

## Sosislerdeki Etin Orijininin Belirlenmesinde Pseudoperoksidaz Boyama Tekniğinin Poliakrilamid Jel İzoelektrik Odaklama (PAGIF) Metodunda Kullanılması

Özge ÖZGEN ARUN, Muammer UĞUR

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

Geliş Tarihi: 16.11.1998

**Özet:** Bu çalışma, ısı işlemleri görmüş sosislerde kullanılan etin hangi hayvan türüne ait olduğunu belirlemek amacıyla yapıldı. Bunun için saf sığır eti ve saf at etinden yapılan sosisler ile bu etlerin belli oranlarda karıştırılmaları ile hazırlanan sosisler, 75°C'lik ısıda 15 dakika dumanlama fırınında pişirildi. Isı işlemleri görmüş bu sosislerden elde edilen ekstraktlardaki proteinlerin izoelektrik odaklama tekniği ile ayrımının yapılmasına çalışıldı. Bu teknik ile elde edilen jellerinin sadece myoglobin bantları Pseudoperoksidaz metodu ile boyandı. Bantların karşılaştırılmaları ile saf sığır ve at etinden hazırlanan sosislerde tür tayini kolayca yapıldı. Aynı şekilde yüksek oranda at eti içeren karışım sosislerde, at ve sığır etine ait myoglobin bantlarının birlikte izlenmesi ile her iki hayvan türünü tespit etmek mümkün olabildi. Ancak, sığır eti içerisinde at oranı %20 ve altında olduğunda at etini tespit etmek mümkün olamadı.

**Anahtar Sözcükler:** Pseudoperoksidaz-izoelektrik odaklama-tür tayini-myoglobin

### Using The Pseudoperoxidase Staining Method in the Polyacrylamid Gel Isoelectric Focusing Technique For Determining the Origin of Meat in Sausages

**Abstract:** This study was carried out to determine the origin of the meat used in heat processed sausages. For this purpose, sausages prepared from pure beef and horse meat and sausages prepared with different mixture rates of these meats, were cooked in a smoking oven at 75°C for 15 minutes. Proteins of extracts from these heat-processed sausages were separated by the isoelectric focusing technique. Only myoglobin bands of these gels prepared by this technique, were stained by the pseudoperoxidase staining method. Species differentiation was easily performed with sausages made from pure beef and horsemeat. Similarly determination of these two species in mixed sausages containing high rates of horse meat was possible by observation of bands from beef and horsemeat together. However, determining the horsemeat was not possible with sausages in which the horse meat rate in beef was 20% or below.

**Key Words:** Pseudoperoxidase-isoelectric focusing-species differentiation-myoglobin

### Giriş

Tolum 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 geliştirmişlerdir. Bu metotlar morfolojik, elektroforetik, immünolojik ve serolojik, metotlar olarak sınıflandırılmaktadır (1, 2, 3, 4, 5). Bunlar arasında elektroforetik metotlar, ısı işlemleri görmüş ürünlerde kullanılabilmeleri ve duyarlı olmaları nedeni ile yaygın olarak uygulanmaktadır. Hofmann (6), çalışmasında hayvan türü tespitinde çok sıklıkla kullanılan elektroforetik metotları, elektroforez, SDS-elektroforezi ve izoelektrik odaklama olmak üzere üç grupta açıklamıştır. Bu metotlardan izoelektrik odaklama hayvan türü tayini için ilk kez Tingbergen ve Olsman (7)

tarafından, 1976 yılında uygulanmıştır. İzoelektrik odaklama metodunda, pH'nın anottan katoda doğru düzenli bir şekilde arttığı destek ortamlar kullanılarak proteinlerin izoelektrik noktalarına göre ayrımı yapılmaktadır (7). Bu metot bir çok araştırmacı tarafından, hayvan türü tayininde başarılı bir şekilde uygulanmıştır (8, 9, 10, 11). 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 boyaların (12, 13, 14, 15) yanında, düşük orandaki proteinler için gümüş boyama metodu önerilmektedir (10, 11). Bunun dışında, bazı özel proteinlerin yada enzimlerin boyanması ile de hayvan türünün belirlenmesi mümkün olabilmektedir (16, 17, 18). Bunlardan biri olan pseudoperoksidaz boyama metodu ile sadece myoglobinlerin boyanması

