

Farklı Hayvan Türlerine Ait Çiğ Etlerin SDS-PAGE Yöntemiyle Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma*

Kamil EKİCİ¹Nurhan AKYÜZ²¹Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı. Van / Türkiye²Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Van / Türkiye

ÖZET

Bu çalışmada, çeşitli hayvan türlerine ait etlerin ve bu etlere yapılan katkı seviyelerinin belirlenmesi amacıyla, bazı et proteinlerinin ayırımında Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) tekniğinin kullanılabilme imkanları araştırılmıştır. Et türlerinin ayırımında spesifik protein bantları kullanıldı. Araştırmada çiğ sığır, domuz, koyun ve at etleri ayrı ayrı ve ağırlıklarına göre muhtelif seviyelerde ikili (0/100, 5/95, 25/75, 50/50, 75/25, 95/5, 100/0) karışımlar şeklinde hazırlanmıştır. Hazırlanan örneklerdeki tür çeşidi ve bunların yüzde nispetleri SDS-PAGE tekniği ile protein profilleri yine molekül özellikleri bilinen standart protein markerleri ile karşılaştırılarak, teşhis ve tespitler gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE tekniğinin, et karışımlarındaki türlerin ve bunların karışımlardaki oranlarının % 5-10'a kadar tespitinde başarı ile kullanılabileceği ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler : SDS-PAGE, çiğ et, karışım, tür

A Study with SDS-PAGE Technique for the Species Identification of Raw Meat

SUMMARY

In this study, for evaluating the effectiveness of Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) to identify the animal species in raw meat species adulteration in binary mixture was investigated. Characteristic banding patterns of proteins for each species were used in identifying the existence of other species in a meat mixture. Electrophoretic patterns of water soluble proteins from single meat species and binary mixtures (0/100, 5/95, 25/75, 50/50, 75/25, 95/5, 100/0) by weight were presented. In this study, raw beef, pork, sheep and horse meat was individually prepared and mixed in various ratios based on flesh weight and then the protein patterns were compared with standart proteins markers. The species specific band decreases with decreasing the weight of flesh used in the binary mixture, and at 5% mixture, this band present in mixed samples. SDS-PAGE was an effective method to differentiate and identify species of raw meat in the binary mixture sample. Meat species adulteration at concentration as low as 5-10 % by weight could be detected without risk.

Key words : SDS-PAGE, raw meat, adulteration, species

GİRİŞ

Et, insanın beslenmesinde çok önemli yeri olan temel gıda maddelerinden birisidir. Uluslararası et ticaretinin artması, yapılan hileleri de artırmıştır. Bu bakımdan et türlerinin belirlenmesi tüketicilerin korunması ve hilelerin önlenmesi bakımından önem arz etmektedir (14). Bunun için de, etlerin elde edildiği hayvan türlerinin belirlenmesi yönünde daha duyarlı yöntemlere ihtiyaç bulunmaktadır(Hitchcock ve Crimes, 1985; Kamber, 1996). Toplum sağlığı, geleneği, göreneği ve inancı gereği, tüketilecek etin yada et ürününün hangi hayvan etinden yapıldığının belirlenmesi uzun yıllardan beri gıda bilimcilerinin başlıca araştırma konularından biri olmuştur. Bu amaçla, çok çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Bu metotlar morfolojik, elektroforetik, immünojenik, serolojik ve genetik metotlar olarak sınıflandırılmaktadır (8, 17, 25, 32, 33,). Bunlar arasında elektroforetik metotlar, ısı işlemi görmüş et ürünlerinde de kullanılabilmeleri ve duyarlı olmaları nedeni ile yaygın olarak uygulanmaktadır(2, 3, 8, 9,14). Elektroforetik metotlar, ya genel protein profillerine göre, yada özel enzimlere ait protein profillerine göre farklı hayvan türlerinin ayırımında kullanılmaktadır(19).

