

Proteindifferenzierung mit elektrophoretischen Methoden bei Fleisch, Fisch und abgeleiteten Produkten

II. Qualitative und quantitative Analyse roher binärer Fleischmischungen durch isoelektrische Focussierung in Polyacrylamidgel*

Klaus-Peter Kaiser, Günter Matheis, Christine Kmita-Dürmann und Hans Dieter Belitz

Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München und Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Lichtenbergstraße 4, D-8046 Garching, Bundesrepublik Deutschland

Protein Differentiation with Electrophoretic Methods in Meat, Fish and Derived Products

II. Qualitative and Quantitative Analysis of Raw Binary Meat Mixtures by Means of Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel*

Summary. The identification of animal species in raw binary meat mixtures is possible by means of isoelectric focusing of the aqueous extracts. Densitometric evaluation of the protein pherograms makes possible the quantitative analysis of such mixtures down to a minimum level of 2-5% of one of the components. The method has some advantages as compared to immunochemical methods.

Zusammenfassung. Bei binären, rohen Fleischmischungen ist eine Erkennung der vorliegenden Tierarten durch isoelektrische Focussierung wäßriger Extrakte möglich. Die densitometrische Auswertung der Proteinpherogramme erlaubt eine quantitative Analyse solcher Mischungen bis herab zu einem Anteil von 2-5% an einer Komponente. Die Methode hat einige Vorteile gegenüber immunochemischen Methoden.

Die Analytik roher Fleischmischungen mit Hilfe elektrophoretischer Methoden wird seit 1965 betrieben [2-7]. Durch Polyacrylamidgelelektrophorese wurden bisher Mischungen aus Rind- und Walfleisch [3], Rind- und Pferdefleisch [4, 5] sowie Rind- und Schweinefleisch [3-6] untersucht. Über den Einsatz der isoelektrischen Focussierung in Polyacrylamidgel bei Fleisch- und Fischmischungen berichten Kirchhoff u. Rubach [7].

Bei der Auftrennung wäßriger Extrakte aus rohem Skelettmuskel von 34 Tierarten durch Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE), isoelektrische Focussierung

in Polyacrylamidgel (PAGIF) und in Agarosegel (AGIF) erhielten wir mit allen Methoden tierartspezifische Proteinpherogramme [1, 8]. Aufgrund ihres hohen Auflösungsvermögens sind die Focussiermethoden (PAGIF, AGIF) bei der Identifizierung von Warmblütern als die Methoden der Wahl anzusehen. Sie eignen sich auch besonders gut zur Beurteilung von Fleischmischungen.

Die vorliegende Arbeit berichtet über die qualitative und quantitative Analyse binärer Mischungen mit Hilfe der PAGIF.

Experimentelle Angaben

Chemikalien: Coomassie Brilliant Blue G 250 von Serva (17524). Alle anderen Chemikalien p. a. Substanzen von Merck.

Muskelfleisch folgender Tierarten: Rind (beef; *Bos taurus* L.), Schwein (pork; *Sus domesticus* L.), Hirsch (venison; *Cervus elaphus* L.), Reh (roe; *Capreolus capreolus* L.), Impala (impala; *Aepyceros melangus*), Springbock (springbok; *Antidorcas marsupialis*), Hähnchen (chicken; *Gallus domesticus* L.) Pute (turkey; *Meleagris gallopavo* L.). Das Hirschfleisch wurde freundlicherweise vom Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern zur Verfügung gestellt. Alle anderen Proben wurden im Handel gekauft.

Fleischextrakte: 5 g frisches oder gefrorenes Fleisch bzw. Fleischmischungen wie beschrieben [1] extrahieren.

Isoelektrische Focussierung in Polyacrylamidgel auf Fertigplatten (LKB Ampholine PAGplates pH 3,5-9,5 oder pH 5,5-8,5) wie beschrieben [1] durchzuführen. Abweichend von [1] Proteine ohne Vorfixierung wie folgt anfärben: 5-8 Std (qualitative Beurteilung) bzw. 1-2 Std (quantitative Beurteilung) mit Coomassie Brilliant Blue nach Blakesley u. Boezi [9].

