

# Tehéntej meghatározása hazai sajtokban izoelektromos fókuszálással

*Szerdahelyi Emőke, Hajós Gyöngyi és Molnár Pál*

Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet, Budapest

Érkezett :1994. október 31.

A tehéntej-kazein meghatározásával a juhtejnek a tehéntejjel való helyettesítése kimutatható a juhsajtban. Ennek a fogyasztók érdekvédelmén és az élelmiszerminőség biztosításán túl, nagy jelentősége lehet az egészségmegőrző táplálkozásban, például egyes speciális diéták esetén is.

Az elektroforetikus módszerek jól alkalmazhatók az állatfajok azonosítására hús- és tejfehérjékből egyaránt (1, 2). Az izoelektromos fókuszálást nagy felbontóképessége nem csak a fajok azonosítására, hanem ezek keverékeinek vizsgálatára is alkalmassá teszi (3, 4).

Krause és munkatársai a poliakrilamid-gélben való izoelektromos fókuszálást találták a legmegfelelőbbnek a tehéntej kimutatására juh-, illetve kecskesajtban (5). Az általunk is alkalmazott meghatározás alapja a juhtejben lévő  $\gamma_2$ -kazein kimutatása, amelynek izoelektromos pontja kissé magasabb, mint a tehéntej  $\gamma_2$ -kazeinje. A módszer érzékenységet jelentősen növeli a plazmin használata, mivel elhidrolizálja az egyébként zavaró  $\beta$ -kazeint (6), így lehetővé teszi a tehéntej-kazein specifikus és érzékeny detektálását.

Munkánk célja az volt, hogy a tehéntejet kimutassuk és mennyiségileg meghatározzuk juh- és tehéntej keverékekből, valamint hazai sajtokból. Vizsgálatainkat kisebb módosításokkal, illetve továbbfejlesztéssel egy EU-szabvány (7) előírásai alapján végeztük.

## **Anyagok és módszerek**

### **Vizsgálati anyag**

Hazai kereskedelemben forgalmazott tehéntej, juhtej és sajt, valamint ismeretlen összetételű keverék sajtminták.

### **A kazein izolálása**

10 g felaprított sajtot egy 100 ml-es centrifugacsőbe mértünk és 60 ml desztillált vizet adtunk hozzá. ULTRA-TURRAX-al 10000-es fordulaton 1,5 percig homogenizáltuk. Jégecettel 4,5-re állítottuk az oldat pH-ját és 3000 g-n 5 percig centrifugáltuk. A zsírt és a savót eltávolítottuk és a

maradékhoz 20 ml diklór-metánt adtunk, újra homogenizáltuk, majd centrifugáltuk. Óvatosan eltávolítottuk a vizes és a szerves fázist, és a megmaradt kazeint 40 ml desztillált víz és 20 ml diklór-metán hozzáadása után ismételten homogenizáltuk. A vizes és a szerves fázist azután eltávolítottuk, és az eljárást még kétszer megismételtük. A megmaradt fehérjét 50 ml száraz acetonnal jól elkevertük és redős szűrőn leszűrtük. A szűrőpapíron maradt kazeint kétszer átmostuk 25-25 ml száraz acetonnal. Ezután a kazein-kivonatot levegőn megszáritottuk.

### **A $\beta$ -kazein plazminos bontása**

2,5 mg izolált kazeint 50  $\mu$ l ammónium-karbonát pufferben oldottunk fel és 3 percig homogenizáltuk ultrahangos homogenizáló berendezéssel. Hozzáadtunk 10  $\mu$ l plazmin-oldatot (Bovine plasmin /E. C. 3.4.21, 7/ 5U/ml, ammónium-karbonát pufferben oldva) és folyamatos rázatás közben 40 °C-on 1 órán keresztül inkubáltuk. Az enzimes reakciót 2  $\mu$ l  $\epsilon$ -amino-kapronsav oldat (2,63 g  $\epsilon$ -amino-kapronsav 100 ml 40%-os etilalkoholban oldva) hozzáadásával állítottuk le, majd liofilizáltuk. Az ammónium-karbonát puffer összetétele: 1,58 g ammónium-hidrogén-karbonát / 100 ml desztillált víz, pH=8.