hedeflenmektedir. Bu metot, myoglobin hidrogen peroksidi katalitik olarak dekompozite etmesi (pseudoperoksidaz etkisi) ve bir substrat varlığında (örneğin o-diansidin) jelde myoglobinlerin bulunduğu bantta koyu renkli bir pigment oluşumu esasına dayanır (9). Hofmann ve Blüchel (16), çalışmalarında 24 farklı hayvan türüne ait çiğ etlerin ayrımını, pseudoperoksidaz boyama metodunu uyguladıkları, izoelektrik odaklama jellerindeki myoglobin bantlarının karşılaştırılmasına göre yapmışlardır. Benzer bir çalışmada, metot bu kez, ısı işlemi görmüş etler için kullanılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (19). Bu çalışmada, saf at ve sığır etinden hazırlanan sosislerle, at ve sığır etinin değişik oranlarda karışımları ile hazırlanan sosislerde, pseudoperoksidaz boyama tekniği uygulanarak, myoglobin bantlarının karşılaştırılması ile hayvan türünün tespit edilebilirliğinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

## Materyal ve Metot

### Materyal

At etinin %20'den %50'ye kadar değişen oranlarda sığır etine karıştırılması ile hazırlanan deneme grubu sosisler ile saf sığır ve saf at etinden yapılan kontrol grubu sosisler materyal olarak kullanıldı.

A grubu: %20 at eti %80 sığır eti    B grubu: %30 at eti %70 sığır eti  
C grubu: %40 at eti %60 sığır eti    D grubu: %50 at eti %50 sığır eti  
Kontrol grubu (K1): %100 at eti Kontrol grubu (K2): %100 sığır eti

### Deneyel Sosis Üretimi

Deneyel gruplarda açıklanan şekilde at ve sığır eti karışımına, yağ, tuz, nişasta, nitrit, fosfat, baharatlar ve buz katıldı. Bu karışım kutterde hamur haline getirildikten sonra kılıflara doldurulup, 75°C de 15 dakika süre ile fırında dumanlama işlemi uygulandı (20).

### Ekstraktların Elde Edilmesi

Deneyel sosisler blenderde kıyma haline getirildi. Daha sonra bu kıyılmış sosislerden yaklaşık 12 g. tartılıp, eşit miktarda distile su ile karıştırıldı ve 37°C de yaklaşık 1 saat bekletildi. Bu karışımlar, 3000 devir/dak. da 2 dak. santrifüje edildi ve Whatmann no.3 filtresinden süzülürdü (21). Miyojen proteinleri içeren bu süzüntüler ekstraksiyon sıvısı olarak kullanıldı. Ekstraksiyon sıvıları, vidalı kapaklı plastik tüplere konup, -18°C de saklandı. Ekstraktların protein varlığı Lowry (22)'nin bildirdiği metoda göre belirlendi. Ekstraktlar protein konsantrasyonları 2 mg./ml olacak şekilde sulandırıldı.

### İzoelektrik odaklama

%10 T ve %3.5 C poliakrilamid jeller pH 3.5-10 ölçekli taşıyıcı amfolitler kullanılarak hazırlandı. Elektroferez işlemi 1500 V ve 50 mA'lık akım uygulanarak ve 7°C lik soğutma altında uygulandı. Elektroferez işlemi üçer kez tekrar edildi.

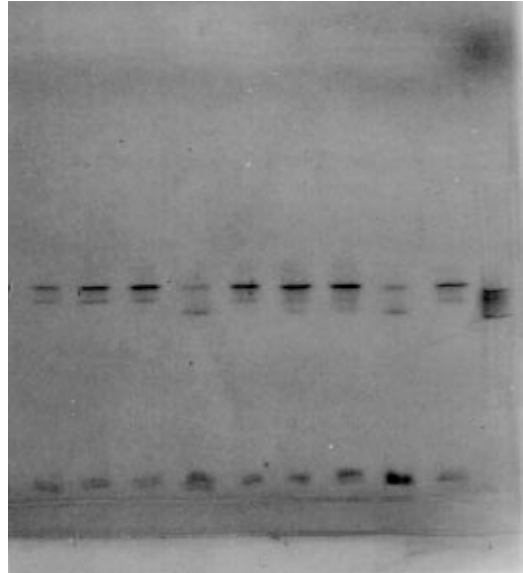
### Boyama işlemi

Bauer ve Hofmann'ın (19) önerdikleri boyama işlemine göre yapıldı. Boya çözeltisi için, 0.1 g. o-diansidin 30 ml. etanolde çözülüp, üzerine 70 ml. 0.1 M. sitrat/0.2 M fosfat tampon çözeltisi (pH 5.0) ve kullanılmadan hemen önce 2 ml. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenmesi ile hazırlandı. Boyama işlemi myoglobin bantları kahverengi kırmızı renk alana kadar yavaşça çalkalamak sureti yapıldı.