Hofmann (11) çalışmasında, hayvan türü tespitinde çok sıklıkla kullanılan elektroforetik metotları, elektroforez, SDS-PAGE elektroforezi ve izoelektrik odaklama olmak üzere üç grupta açıklamıştır. SDS-PAGE tekniğini, Scope ve Penny (27), ilk defa et proteinlerinin ayırımı için kullanmışlar ve daha sonraları bu metodun, et karışımlarındaki ve et ürünlerindeki et türlerini belirlemede çok değerli bir metot olduğu anlaşılmıştır. SDS-PAGE metodu kullanılarak yapılan bir çalışmada, SDS-PAGE metodunun yüksek çözünürlük sağlama, kolay tekrarlanabilirliği ve elektroferogramlarda proteinlerin molekül ağırlıklarına göre hareket etmesinden dolayı üstün olduğu bildirilmiştir(24). Bu metot bir çok araştırmacı tarafından, hayvan türü tayininde başarılı bir şekilde uygulanmıştır (2, 3, 5, 6, 7, 10,12, 15, 18, 22). Elektroforez işlemi ile ayrılan maddeler ancak özel boyama yöntemlerinin kullanılmasından sonra tespit edilebilmektedir. Bu amaçla tüm proteinlerin boyanması için kullanılan, kenacid blue, amidoblack, commasie brilliant blue gibi boyama yöntemleri kullanılmaktadır(7, 10,12).

Bu araştırmada, çiğ et ürünlerinden kıymalarda yapılabilecek tür karışımı hilelerinin tespitinin mümkün olup olamayacağı ve bu metodun gıda kontrol laboratuvarlarında kullanılıp kullanılmayacağına açıklığa kavuşturulması amaç edinilmiştir.

*Aynı isimli doktora tezinden özetlenmiştir

MATERYAL ve METOT

Bu araştırmada, materyal olarak domuz, at, sığır ve koyun etleri kullanılmıştır. Domuz eti Ankara'da bulunan bazı lüks otellerin mutfaklarından, at eti, Ankara'daki hayvanat bahçesinde yırtıcı hayvanlara verilmek üzere kesilen hayvanlardan, sığır ve koyun etleri ise, Van'daki kasaplardan temin edilmiştir. Etler alındıktan sonra hemen buzlu termos içerisine konularak laboratuara getirilmiş ve yağ, bağ doku, sinir, lenf vb. kısımlar uzaklaştırıldıktan sonra, iki defa kıyma makinesinden geçirilerek iyice parçalanması sağlanmıştır. Etler bu şekilde parçalandıktan sonra, çeşitli hayvan türlerine ait etlerin ikili karışımları (0/100, 5/95, 25/75, 50/50, 75/25, 95/5, 100/0) elde edilmiştir. Çalışmada hem etlerin kendileri, hem de bu etlerin ikili karışımları materyal olarak kullanılmıştır.

Bu araştırmada; Hoffman ve Penny (9)'nin ette bulunan bazı proteinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesinde ve et türlerinin ayırımında yararlandıkları SDS-PAGE metodu kısmen değiştirilerek kullanılmıştır.

Araştırmada incelenen protein ekstraksiyonları, ikili et karışımlarının, her birinden 20 gr. olacak şekilde uygun oranlarda hassas terazi ile tartılarak alınmış ve hazırlanmıştır. Etler uygun oranlarda tartıldıktan sonra her bir santrifüj tüpüne 20 ml. destile su ilave edilip, mikserle (Philips, HR 1382/A, Austria) iyice karıştırılarak +4 °C'de bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün tekrar iyice karıştırılıp sonra soğutmalı santrafütide +4 °C'de 5000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan süpernatant alınarak aynı şekilde tekrar santrifüj edilmiştir. Yine süpernatant filtre kağıtlarından süzöldükten sonra, sıvı kısım -18 °C'de dondurulmuş ve kullanılmaya kadar bu ısı derecesinde muhafaza edilmiştir (1, 19, 28). Ekstraktların protein varlığı Lowry (20)'nin bildirdiği metoda göre belirlendi. Elektroforez işleminde molekül ağırlıkları bilinmeyen proteinler, molekül ağırlıkları bilinen standart protein markerleri kullanılmış ve örneklerdeki proteinler bunlarla kıyaslanarak molekül ağırlıkları tayin edilmiştir. Bunun için marker ve molekül ağırlığı bilinmeyen proteinler aynı jelde ve aynı şartlar altında elektroforezde yürütülmüştür (4, 21, 23, 31).

Elektroforez işleminde (Hofer Scientific Instruments, SE600, San Francisco, USA), slab jel elektroforez cihazı kullanıldı. Molekül ağırlık standardı olarak (Sigma M-3913) protein standardı kullanıldı.