### **Akrilamid gél készítése**

A gél-oldatot (485 mg akrilamid, 15 mg N,N'-metilén-bisz-akrilamid, 4,4 g karbamid, 1,2 g 87 %-os glicerol 10 ml-re feltöltve desztillált vízzel + 26 mg  $\beta$ -alanin, 550  $\mu$ l Servalyt pH 3-10, 550  $\mu$ l Servalyt pH 5-7, 11  $\mu$ l 40 %-os ammónium-perszulfát oldat, 11  $\mu$ l N,N,N',N'-tetrametilén-diamin) két, egymástól 0,5 mm távolságra lévő üveglap közé öntöttük és egy éjszakán át hűtőszekrényben állni hagytuk.

### **Mintafelvétel:**

A liofilizált mintákat 50-50  $\mu$ l mintaoldó pufferben (5,7 g 87%-os glicerol, 24 g karbamid, 250mg dithio-threitol 50 ml desztillált vízben) vettük fel, és 10 x 5 mm-es szűrőpapír csíkok segítségével 10-10  $\mu$ l-t vittünk fel a géltre.

### **Izoelektromos fókuszálás**

Az izoelektromos fókuszálást Pharmacia FBE-3000 típusú készüléken végeztük. Anód oldatként 5%-os foszforsav oldatot, katódként pedig 2%-os NaOH-ot használtunk.

Az izoelektromos fókuszálás kondíciói:

Lépés	Idő (perc)	Feszültség (V)	Áramerősség (mA)	Teljesítmény (W)	Hőmérséklet (°C)
1	60	max. 2500	max. 15	konst. 4	10
2	60	max. 2500	konst. 5	max. 20	10

## Festés

A fókuszálás befejezése után a fehérjéket fixáltuk, 15 percig 15%-os triklór-ecetsavban rázatva. Ezután a gélt 15 percig a festékoldatban (1,5 g Coomassie Brilliant Blue, 2,5 g réz-szulfát-pentahidrát 1000 ml oldószerben) ráztuk. A festékoldó összetétele: 45% metanol és 10% ecetsav 45% desztillált víz. Végül mosóoldattal (250 ml metanol 100 ml jégecet 1000 ml vízben) többször átöblítettük, mindaddig amíg a háttér színtelenné vált.

## Értékelés

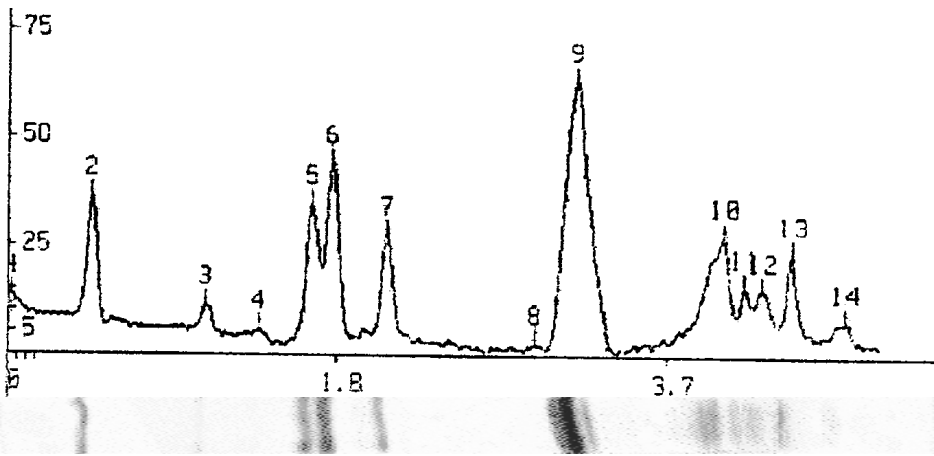
Az értékelést BIOTEC-FISCHER videodenzitométerrel végeztük.