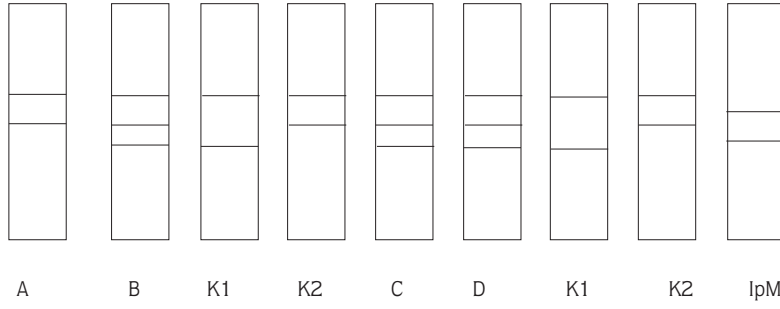
### Bulgular

Çeşitli oranlarda at ve sığır etinin karışımları ile hazırlanan sosislere ait elektroforegramlar şekil-1 ve bunların şematik modelleri şekil-2'de verilmiştir.

Sığır eti elektroforegramında myoglobin bantı yaklaşık yarım cm. mesafe ile meydana gelen iki banttandır oluşurken, at etinin myoglobin bantının bir cm. aralıklı iki banttandır meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 1, Şekil 2).



Şekil 1. At ve sığır etinin değişik oranlardaki karışımlarından hazırlanan sosislere ait elektroforegramların şeması



Şekil 2. At ve siğir etinin değişik oranlardaki karışımlarından hazırlanan sosislere ait elektroforegramların şeması (A: %20 at %80 siğir, B: %30 at %70 siğir, C: %40 at %60 siğir, D: %50 at %50 siğir etlerinin karışımı olmak üzere dört ayrı deneme sosis örneği ve Kontrol ( $K_1$ ): %100 at eti ile Kontrol ( $K_2$ ): %100 siğir, IpM izoelektrik marker)

At eti oranının %50 olduğu D grubu ve %40 olduğu C grubu karışımlarda siğir etinin katoda yakın olan ikinci bantı saf siğir etinde olduğu gibi, yine aynı yerde, atın ikinci bantı ise, siğir sosisinin ikinci bantının anot yönüne doğru biraz aşağısında meydana geldiği saptanmıştır. Böylece karışımlarda myoglobin bantının, üç banttan oluştuğu izlenmiştir.

At etinin %30'a düştüğü karışımlarda attan gelen üçüncü bant ise oldukça soluk olup, bazı jellerde hiç saptanamamıştır. Bu oranların altında (%20) at eti içeren karışımlarda, at eti oranının azalmasına bağlı olarak üçüncü bantın tamamen gözden kaybolduğu belirlenmiştir.

### Tartışma ve Sonuç

Tüketime sunulan çiğ etlerin, hangi hayvan türüne ait olduğunu morfolojik ve immünolojik yöntemlerle ayırt etmek mümkün olmaktadır (2, 4, 23, 24). Salam, sosis ve kavurma gibi ısı işlemi görmüş et ürünlerinde etin orijini tespit etmede bu metotlar yetersiz bulunmaktadır (4, 25, 26). Isı işlemi görmüş et ürünlerinde izoelektrik odaklama yöntemi başarılı bir şekilde kullanılmıştır (7, 11, 18).

Çalışmamızda bu yöntemden faydalanarak, at ve siğir etinin karışımlarından elde edilen ısı işlemi görmüş sosislere şekil 1'de görüldüğü gibi, at ve siğir etini ikincil myoglobin bantlarının farklı mobilite göstermeleri ile ayırt etmek mümkün olmaktadır. Nitekim Hofmann (27), çalışmasında çok sayıda, farklı hayvan türüne ait çiğ et örneğini myoglobin bantlarındaki farklılıklardan yararlanarak ayırt edebildiğini bildirmiştir. Benzer bulgular, karışım olarak hazırlanan deneme sosileri içinde elde edilmiş ve %50 ve 40 at eti içeren siğir sosilerinde, at ve siğir etine ait, farklı mobilitedeki ikincil myoglobin bantlarının peş peşe meydana gelmesi, bu sosilerde, bu iki hayvan etinin varlığını belirtmiştir (Şekil 1, Şekil 2). Çalışmamızın bulguları bir çok araştırmacının bulguları ile benzerlik göstermiştir (16, 17, 25, 28).