Densitometrie bei 550 nm und einer Spaltbreite von 0,05 mm in einem Transmissions-Densitometer (Chromatogramm-Spektralphotometer KM3, Zeiss), verbunden mit einem Schreiber (Servogor 311, Metrawatt), durchzuführen. Gelplatte mit einem weißen Papier unterlegen. Densitogramm in der Mitte des Pherogramms mit einer Tischgeschwindigkeit von 10 mm/min und einer Schreibergeschwindigkeit von 30 mm/min aufnehmen. Die angegebenen Tisch- und Schreibergeschwindigkeiten führen nach unseren Erfahrungen zu ei-

* I. Mitteilung: Kaiser et al [1]

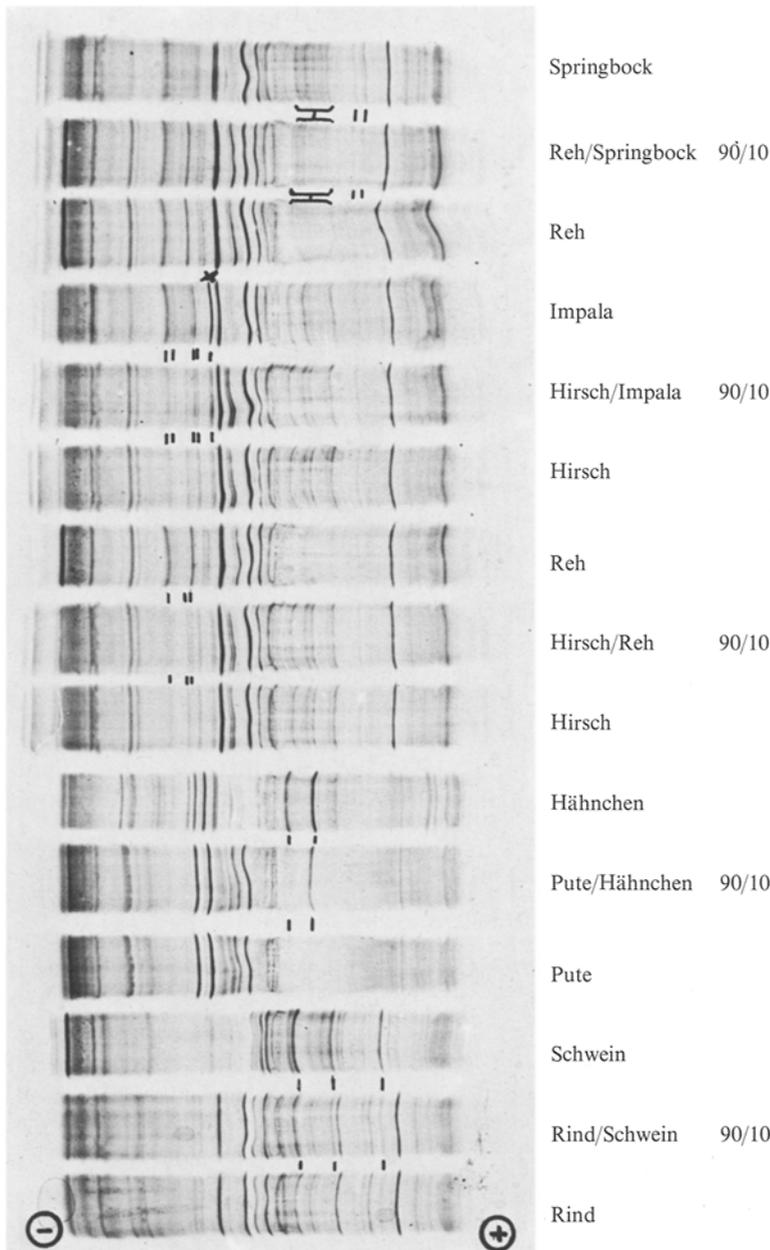


Abb. 1. Untersuchung von Fleischmischungen (Mischungsverhältnis 90/10 Gew.-%) durch PAGIF auf PAGplate pH 3,5–9,5. Färbezeit: 5 Std

ner guten Auswertung der Peakflächen. Berechnung der Peakflächen (F): Grundlinie (c) und Höhe (h) ausmessen.

$$F = c \cdot h/2.$$

Photographie wie beschrieben [1] ausführen.