## Eredmények és következtetések

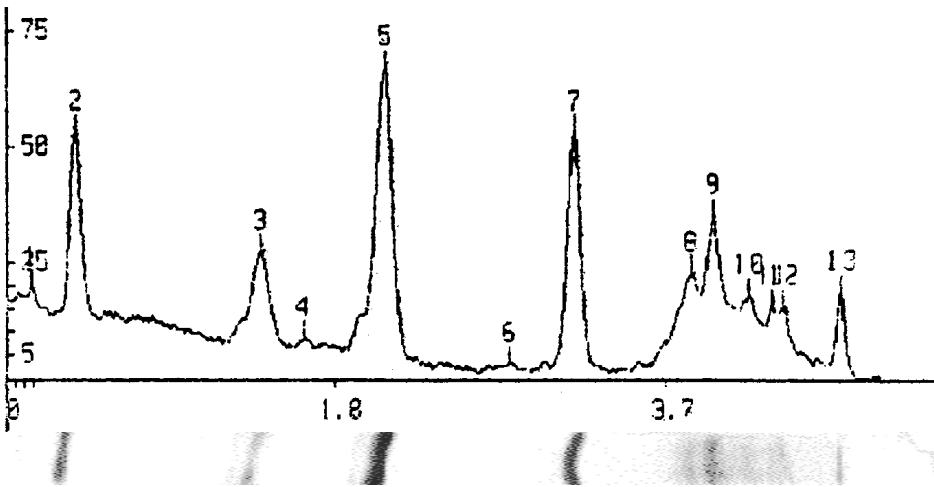
A kalibrációs egyenest ismert összetételű tejkeverékek és sajtok segítségével vettük fel. A tejmintákat előzőleg borjúgyomoroltóval kezeltük, hogy a fehérjeszerkezet megközelítőleg azonos legyen a sajtéval. Az 1. és 2. ábrán a tehéntej és a juhtej jellegzetes fehérjemintázatát és az ezekhez tartozó denzitogramokat mutatjuk be. Szorosabb korrelációt kaptunk, ha nem a tehéntej mennyisége és a tehéntejre jellemző  $\gamma_2$ -kazein csúcsterülete közötti, hanem a tehéntej juhtej arány és a tehén  $\gamma_2$ -kazein csúcsterülete és a juh  $\gamma_2$ -kazein csúcsterületének aránya közötti összefüggést vizsgáltuk (3.ábra).

Néhány sajt minta izoelektromos fókuszálással szeparált fehérjesávjait a 4. ábrán mutatjuk be. Az ismeretlen összetételű sajtok esetén a következő csúcsterület arányokat, illetve tehéntej arányt kaptuk:

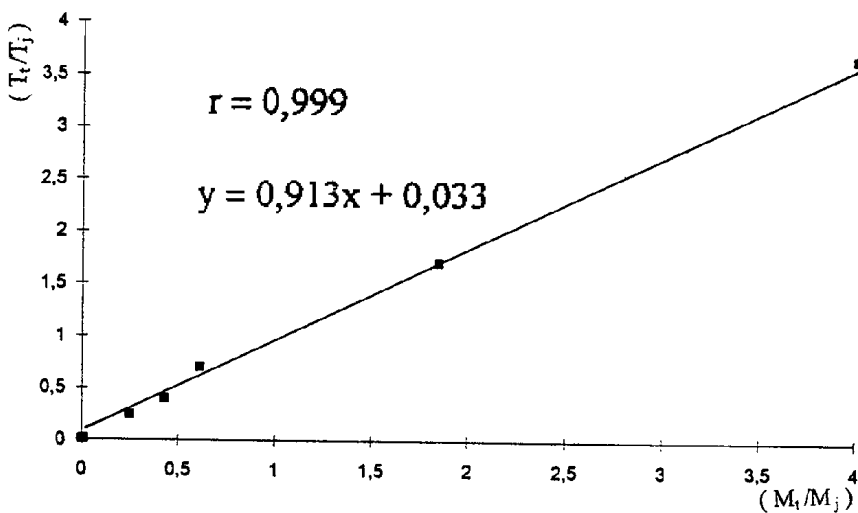
- 2. jelű mintánál tehéntej és a juhtej aránya (a  $\gamma_2$ -kazein sávok csúcsterületarányai alapján) 1,13, tehát 53 % tehéntejet tartalmaz (n = 5; s = 2,53).
- 3. jelű minta esetén tehéntej és a juhtej aránya (a  $\gamma_2$ -kazein sávok csúcsterületarányai alapján) 1,34-nek adódott, így tehéntej tartalma 57 % (n = 5; s = 2,42).