Bir çok araştırmacı, elektroforetik işlemlerde yapılan tekrarlar, bazı küçük farklılıkların oluşabileceği bildirmiştir (25, 29, 30). Abrams ve ark. (8) balık türlerine ait elektroforegramların şemalarını hazırlanıp, standart olarak daha sonraki analizlerde kullanılabileceğini bildirmesine rağmen, Hofmann (25), izoelektrik odaklama jellerinin tekrarları arasındaki farklılıklardan söz etmiş ve bu tip standart kılavuzlarının kullanılmasının uygun olmadığına işaret etmiştir. Araştırmacı bu çalışmada, incelenen örneğin standartlarla aynı jel üzerinde, paralel olarak uygulanması ile bu problemin çözülebileceğini vurgulamıştır. Diğer bazı araştırmacılar, benzer uygulamalar ile probleme çözüm önermektedirler (29, 30, 31). Buna karşın, Hofmann ve Blüchel (16) çalışmalarında incelenen hayvan etlerinin, myoglobin bantlarının izoelektrik noktalarının bir "myoglobin atlası" kaydedilmesi ile, farklı hayvan türlerinin tespitini yapılabileceğini bildirmiştir. Nitekim çalışmamızda yapılan tekrarlar, boyanan myoglobin bantlarında bir fark bulunamamıştır. Bunun yanında, tüm proteinlerin boyandığı boyama metotlarında boyanan çok sayıda bantın teşhisi oldukça karmaşık bir hale gelmektedir. Oysaki, myoglobin bantlarına göre ayırma teşhis daha kolay olduğundan, zaman ve iş gücünden tasarruf edilecektir.

Örneklere uygulanan farklı ısı derecelerinin proteinlerin sayı ve yoğunluklarına farklı etki etmesi (32), tür tespitini güçleştirmektedir. Nitekim ısının tavuk göğüs ve but etleri üzerine etkilerini SDS-PAGE tekniğini kullanarak inceleyen Crespo ve Ockerman (33), çalışmalarında, ısının artışına paralel olarak protein bantlarının gerek sayısında, gerekse yoğunluğunda önemli bir düşüş olduğu tespit etmiştir. Benzer olarak, Yowell ve Flurkey'e (34) göre, balık etlerinin mikrodalga fırında ısıtılması ile, balık proteinlerinin yaklaşık olarak %76'sı ortadan kaybolmaktadır. AbdAllah ve ark. (35) ile Kotula ve Rough (36) da çalışmalarında, ısının siğir eti proteinleri üzerine önemli etkileri olduğundan söz etmişlerdir. Ancak myoglobin bantlarının boyanması ile yapılan bir tanı, bu

durumu ortadan kaldırmaktadır. Yapılan bir çalışma, ısı işlemi görmüş ürünlere ait elektroforegramlarda, ısının artışına paralel olarak, protein bantlarının yoğunluğunun azaldığını, ancak pozisyonlarının değişmediğini göstermiştir (19). Bu durum, standartlar ile incelenecek örnekler üzerine uygulanan ısı dereceleri arasındaki farkların etkilerini saf dışı bırakmaktadır. Bunun yanında myoglobinin ısıya oldukça dayanıklı bir protein olması bu metodun belli bir dereceye kadar ısı işlemi görmüş ürünlere uygulanabileceğini göstermiştir (13, 19).

Hofmann ve Bauer (13) çalışmalarında pseudoperoksidaz boyama metodu ile boyanan elektroforez jellerinin ancak, yüksek oranda myoglobin içeren türler için (at, sığır gibi) kullanılabilirliğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda izoelektrik odaklama metodu ile ayrımı yapılan jellerin pseudoperoksidaz boyama tekniği ile boyaması sonrasında, domuz etlerinden üretilen sosislerin Ekstraktlarına ait elektroforegramlarda hiç bir bantın tespit edilmemesi domuz etindeki myoglobin miktarının düşüklüğüne bağlanmıştır. Nitekim, Hofmann ve Blüchel çalışmalarında

(37), domuz etinin myoglobin içeriğinin, sığır etininin 1/4'ü oranında olduğu tespit etmiştir. Buna bağlı olarak domuz etinin sığır eti ile karıştırılması ile hazırlanan deneme sosislerinde yalnızca sığır etinin myoglobin bantları gözlenmiştir.