Ergebnisse

Qualitative Beurteilung

Wäßrige Extrakte aus dem Muskelfleisch der von uns bisher untersuchten Warmblüter ergeben auf PAGplates pH 3,5–9,5 tierartspezifische Pherogramme [1, 8], die in binären Mischungen eine Identifizierung beider

Tierarten bis herab zu $\leq 10\%$ Gewichtsanteil der einen Komponente gestatten. In Abbildung 1 sind einige Beispiele ausgewählt. 10%-Zusätze von Schwein zu Rind, Hähnchen zu Pute, Reh zu Hirsch, Impala zu Hirsch und Springbock zu Reh sind an den markierten Proteinbanden erkennbar. Die Entscheidung, welche Antilopenart (Impala oder Springbock) dem Reh- bzw. Hirschfleisch zugesetzt wurde, kann anhand der mit X markierten Bande getroffen werden.

In vielen Fällen sind beide Tierarten auch bei einem Gewichtsanteil von weniger als 10% an einer Komponente identifizierbar, z.B. bei Mischungen aus Rind- und Schweinefleisch ab 2% Schweinefleischanteil (Abb.

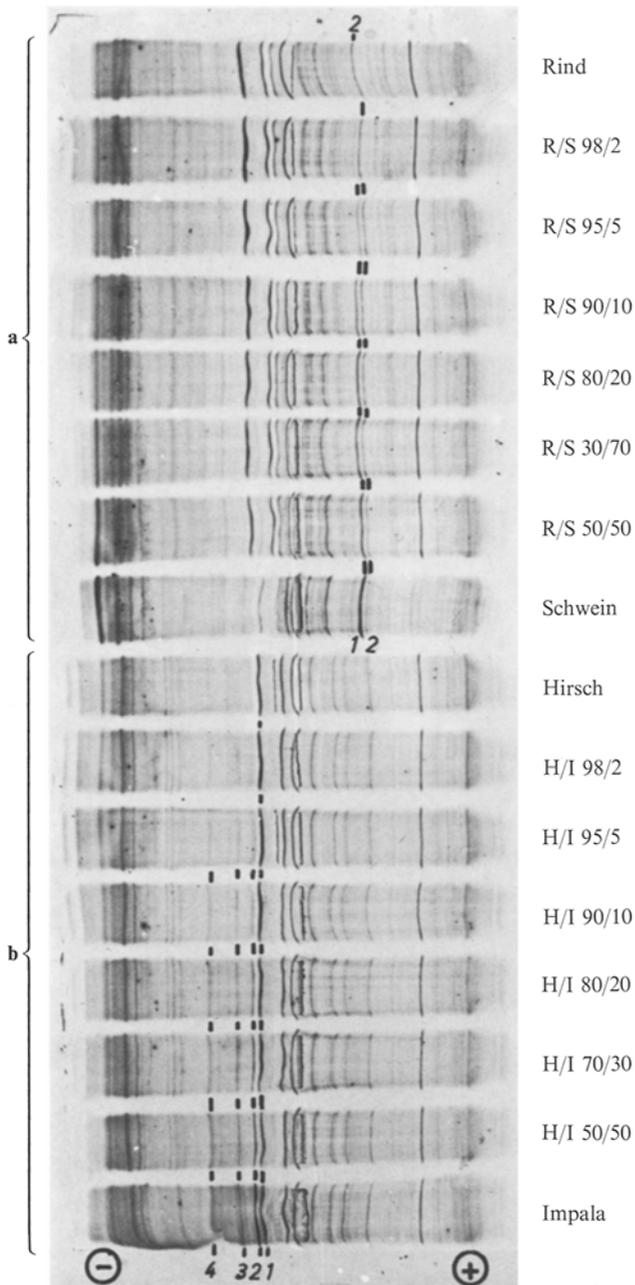


Abb. 2a, b. Untersuchung verschiedener Mischungen aus **a** Rind- und Schweinefleisch, **b** Hirsch- und Impalafleisch durch PAGIF auf PAGplate pH 3,5–9,5. *R/S* und *H/I*: Mischungsverhältnisse Rind/Schwein und Hirsch/Impala in Gew.-%; Färbezeit: 2 Std