Elektroforez İşlemi

Bu amaçla % 12'lik ayırma, % 3'lük yığıma (% 12 T, % 2.7 C, 14.5 x 16.5 cm x 1,5 mm) jeli kullanıldı. Elektroforez işlemi yığıma jeline kadar elektrik gücü 100 V'ta; indikatör olarak kullanılan Brom fenol mavisi (Riedel) ayırma jeline ulaşınca 180 V'ta çıkarılarak devam edildi. Brom fenol mavisi ayırma jelinin sonuna, 0,5 cm yaklaşınca, elektroforez işlemine son verildi. Bu sürenin tahmini 5-6 saat olduğu anlaşıldı. Bu işlem her jel için yedi defa gerçekleştirildi.

Jeller cam plakalar arasından çıkarıldıktan sonra, zedelenmeden boyama küvetlerine konuldu. Her bir küvete, % 40 methanol(Merck), % 7 asetik asit çözeltisi içinde hazırlanan Coomassie Brilliant Blue R-250 (% 0.025) boya solüsyonunda jeller bir gece bekletildi.

Jelde dağılım gösteren proteinlerin molekül ağırlıklarının hesaplanmasında molekül ağırlıkları bilinen standart proteinler ile molekül ağırlıkları bilinmeyen örnek proteinler tamamen aynı şartlarda ve aynı jel konsantrasyonunda elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforez işlemi sonunda molekül ağırlıkları bilinen proteinlerin jelde oluşturmuş oldukları bantların, jel üzerinde yürüme mesafeleri ölçüldü. Jellerin boyanmadan önceki ve boyamadan sonraki uzunlukları ve brom fenol mavisi indikatörünün mesafesi ölçülerek relatif hareketleri (Rf) belirlendi. Hesaplama aşağıdaki formül yardımıyla yapıldı.

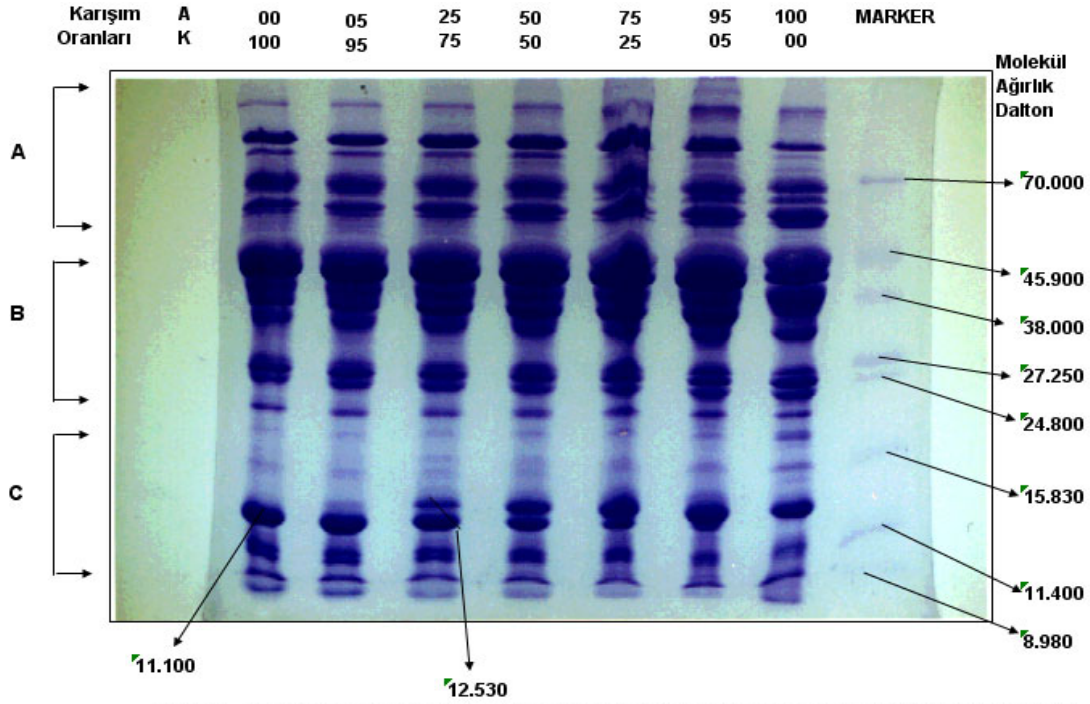
$$Rf = \frac{\text{(Proteinin anottan uzaklığı)} \times \text{(Boyamadan önceki jel boyu)}}{\text{(Boyamadan sonraki jel boyu)} \times \text{(İndikatör boyanın anottan uzaklığı)}}$$