Çalışmamızın sonucunda, pseudoperoksidaz metodu ile boyanan jellerde myoglobin bantlarının karşılaştırılması ile at ve sığır etinin tespit edilebileceği, yine at eti oranının %50 ve 40 olduğu karışımlarda da at eti varlığını belirlemenin mümkün olduğunu, at eti oranının %30'a düştüğü karışımlarda at etine ait ikinci myoglobin bantının ancak, bazı jellerde ve çok silik olarak meydana geldiği, bunun altında at eti içeren karışımlarda ve domuz eti gibi myoglobin miktarının düşük olduğu açık renkli etlerde ise bu boyama metodu ile sonuca varmanın güvenilir olamayacağı belirlenmiştir. Ayrıca bu metotla tip tayinin, laboratuvar koşullarında hazırlanan bir atlas yardımı ile yapılabilecek, böylece standard olarak kullanılacak hayvan etinin laboratuvarında bulundurma zorunluluğuna da olmayacaktır.

## Kaynaklar

1. Aages, H.: Species differentiation in minced meat products by immunodiffusion. Alındı: Biochemical Identification of Meat Species Ed. R.L.S. Patterson Elsevier App. Sci. Pub. 1985; London.
2. Ereçin, Z., Hassa, O.: Evcil memelilerde kilların morfolojik özellikleri ve bu yolla teşhis imkanları. Vet. Hek. Der. Derg. 1952; (72-73): 253-279
3. Hofmann, K., Fischer, K., Müller, E., Kemper, V.: Experiments to demonstrate the effectiveness of heat treatments applied to canned meat and meat-bone-meat meals. Fleischwirts. Int. 1996; (3): 32-37.
4. Hvass, A.: Species identification in minced meat products by immunodiffusion. In: Biochemical Identification of Meat Species (Ed. R.L.S. Patterson) Elsevier App. Sci. Pub. 1985; London.
5. Patterson, R.M., Spencer, T.L.: Differentiation of raw meat from phylogenetically related species by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Meat Sci., 1985; (15): 119-123.
6. Hofmann, K.: Principle problems in the identification of meat species of slaughter animals using electrophoretic methods. Alındı: Biochemical Identification of Meat Species (Ed. R.L.S. Patterson) Elsevier App. Sci. Pub., 1985; London.
7. Tingbergen, B.J., Olsman, W.J.: Isoelectric focusing as a species identification technique in the inspection of food products. Fleischwirts. 1976; (10): 1501-1504.
8. Abrams, R., Hoof, J. van: Fish species identification by isoelectric focusing. Fleischwirts. 1983; 63 (9): 1459-1462.
9. Bauer, F., Hofmann, K.: Improving the sensitivity of electrophoretic determination of animal by means of peroxidase staining of myoglobins. Fleischwirts. 1987; 62 (7): 861-867.
10. Bauer, F., Hofmann, K.: Sensitive electrophoretic determination of pork in heated pork/beef mixtures. Fleischwirts. 1987; 67 (9): 1141-1144.
11. Hofmann, K., Bauer, F.: Improved sensitivity of electrophoretic identification of the species of origin of meat, by peroxidase staining and silver staining. Application to meat blends and heated samples. Mitteilungsblatt der Bundensntalt fuer Fleischforschung 1987; (95): 7298-7301.
12. Babiker, S.A., Glover, P.A., Lawrie, and R.A.: Electrophoretic determination of horsemeat in heated foodstuff. Meat Sci. 1981; (5): 473-477.
13. Hofmann, K., Bauer, F.: Electrophoretic identification of animal species in heat-treated meat and meat products. Fleischwirts. 1989; 69 (3): 419-422.
14. Hormi, O., Skräkki, A.: Composition of minced meat part A: methods. Meat Sci. 1994; 38: 497-501.
15. Lee, Y.B., Rickansrud, D.A., Hayberg, E.C.: Quantitative determination of soybean in fresh and cooked meat-soy blend J. Food Sci., 1975; (40): 380-383.