2a; Bande 1), bei Mischungen aus Hirsch- und Impalafleisch ab 5% Impalafleischanteil (Abb. 2b; Banden 2–4) und bei Mischungen aus Puten- und Hähnchenfleisch ab 5% Hähnchenfleischanteil (Abb. 3; Banden 3–5).

Die Abbildungen 1 und 2 zeigen, daß die Reproduzierbarkeit der Pherogramme gut ist.

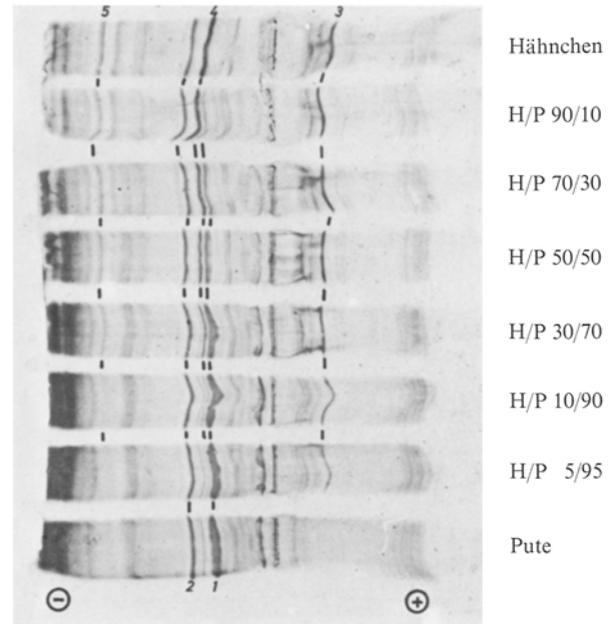


Abb. 3. Untersuchung verschiedener Mischungen aus Hähnchen- und Putenfleisch durch PAGIF auf PAGplate pH 5,5–8,5. *H/P*: Mischungsverhältnisse Hähnchen/Pute in Gew.-%; Färbezeit: 2 Std

Quantitative Beurteilung

Eine Abschätzung der prozentualen Zusammensetzung von Fleischmischungen ist schon durch visuelle Beobachtung der Pherogramme möglich (Abb. 2–3). Einige Tierarten unterscheiden sich vornehmlich in Proteinen, deren isoelektrische Punkte im pH-Bereich 6–8 liegen, z. B. Pute und Hähnchen (Abb. 1) sowie Reh und Impala (Abb. 1). In solchen Fällen empfiehlt sich eine Focussierung im pH-Gradienten 5,5–8,5 (Abb. 3).

Die densitometrische Auswertung der Pherogramme verschiedener Mischungen aus Rind- und Schweinefleisch, Hirsch- und Impalafleisch sowie Puten- und Hähnchenfleisch ist in den Abbildungen 4–6 wiedergegeben. Das Verhältnis der markierten Peakflächen wurde berechnet und gegen die Zusammensetzung der Mischungen aufgetragen (Abb. 7a–c). Auf analoge Weise wurden Eichkurven für Reh/Impala- (Abb. 7d) und Rind/Schweinefleischmischungen (Abb. 7e) nach Focussierung im pH-Gradienten 5,5–8,5 erhalten.

Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse weisen die PAGIF als leistungsfähige Methode zur Beurteilung von Mischungen aus rohem Fleisch zweier Tierarten aus. Die qualitative Beurteilung erfolgt durch Mitführenen einfach herzustellender Vergleichsproben (frische wäßrige Extrakte). Wie auch Kirchhoff u. Rubach [7] berichten, sind beide Tierarten bis herab zu ca. 10% Gewichtsanteil

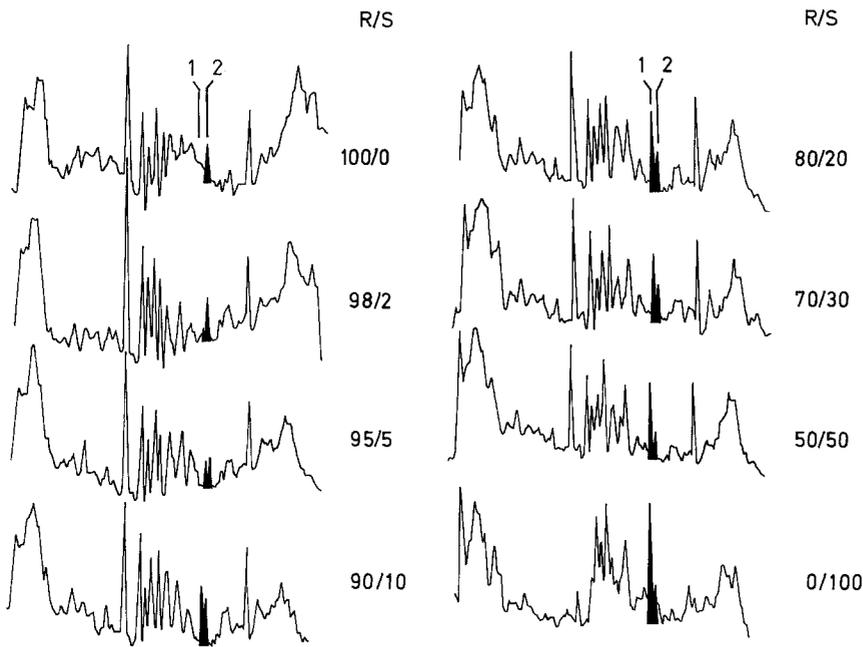


Abb. 4. Densitogramm verschiedener Mischungen aus Rind- und Schweinefleisch nach PAGIF auf PAGplate pH 3,5-9,5. R/S: Mischungsverhältnisse Rind/Schwein in Gew.-%. Peaks 1 und 2 entsprechen den in Abb. 2a markierten Proteinbanden 1 und 2