BULGULAR

Sığır ve Domuz Etleri İkili Karışımları

SDS-PAGE tekniği ve % 12 ayırma ve % 3 yığıma jeline elde edilen sığır ve domuz etlerine ait karışımlarının elektroferogramları Resim 1'de verilmiştir. Jel incelenirken türe özgü ayırıcı bantların, jelin hangi kısmında olduğunu göstermek için jel A (üst), B (orta) ve C (alt) kısım olmak üzere üçe ayrılmıştır. Değişik oranlarda karıştırılmış domuz-sığır etlerine ait farklı molekül ağırlıklarına sahip proteinlerin jel üzerinde oluşturduğu çeşitli bantlar Resim 1'de görülmektedir. Markerin hemen yanında jelin en solunda % 100 sığır etine ait proteinlerin profili, jelin en sağında ise %100 domuz etine ait olan proteinlerin profili görülmektedir. Resim 1 incelendiğinde jelin sağında yer alan domuz etine ait profil ile, jelin solunda bulunan sığır etine ait profilin birbirinden farklı olduğu anlaşılmaktadır. Buradan bu etlerin jel üzerinde farklı protein bantları oluşturarak birbirlerinden ayrılacakları sonucu çıkmaktadır.

Jelin A ve B kısımlarında sığır ve domuz etine ait ayırıcı bir bant oluşmamakla beraber, C kısmında sığır için çok spesifik olan ve molekül ağırlığı 11.250 dalton olan protein bandının domuz etinde bulunmadığı görülmektedir. Karışım içinde sığır etinin oranı azaldıkça, bandın yoğunluğu da azalmaktadır. Resim 1'in incelenmesinden kolayca anlaşılacağı gibi sığır-domuz eti karışımı içinde bulunan sığır eti, % 5 oranına kadar rahatlıkla ayrılabilir. Buradan şu sonuç çıkmaktadır; domuz etine % 5 oranında dahi sığır eti karıştırılırsa, bu rahatlıkla ayırt edilebilmektedir. Fakat domuz eti için bu şekilde özel bir protein bandı oluşmadığı görülmektedir. Ancak farklı ekstraksiyon sistemleri kullanılarak domuz eti için de özel bantlar oluşturmak mümkün olabilir (33).



Resim 2 At ve koyun etlerine ait protein profillerinin molekül ağırlıklarına göre dağılımı (A : At- K : Koyun)

At ve Koyun Etleri İkili Karışımları

SDS-PAGE tekniği ile elde edilen at ve koyun etlerine ait karışımların elektroferogramları Resim 2'de verilmiştir. Jelin en sağ kısmında % 100 koyun etine ait proteinlerin profili, sağda markerin hemen yanında ise % 100 at etine ait proteinlerin profili görülmektedir. Resim 2 dikkatli bir şekilde incelendiğinde, markerin yanında bulunan % 100 at etine ait proteinlerin profilleri ile jelin en sol kısmında bulunan % 100 koyun etine ait proteinlerin profillerinin birbirinden farklı olduğu anlaşılmaktadır. Jel burada da ayırıcı bantların yerlerinin belirlenmesi açısından üçe ayrılmış ve A(üst) ve B(orta) kısımlarında yine yoğunlukları ve molekül ağırlıkları birbirinden farklı olan birçok protein bandı görülmektedir. Burada molekül ağırlıkları aynı veya birbirine çok yakın olan bantlar birbirleri ile çakıştığından net bir şekilde ayırım yapılamamaktadır.