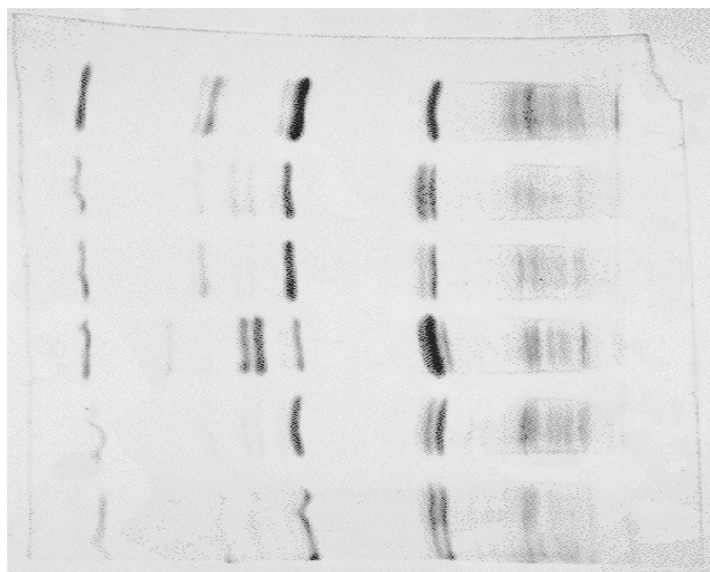
**1. ábra:** Tehéntejből izolált kazein fehérjemintázata izoelektromos fókuszálással való elválasztás után, és a videodenzitométeres értékelés



**2. ábra:** Juhtejből izolált kazein fehérjemintázata izoelektromos fókuszálással való elválasztás után, és a videodenzitométeres értékelés



**3. ábra:** A tehén és juhtej tömegarányának ( $M_t/M_j$ ) és a tehéntejre, illetve a juhtejre jellemző  $\gamma$ -kazein videodenzitométerrel meghatározott csúcsterület-arányának ( $T_t/T_j$ ) összefüggése



1: 100% juhtejből készült sajt

2: ismeretlen összetételű sajt

3: ismeretlen összetételű sajt

4: 100% tehéntejből készült sajt

5: 20% tehéntejet tartalmazó sajt

6: 38% tehéntejet tartalmazó sajt

**4. ábra:** Ismert és ismeretlen összetételű sajtminták fehérjéinek szeparálása izoelektromos fókuszálással

Összefoglalásul megállapíthatjuk, hogy a plazminos emésztést követő izoelektromos fókuszálás alkalmas a tehéntej specifikus és érzékeny kimutatására kevert tej, illetve kevert tejből készült tejtermékek esetében is. Az alkalmazott eljárás — a videodenzitométeres értékeléssel együtt — a tehéntej mennyiségi meghatározására szintén jól használható.

## IRODALOM

1. Hajós Gy. : Elektroforézis és alkalmazása az élelmiszerfehérjék elválasztásában. *Élelmiszervizsg. Közl.* **39** (1993) 1, 6-25
2. Kaiser K.-P., Matheis G., Kmita-Dürmann C., Belitz H.-D. : Identifizierung der Tierart bei Fleisch, Fisch und abgeleiteten Produkten durch Proteindifferenzierung mit elektrophoretischen Methoden. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **170** (1980), 334-342
3. Kaiser K.-P., Krause I. : Analytik von Proteinen in Lebensmitteln mit elektrophoretischen und chromatographischen Verfahren. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **180** (1985), 181-201
4. Bauer F., Hofmann K. : Empfindlicher elektrophoretischer Nachweis von Schweinefleisch in erhitzten Rindfleisch/Schweinefleisch-Mischungen. *Fleischwirtsch.* **67** (1987) 9, 1141-1144
5. Krause I., Belitz H.-D., Kaiser K.-P. : Nachweis von Kuhmich in Schaf- und Ziegenmich bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **174** (1982), 195-199
6. Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I., Krause I., Di Lccia A., Bocca A. : Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine cheese by gel isoelectric focusing of  $\gamma_2$ -caseins. *Milchwissenschaft* **45** (1990) 11, 708-710
7. Reference method for the detection of cow's milk kasein in cheeses made from ewe's milk - 392R0690 Official Journal L 074, 20/03/92 p. 0023 Commission Regulation (EEC) no 690/92