16. Hofmann, K. Bluechel, E.: Determining the animal species of raw muscle meat from the myoglobin pattern in pH-gradient gel. *Fleischwirts.* 1986; 66 (5): 916-921.
17. Hofmann, K., Bluechel, E., Hofmann, B.: Documentation of an authentic case: alduration of beef goulash with pork. *Flescherie.* 1991; 42 (9): 643-644.
18. King, N.L.: Species identification of cooked meats by enzyme staining of isoelectric focusing gels. *Meat Sci.* 1984; 11: 59-72.
19. Bauer, F., Hofmann, K.: Application of the "myoglobin method" for the identification of meat species in the heated materials. *Proceed. of the Europ. Meeting of meat research workers* 1987; 33 (II): 364-367.
20. Yıldırım, Y.: *Et Teknolojisi.* Yıldırım Yayınevi. 1987; Ankara.
21. Sherikar, A.T., Khot, J.B., Jayora, B.M., Pillai, S.R.: Application of polyacrylamid-gel-isoelectric focusing for identification of species of origin of raw and heat-treated meats. *J. Ani. Sci.* 1988; 58 (4): 470-486.
22. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with folin phenolreagent. *Biol. Chem.* 1951; 193-256.
23. Demirer, M.A.: *Koyun, Keçi Etlerinin Presipitasyon Metodu ile Ayırk Edilmesi Üzerine Araştırmalar* A.Ü. Vet. Fak. Yayınları Sevinç Matbaası, 1964; Ankara.
24. Warnecke, M.O., Suffle, R.L.: Serological identification of animal proteins 1. Mode of infection and protein extracts for antibody production *J. Food Sci.*, 1986; (33): 131-135.
25. Hofmann, K.: Fundamental problems in identifying the animal species of muscle meat using electrophoretic methods, *Fleischwirts.* 1986; 66 (1): 91-98.
26. Patterson R.L.S., Jones, S.J.: Species identification of meat in raw unheated meat products. Alindi: Morris B.D. ve Clifford, M.N. (ed) *Immuno Assay in Food Analysis.* Elsevier App. Sci. Pub. 1985; London.
27. Hofmann, K.: Meat species identification of raw muscles by isoelectric focusing of the myoglobins. *Proceed. Europ. Meat Res. Work.* 1986; 32 (II): 425-428.
28. Höyem, T. Thomson, B.: Myoglobin electrophoretic patterns in identification of meat from different animal species. *J. Agr. Food Chem.* 1970; 18 (4): 737-739.
29. İmre, S., Bilgiç, Z.: Besin analizlerinde elektroforetik orijin tayini II. İnek, koyun ve keçi sütlerinin poliakrilamid jil disk elektroforezi ile teşhis ve tayini. *Doğa TU tıp ve Ecz. D.* 1986; 10 (13): 282-287.
30. Çimen, F.: Ülkemizde Tüketilen Bazı Balıklarda Poliakrilamid Jel Disk Elektroforezi ile Yapılan Cins Tayini Çalışmaları. Doktora tesi 1989; I.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü: İstanbul.
31. Bauer, F., Kelner, A.: Composition of different techniques and staining methods for meat species identification. *Proceed. Int. Cong. Meat Sci. and Tech.* 1989; 34 (II): 521-528.
32. Lee, Y.B., Rickansrud, D.A., Hagberg, E.C., Briskeley, E.J.: Application of SDS-Acrylamid gel electrophoresis for determination of the maximum temperature to which bovine muscles have been cooked. *J. Food Sci.* 1974; (39): 428-429.
33. Crespo, F.L., Ockerman, H.W.: SDS-electrophoresis pattern alteration of myoglobin of myofibriller proteins after heating of avian leg and breast muscle. *J. Food Protect.* 1977; 40 (4): 261-264.
34. Yowell, K., Flurkey, W.H.: Effect of freezing and microwave heating on proteins from codfish fillets: analysis by SDS-polyacrylamid gel. *J. Food Sci.* 1986; 51 (2): 508-509.
35. AbdAllah, M.A., Foda, Y.H., El-Pashlouty, S., Nabilah, Y.A., El. Sonafry, Ebusalem, M.F.: Detection of soybean in soy-based meat substitutes. *Nahrung* 1986; 30 (5): 549-558.
36. Kotula, A.W., Raugh, D.K.: Influence of added soy protein electrophoretic patterns of the water-soluble proteins of cooked beef patties. *J. Food Sci.* 1977; 42 (3): 731-734.
37. Hofmann, K., Bluechel, E.: Separation and determination of blood and muscle pigments in meat. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt fuer Fleischforschung Kulmbach* 1992; 31 (116): 230-234.