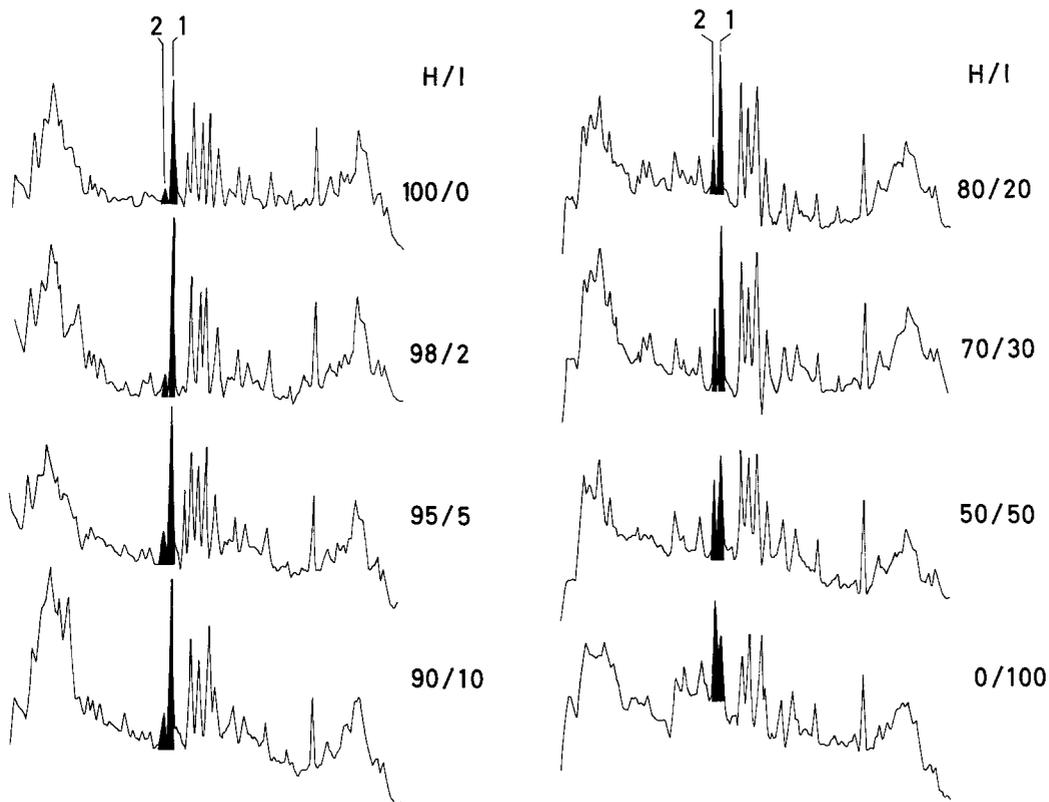


Abb. 5. Densitogramme verschiedener Mischungen aus Hirsch- und Impalafleisch nach PAGIF auf PAGplate pH 3,5-9,5. H/I: Mischungsverhältnisse Hirsch/Impala in Gew.-%. Peaks 1 und 2 entsprechen den in Abb. 2b markierten Proteinbanden 1 und 2

teil der einen Komponente identifizierbar. Unsere Untersuchungen haben darüber hinaus ergeben, daß in vielen Fällen Anteile von 2-5% erkennbar sind. In Zweifelsfällen erleichtern Densitogramme die qualitative Differenzierung.

Bei der Aufstellung von Eichkurven empfiehlt es sich, die Flächen zweier charakteristischer Peaks zugrunde zu legen, da durch Bildung des Quotienten dieser Flächen eventuelle Fehler bei der Substanzaufgabe (ungleichmäßige Proteinabgabe aus den Filterplätt-

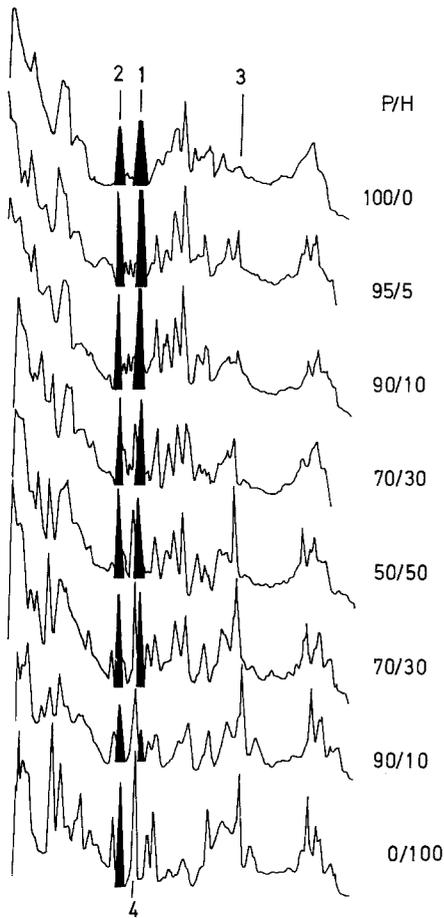


Abb. 6. Densitogramme verschiedener Mischungen aus Puten- und Hähnchenfleisch nach PAGIF auf PAGplate pH 5,5–8,5. P/H: Mischungsverhältnisse Pute/Hähnchen in Gew.-%. Peaks 1–4 entsprechen in Abb. 3 markierten Proteinbanden 1–4

chen auf das Gel) eliminiert werden können. Die Wahl der Peaks zur Erstellung der Eichkurven muß für jedes Problem individuell erfolgen, wobei oft andere Proteinbanden herangezogen werden als bei der visuellen Beurteilung der Pherogramme. Besonders geeignet sind schwache Banden auf farblosem Untergrund, damit ein linearer Zusammenhang zwischen Farbintensität und Proteinmenge gewährleistet ist [10]. Ein Mitführen von externen Eichwerten (wäßrige Extrakte aus Proben bekannter Mischungsverhältnisse) ist erforderlich.