# **Tehéntej meghatározása hazai sajtokban izoelektromos fókuszálással**

*Szerdahelyi E., Hajós Gy. és Molnár P.*

A szerzők kimutatták és mennyiségileg meghatározták a tehéntejből származó kazein frakciót juh- és tehéntej keverékekből, valamint hazai sajtokból. A vizsgálatokat kisebb módosításokkal, illetve továbbfejlesztéssel egy EU-szabvány előírásai alapján végezték. A módszer lényege, hogy a sajtmintákból izolált kazeinből plazminos hidrolízis után a  $\gamma_2$ -kazein frakciót izoelektromos fókuszálással elválasztották és meghatározták. Az eljárás alkalmas a tehéntej specifikus és érzékeny kimutatására kevert tej, illetve kevert tejből készült tejtermékek esetében is. Az elektroforetikus elválasztási kép videodenzitométeres értékelése a tehéntej mennyiségi meghatározását szintén lehetővé teszi a vizsgált mintákban. Ennek — a fogyasztók érdekvédelmén és az élelmiszermínőség biztosításán túl — nagy jelentősége lehet az egészségmegőrző táplálkozásban, például egyes speciális diéták esetén is.

## **Determination of cow's milk in cheese samples by isoelectric focusing**

*Szerdahelyi, E., Hajós, Gy. and Molnár, P.*

Cow's casein fraction was identified and determined in samples of mixtures of ewe's and cow's milk and in cheese samples produced in Hungary. Investigations were carried out by slight modification of an EC-standard. The essence of this method is that the casein isolated from the milk and cheese samples was hydrolysed with plasmin and the  $\gamma_2$ -casein fraction from the hydrolysate was separated and identified by isoelectric focusing. The method is suitable for specific determination of for the cow's casein from samples of mixed milks and milk products. A quantitative determination of the  $\gamma_2$ -casein fractions is available by videodensitometric evaluation of the electrophoretic patterns. Knowledge of the cow's casein content of the samples is of great importance partly safeguarding of consumers' interests and assuring of food quality, partly in "care of health" food, for instance in the case of special diets.

## **Bestimmung von Kuhmilch in einheimischen Käsesorten mit isoelektrischer Fokussierung**

*Szerdahelyi, P., Hajós, Gy. und Molnár, P.*

Verfasser haben die aus der Kuhmilch stammende Kaseinfraktion in Schaf- und Kuhmilchmischungen sowie in einheimischen Käsesorten nachgewiesen und quantitativ bestimmt. Die Untersuchungen wurden anhand geringfügig modifizierter bzw. weiterentwickelter EU-Norm-Methode durchgeführt. Das Grundprinzip der Methode besteht darin, daß die  $\gamma_2$ -Kaseinfraktion von aus Käsesorten isoliertem Kasein nach einer Plasminhydrolyse mit isoelektrischer Fokussierung abgetrennt und bestimmt wird. Das Verfahren ist geeignet, die Kuhmilch in Milchmischungen bzw. in daraus hergestellten Milchprodukten mit hoher Spezifität und Empfindlichkeit nachzuweisen. Die videodensimetrische Auswertung des elektrophoretischen Trennungsbildes ermöglicht auch die quantitative Bestimmung der Kuhmilch in den untersuchten Proben. Diese Möglichkeit hat große Bedeutung über den Verbraucherschutz und die Sicherung der Lebensmittelqualität hinaus auch für die gesunde Ernährung beispielsweise im Falle einer speziellen Diät.