Jelin C(alt) kısmında ise, at ve koyun eti için spesifik olan ve karışımlardaki oranları azaldıkça bantların yoğunlukları da azalan molekül ağırlıkları koyun eti için 11.100 at eti için 12.530 dalton olan, iki proteine ait bantların incelenmesi ile at ve koyun etlerinin birbirinden ayrılabilceği anlaşılmaktadır. %100 koyun eti örneğinde belirgin bir şekilde seçilen 11.100 dalton ağırlıklı protein bandı, karışımdaki koyun eti oranı düştükçe azalmakta % 5'ten sonra tamamen kaybolmaktadır. Buna karşılık, katıksız at eti örneğinde dikkati çeken 12.530 dalton ağırlığındaki proteinleri içeren bant ta, at eti/koyun eti oranının 25/75 olduğu örneğe kadar görülmekte, daha sonra yok olmaktadır. Yine bu jelde de molekül ağırlıkları 70.500 ile 9.000 dalton arasında değişen bir protein bulunmaktadır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünyanın bir çok ülkesinde, et ve et ürünlerinin (sucuk, sosis, salam, pastırma gibi), üretiminde kullanılan et türlerinin belirlenmesi büyük bir önem arz etmektedir. Bu nedenle et türlerinin belirlenmesi için çok sayıda değişik laboratuvar metotları geliştirilmiş ve bu metotların bir kısmı da gıda kontrol laboratuvarlarında resmi metot olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Genellikle ekonomik nedenlerden dolayı, et ürünlerinde kullanılan et türlerinin identifikasyonu arzulanmaktadır. Buna ilaveten bazı etlerin yenilmesi (at ve domuz gibi) dinsel ve ulusal kanunlarla sınırlandırılmıştır (16). Bu nedenle et türlerinin identifikasyonu gıda laboratuvarlarının en önemli konularından birisidir.

Höyem ve Thorson (15), geyik, manda, koyun, keçi, köpek, at, güvercin gibi çeşitli hayvanların sulu kas ekstraktlarını poliakrilamid jellerde disk elektroforezi ile incelemişler, bu et ekstraktlarına ait protein profillerinin kullanılan metot yardımıyla birbirlerinden ayrılabilceğini göstermişlerdir. Çalışma sonucunda elde ettiğimiz bulgular, Höyem ve Thorson'un bulduğu sonuçlar ile uyum içindedir. Yine Spell (30), yabani tavşan, geyik, yaban domuzu, ördek, kaz, tavuk, hindi gibi hayvanların etlerini albuminlerine göre elektroforez yöntemiyle molekül ağırlıklarını esas alarak ayırmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, Spell'in bulduğu sonuçlar ile paralellik arz etmektedir. Kato ve Deki (18), at, hindi ve domuz etlerini SDS-PAGE tekniği ile ayırmışlar ve bu metodun et türlerinin ayrılmasında kullanılabileceği sonucuna varmışlardır. Bu çalışmada SDS-PAGE tekniği ile at, domuz, koyun, tavuk, sığır etlerini belirli oranlarda (0/100, 5/95, 25/75, 50/50, 75/25, 95/5, 100/0)

karıştırarak elde ettiğimiz örnekler üzerinde yaptığımız ayırma işleminde elde edilen sonuçlar, Kato ve Deki'nin bulduğu sonuçlara benzerlik göstermektedir. Giovanni (6) SDS-PAGE tekniği yardımıyla, Helix pomatia ve Achatina fulica türlerine ait salyangozları, molekül ağırlıkları farklı olan proteinlerine göre birbirinden ayırarak, Helix türü salyangoz, molekül ağırlıkları 16.000 ve 18.000 dalton olan iki protein bandı verirken, Achatina ise sadece molekül ağırlığı 18.000 dalton olan bir protein bandı oluşturmuştur. At, domuz, koyun, tavuk, sığır etlerini belirli oranlarda karıştırarak yaptığımız ayırma işleminde elde ettiğimiz sonuçlarla, Giovanni'nin (6) bulduğu sonuçlar birbirleri ile uyum halindedir. Bonnefoi ve ark. (3), konserve halinde saklanan ve belli oranlarda karıştırılmış bulunan ördek ve kaz karaciğerlerini SDS-PAGE tekniği ile ayırmışlar ve bunların % 10 oranına kadar olan karışımlarının tefrik edilebileceğini bildirmişlerdir. An ve ark.(2), SDS-PAGE tekniği ile çeşitli protein ekstraksiyon sistemleri kullanarak hem çiğ hem de pişmiş Penaeus duorarum ile Penaeus setiferus isimli karides türlerini, proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayırmışlardır.