Für immunochemische Untersuchungen, die zur Zeit vorwiegend durchgeführt werden, stehen nicht für alle im Handel befindlichen Tierarten monospezifische Antisera zur Verfügung. Das bedeutet, daß eine Reihe von Tierarten in Mischungen unerkant bleibt. Die PAGIF erlaubt dagegen eine schnelle Charakterisierung aller im Handel befindlicher Tierarten über ihre Proteinmuster. Auch bei Verwendung weiterer Tierarten ist zu erwarten, daß der Zusatz anhand eines veränderten Proteinspektrums erkannt wird.

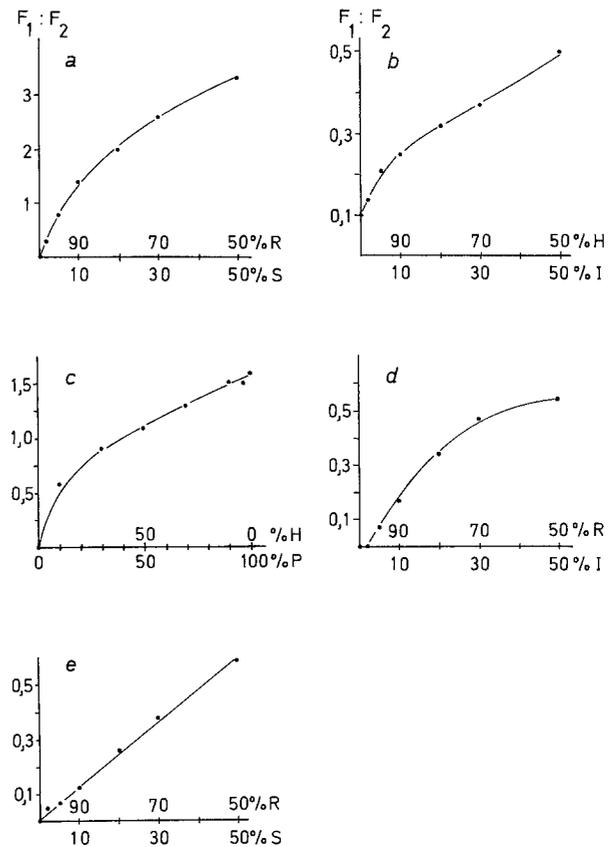


Abb. 7a–e. Beziehung zwischen der prozentualen Zusammensetzung von Fleischmischungen und den Flächenverhältnissen charakteristischer Peaks. **a** Rind R/Schwein S; **b** Hirsch H/Impala I; **c** Pute P/Hähnchen H; **d** Reh R/Impala I; **e** Rind R/Schwein S; **a–b** nach Focussierung in pH-Gradienten 3,5–9,5; **c–e** nach Focussierung im pH-Gradienten 5,5–8,5

Danksagung. Wir danken Herrn Präsidenten Dr. E. Coduro, Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern, Fachbereich Chemie, München für anregende Gespräche und die Überlassung von Fleischproben, Herrn Dr. K. Santarius, Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern, für wertvolle Diskussionen und Frau D. Karrais für geschickte technische Mitarbeit.

Literatur

1. Kaiser K-P, Matheis G, Kmita-Dürmann Ch, Belitz H-D (1980) Z Lebensm Unters Forsch 170:334
2. Grimmett JA (1965) Interbureau By-Lines 2:131 zitiert in [4]
3. Höyem T, Thorson B (1970) J Agric Food Chem 18:737
4. Coduri RJ, Rand AG (1972) J Assoc Off Anal Chem 55:461
5. Spell E (1974) Fleischwirtschaft 54:533
6. Heinert HH, Klinger A (1978) Fleischwirtschaft 58:1490
7. Kirchhoff E, Rubach K (1980) Lebensmittelchemie gerichtl Chemie 34:27
8. Kaiser K-P, Matheis G (1980) Lebensmittelchemie gerichtl Chemie: (im Druck)
9. Blakesley RW, Boezi JA (1977) Anal Biochem 82:580
10. Fullington JG, Cole EW, Kasarda DD (1980) J Sci Food Agric 31:43

Eingegangen am 21. Mai 1980