yönünden negatif olmasıdır.

BREHMER ve KLINGER, 1989 elektroforez metodu ile Almanya'da satışa sunulan koyun peynirlerinde topladıkları 109 adet numunenin 37'sine (%34) inek sütü karıştırıldığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde HORN'un 1989; izoelektrik fokussirung yöntemi ile araştırdığı 146 koyun peyniri

Çizelge 1. Koyun ve Keçi Peynir Örneklerinde İnek Sütü Karışımının Araştırılması

Peynirin Orijini	Numune Sayısı	İnek Sütü Pozitif	İnek Sütü Negatif
Türkiye	6	6	-
Yunanistan	16 (8 Monouri)	6	10 (8 Monouri)
Bulgaristan	12	9	3
Fransa	8	3	5
Almanya	1	-	1
İspanya	1	1	-
Danimarka	1	1	-
Korsika	2	-	2
Slovakya	1	1	-
Toplam	48	27	21

durumunda immunglobinler % 20-40 oranında denature olurlarsa da immunfiltrasyon-EIA metodu ile bu ayırımın yapılması mümkündür. Aynı şekilde peynir üretiminde kullanılan koyun sütüne termizasyon veya pastörizasyon işleminden geçirilmiş inek sütü katıldığında gerek mikrotiter-EIA ve gerekse test çubukçukları ile yapılan EIA metodu başarı ile uygulanabilir. Ancak koyun ve keçi peynirlerinde UHT işleminden geçirilmiş inek sütü karışımı Enzimimmunolojik-EIA metodu ile tespit edilemez.

Bunun nedeni de sığırın IgG'lerinin tamamıyla denature olmalarıdır (SAUER, 1992).

Peynir numunelerindeki sığır IgG miktarı peynir örneğinin kaç defa dondurulup çözündüğüne, inek sütü karışımının peynirdeki homojenitesine bağlı olarak sapmalar gösterebilmektedir.

Yine SAUER ve arkadaşlarının, 1991, geliştirip uygulamaya koydukları ve test çubukları ile yapılan enzimimmunolojik hızlı test koyun ve keçi sütlerini inek sütünden ayırmada en pratik çözüm olmuştur. 5 dakika gibi çok kısa sürede sonuçlandırılabilen bu testin hassasiyeti % 1'dir.

#### KAYNAKLAR

- ARANDA, R.ORIA, M.COLUO 1988. Detection of cow's milk in ewe's milk and cheese by an immunodotting method. J.Dairy Res. 55, 121-124.
- BREHMER, H., A. KLINGER, 1989. Tierrartliche Untersuchungen von Frischkase mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)-Nachweis von Kuhmilch in Schaf- und Ziegenkase. Arch. Lebensm Hyg. 40, 34-36.
- ELBERTZHAGEN, H., E.WENZEL, 1982. Nachweis von Kuhmilch in Schafkase mittels Immunelektrophorese. 2 Lebensm. Unters. Forsch. 175, 15-16.
- GARCIA, T., R.MARTIN, E.RODRIGUEZ, 1991. Detection of bovine milk in ovine milk by a sandwich enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). J.Food. Prot. 54, 366-369.
- GOMBOCZ, E., E.HELLWIG, F. PETUELY, 1981. Immunologischer Nachweis von Kuhmilchkasein in Schafkasein. Z.Lebensm. Untert. Forsch. 172, 178-181.
- HORN, D., 1989. Verfälschung von Schafkase mit Kuhmilch. Dtsch. Milchwirtsch. 40, 116-118.
- HORST, B., S.BAUNDER, H.O., GUNTHER, 1983. Immunologischer Nachweis von Kuhmilchproteine in Schaf- und Ziegenmilch bzw-kase über ein spezifisches Immunglobin. Z.Lebensm. Unters. Forsch. 177, 8-10.
- KRAUSE, I., H. ELBERTZHAGEN, F.BERNER, H.KLOSTERMEYER, 1989. Isolektrosche Fokussierung (IEF) und Kreuzimmunelektrophorese (KIEP) als sich ergänzende Methoden zum schnellen und sicheren Nachweis von Kuhmilch in Schaf- und Ziegenkasein. Dtsch. Milchwirt 22, 713-714.
- RADFORD, D.V., Y.T.TCHAN, J.Mc.PHILLIPS, 1981. Detection of cow's milk in goat's milk by immunoelectrophoresis. Austr. J.Dairy Technol. 36, 144-146.
- RAMOS, M., M.JAUREZ, 1986. Chromatographic, electrophoretic and immunological methods for detecting mixtures of milks from different species. IDF-Bulletin 202, 175-177.
- RODRIGUEZ, E., R.MARTIN, T.GARCIA, P.E. FERNANDEZ und B.SANZ, 1990. Detection of cow's milk in ewes milk and cheese by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J.Dairy res. 57, 197-205.
- SAUER, S., R.DIETRICH, E. SCHNEIDER und G.TERPLAN, 1991. Ein enzymimmunologische Schnelltest zum Nachweis von Kuhmilch in Schaf- und Ziegenmilch. Archiv f. Lebensmittelhyg. 42, 133-160.
- SAUER, s., 1992. Entwicklung und Anwendung von enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von Kuhmilch in Schaf- und Ziegenmilch bzw-Kase. Dissertationarbeit, der LM Univ., München.