Hofmann ve Penny (9), SDS-PAGE tekniği ile sulu kas ekstraktlarını kullanarak et türlerini birbirinden ayırmışlardır. Zerifi ve ark. (33), SDS-PAGE metoduyla ısl işlem görmüş sığır, domuz, at, koyun, tavuk, hindi, ördek, kaz ve tavşan etlerini belirli oranlarda (5/95, 10/90, 25/75, 50/50) birbirleri ile karıştırarak elde ettikleri örnekleri inceledikleri araştırma sonucunda, türlere göre etleri % 10 oranına kadar ayırmanın mümkün olduğunu ortaya koymuşlardır. Kim ve Shelef (19) belirli oranlarda karıştırdıkları; (5/95, 25/75, 50/50, 75/25, 95/5) domuz, tavuk, hindi ve sığır etlerinden elde ettikleri sulu ekstraktları kullanarak bu türleri jellerde oluşan protein profilleri ile birbirinden ayırmışlardır.

Bu çalışmada tarafımızdan elde edilen bulgularla, Hofmann ve Penny (9), Bonnefoi ve ark (3), Kim ve Shelef (19), An ve ark.(2), Sibour ve ark. (29), Zerifi ve ark. (33)'nin sonuçları birbirlerini doğrulamaktadır.

Sonuç olarak; SDS-PAGE tekniğinin, etlerin hangi tür hayvana ait olduğunu veya et karışımlarında hangi türün yaklaşık ne oranda bulunduğunu tespitite, kullanılacak güvenilir bir metot olduğu anlaşılmaktadır. Ancak bu teknikle elden edilen elektroferogramlar değişik faktörler tarafından etkilendiğinden, bunların yorumlanıp değerlendirilmesinde büyük özen göstermek gerekir.

KAYNAKLAR

1-Ackermans MT, Beckers JL, Everaerts FM (1992): Determination of Sulphonamides in Pork Meat Extracts by Capillary Zone Electrophoresis. J. Chromatogr. 596 : 101-109.

2-An H, Marshall MR, Otwell WS, Wei CI (1988): Electrophoretic Identification of Raw and Cooked Shrimp Using Various Protein Extraction Systems. J. Food Sci. 53: 313-318.

3-Bonnefoi M, Bernard G, Labie C (1986): Gel Electrophoresis : A Qualitative Method for Detection of Duck and Goose Liver in Canned Foie Gras. J.Food Sci. 51 (5) : 1362-1363.

4-Chrumbach A, Rodbord D (1971): Estimation of Molecular Radius Free Mobility and Valence Using Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Anal.Biochem. 40: 95-134.

5-Coduri R J, Rand A G (1972): Vertical Plate Gel Electrophoresis for the Differentiation of Meat Species. J. Assoc. off. Anal. Chem. 461-466.

6-Giovanni PB (1988): Differentiation Between Helix and Achatina Snail Meat by Gel Electrophoresis. J.Food Sci. 53 (2): 652-653.

7-Heinert T, Thorson B (1980): Tictortspezifische Eiwei-Sdifferenzierung Protein und Enzymmuster Bei Reh (Capreolus capreolus) und Hirsch. (Cervus elephus). Fleischwirtsch. 60: 1682-1688.

8-Hitchcock CHS, Crimes AD (1985): Methodology for Meat Species Identification. Meat Sci. 15: 215-224.

9-Hofmann K, Penny I F (1973): Methode Zur Identifizierung und Quantitativen Bestimmung Von Fleisch-Und Fremdeiweus Mit Hufe Der Sds-Poly Acrylamid- Elektrophorese Aut Flachgelen. Fleischwirtsch. 20 : 252-257.

10-Hofmann K (1978): Charakterisierung Der Proteine in Muskeln Und Inneren Organen Von Rind Und Schwein Mithilfe Der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Kongreß, Bd. III,L. 2:3, Kulmbach.

11-Hofmann K (1985): Principle Problems in the Identification of Meat Species of Slaughter Animals Using Electrophoretic Methods. Biochemical Identification of Meat Species (Ed. R.L.S.Patterson) Elsevier App. Sci. Pub. London.

12-Hofmann K, Bluchel E (1991): Blut und Muskelforsbloss Trennung und Bestimmung Unter Anwendung Der SDS-Elektrophores. Fleischwirtsch. 71 (11) : 1290-1293.

13-Hofmann K (1987): Fundamental Problems in Identifying the Animal Species of Muscle Meat Using Electrophoretic Methods. Fleischwirtsch. 67:820-828.

14-Hour S (1985): Identification of Animal Species by Electrophoresis "Biochemical Identification of Meat Species" R. L. S. Patterson (Ed), Elsevier, Applied, Science, Publishers, Ltd., p. 32-36, England.

15-Höyem T, Thorson B (1970): Myoglobin Electrophoretic Patterns in Identification of Meat From Different Animal Species. J.Agr. Food Chem.18 : 737-742.

16-Hvass A (1985): Species Differentiation in Minced Meat Products by Immunodiffusion. "Biochemical Identification of Meat Species" R. L. S. Patterson (Ed) Elsevier Applied Science Publishers Ltd., p. 53-58, England.

17-Kamber U (1996): Et Türlerinin İdentifikasyonu. Vet.Hek. Der.Derg. 67 (1) : 34-40.

18-Kato T, Deki M (1977): Identification of Meat Species by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Kanzei chuo Bunsek.* 17: 17-21.

19-Kim H, Shelef LA (1986): Characterization and Identification of Raw Beef, Pork, Chicken, And Turkey Meats by Electrophoretic Patterns of Their Sarcoplasmic Proteins. *J. Food sci.* 51(3): 731-735.

20-Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein Measurement With Folin Henolreagent. *Biol. Chem.* 193- 256.

21-Marshall T, Williams K (1988): High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis and Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Cheese Proteins After Rapid Solubilisation. *Electrophoresis* 9 : 143-14.

22-McCormick RJ, Reeck GR Kroph DH (1988): Separation and Identification of Porcine Sarcoplasmic Proteins by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography and Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Agr. Food Chem.* 36: 1193-1198.

23-Oghshi K, Maruyama K, Yoshidomi H (1985): Changes in the Molecular Size of Connectin an Elastic Protein in Chicken Skeletal Muscle During Embryonic and Neonatal Development. *Biomed. Res.* 6 (4) : 207-213.

24-Parisi E, Agulari D (1985): Methods Differentiating Meats of Different Species of Animals. "Biochemical Identification of Meat Species" R.L.S. Patterson (Ed). Elsevier Applied Science Publishers Ltd., p. 40-49, England.

25-Rosario M, Juan I, Ascona E, Hernandez Bernabe S (1992): Immunoabsorptions-Chromatographie Teilweise Reinigung Der Löslichen Schweinespezifischen Muskelproteine. *Fleischwirtsch.* 72(6):916-917.

26-Ruggeberg H, Gaede W, Tschirdewahn B, Booke A, Müller M (1997): Ein Methodischer Vergleich Der PCR-Analyse Der DNA-Sonden-Echnik und Der Isoelektrischen Fokussierung. *Fleischwirtsch.* 77 (8): 732-734.

27-Scope RK, Penny IF (1971): Subunit Size of Muscle Proteins as Determined by Sodium Dodecylsulphate Gel Electrophoresis. *Biochem. Biophys. Acta.* 236: 409-415.

28-Sherikar AT, Khot JB, Javarao BM, Pilla SE (1988): Application of Polyacrylamide-Gel Isoelectric Focusing for Identification of Species of Origin of Raw and Heat Treated Meats. *Ind. J. Anim. Sci.* 58 (4): 470-486.

29-Sibour M, Giaccone, Parisi E (1988): Tierarbestimmung Anhand Der Proteinmuster Von LDH-Isoenzim. *Fleischwirtsch.* 68(3): 390-393.

30-Spell E (1974): Die Elektrophoretische Unterscheidung Verschiedener Fleischarten. *Fleischwirtsch.,* 3: 533-538.

31-Switzer RL, Clark JM (1977): Experimental Biochemistry. W.H. Freeman and Company, p. 49-51, New York.

32-Woadrow CM, Samy HA, Philips GS (1988): Liquid Chromatographic Identification of Meats. *J.A.O.C.* 71 (2): 349-403.

33-Zerifi A, Labie C, Benard G (1992): SDS-PAGE Technique for the Species Identification of Cooked Meat. *Fleischwirtschaft.* 1 : 54-59.