

## Akrilamid gélelektroforézis alkalmazása élelmiszerfehérjék vizsgálatánál\*

FARKAS JÓZSEFNÉ

Budapesti Felsőfokú Élelmiszeripari Technikum

Érkezett: 1970. április 22.

A fehérjék sajátságainak, viselkedésének ismerete döntő fontosságú minden élelmiszerfeldolgozási módszer szempontjából. Az élelmiszerek strukturális fehérjeinek változásai a tápértékre és az érzékszervi minőségre egyaránt kihatnak. A korszerű élelmiszerfeldolgozási módszerek arra törekednek, hogy a nem kívánatos fehérjeváltozásokat csökkentsék, a kívánatosakat pedig fokozzák. Elméleti és gyakorlati szempontból egyaránt fontos tehát az élelmiszer- és mikrobafehérjék, illetve enzimek sajátságainak és e makromolekulák változásainak vizsgálata, mert tudományosan megalapozott, optimális eredményt adó technológiák kidolgozása csak ilyen ismeretek alapján lehetséges.

A továbbiakban az élelmiszerfehérjék egyik legkorszerűbb vizsgálati módszerével, az akrilamid-gélelektroforézissel foglalkozom.

### A módszer elvi alapjai

A fehérjék elektromos töltése – a közeg pH-jától függően – pozitív vagy negatív, így elektromos erőterben az anód vagy a katód felé vándorolnak. A fehérjekomponensek vándorlási sebességét a komponensek nettó töltése adja meg. Ily módon egy fehérjekeverék komponensei egymástól elválaszthatók és vándorlási sebességük alapján karakterizálhatók. (Ezt az elektromos erőterben bekövetkező vándorlást nevezzük elektroforézisnek.)

A gyakorlatban azok az elektroforézises módszerek terjedtek el, melyeknél a keverékek szétválasztása valamilyen hordozóanyagon történik (zóna-elektroforézis). Hordozóul főleg papírt, keményítő- és agargélt alkalmaztak, újabban egyre inkább előtérbe kerül az akrilamid-gél használata.

A poliakrilamid Shaw (1) szerint számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik a többi hordozóanyaggal szemben:

A gélkoncentrációnak 3–30% közötti változtatásával a térhálósodás mértéke szabályozható, s ezáltal egy ún. molekuláris szintahatással érhető el az optimális elválasztás. Ez azt jelenti, hogy pl. a 7,5% akrilamid koncentrációjú gél átlagos pórusnagysága 50 Å, a 30%-osé átlagosan 20Å.

Mivel kémiaiailag jobban definiált, a gélstruktúrát is jobban lehet reprodukálni.

Az elektrooszmózis jelentéktelen.

Az adszorpció elhanyagolható, még pozitív töltésű molekulák sem adszorbeálódnak.

A pufferoldat szélesebb tartományban használható.

A gél teljesen átlátszó.

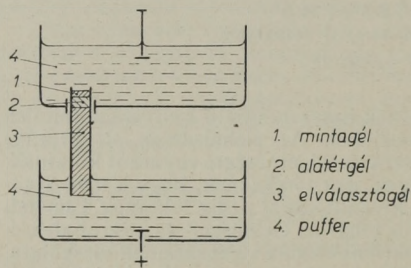
\* A Budapesti Felsőfokú Élelmiszeripari Technikum III. Tudományos Ülésszakán 1970. április 13-án elhangzott előadás.

A szétválasztás sokkal rövidebb ideig tart.

A gél szívósabb, hajlékonyabb és könnyebb kezelni.

A poliakrilamid gélelektroforézisnek két változata van: az egyiknél a gélt lapok formájában, a másiknál rudak alakjában készítik el. Ez utóbbit nevezik „disc” elektroforézisnek. A továbbiakban erről lesz szó.

### Készülékek



1. ábra

Az 1. ábra a „disc” poliakrilamid-gélelektroforézis sematikus rajza. A készülék könnyen elkészíthető házilag is. Felül és alul láthatók a puffertartályok, ebbe merülnek az elektródok. A két puffertartályt üvegsövek kötik össze, melyek a gélt tartalmazzák. (Az ábrán csak egy látható.) A csövek a közép-ponttól (az ott elhelyezett elektródoktól) egyforma távolságra helyezkednek el azért, hogy minden gél azonos potenciálkülönbségnek legyen kitéve.

### Gélkészítés

A gél alapanyaga akrilamid ( $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH}_2$ ) és N-N' metilén-bisacrilamid ( $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH} - \text{CH}_2$ ) rendszerint 95:5 súlyarányú elegye. E komponenseket pufferban oldják; ezenkívül katalizátorként 0,1–0,3% N, N, N', N'-tetrametilendiamint vagy  $\beta$ -dimetil-aminopropionitrilt és 0,1–0,3% ammóniumpersulfátot, mint iniciátort adnak hozzá. Egy másik változat szerint az oldat fluoreszcens lámpával történő besugárzásával. A katalizátor koncentrációját úgy célszerű megválasztani, hogy a kocsonyásodás az oldatok elegyítése után 10–30 percen belül történjen meg; sem az ennél rövidebb, sem az ennél hosszabb idő nem előnyös a gélstruktúra kialakulására [Maurer (2)].

A géloszlopok előkészítésére és a szétválasztandó minták felvitelére különböző módszereket dolgoztak ki. Az egyik változat szerint egy-egy csőben három-féle gélréteget készítenek. Az első gélrétegen fog majd a tulajdonképpeni szétválasztás történni, a második tartalmazza a mintát, a kettő között helyezkedik el a harmadik, az ún. „alátét” gél. A mintagél és az alátétgél kisebb koncentrációjú (nagyobb pórusméretű), mint az elválasztó gél és komponenseik kisebb ionerősségű és más pH-jú pufferban vannak feloldva. Ezáltal a mintakomponensek a felső rétegen gyorsan átvándorolva érik el a szeparáló gél felső határát, ott a nagyobb gélkoncentráció következtében lassabban képesek csak továbbhaladni, ezért összetömörülnek mintegy 1 mm-es rétegben. Ez az oka, hogy éles szétválasztást lehet így elérni.

A géloszlop elkészítésének és a minták felvitelének ennél egyszerűbb módszere az, melynél csak egyetlen géloszlopot állítanak elő – az elválasztást végző gélt –, e fölé a csőbe kb. 1 cm magasságban puffert öntenek, majd a csöveket a készülékbe helyezve a puffer alá rétegezik a vizsgálandó anyagot. (A minta sűrűbbé tételére cukrot alkalmaznak.)



Ezzel a módszerrel is tömörülést érnek el, éles az elválasztás, mert a felső rétegen nagyobb a mobilitás. Előnyös ez a technika azért is, mert a gél szennyeződései – mint a perszulfát ionok – egy előzetes elektroforézissel eltávolíthatók. Az elektroforézist általában 100 V körüli feszültségen kb. fél óráig végzik.

### Festés

Ezután a csövekből a géleket eltávolítják és rendszerint festéssel, pl. amidofeketével teszik a fehérjéket láthatóvá. A fehérjét nem tartalmazó részek festékmentesítése a gélek ismételt híg ecetsavas kimosásával, vagy újabb elektroforézissel – puffer helyett híg ecetsavat tartalmazva – történhet.

A szétválasztott komponensek – számuk lehet 20–30 is – korong alakú zónában helyezkednek el a gél egész hossza mentén. Az elválás olyan éles, hogy az egyes frakciók vastagsága, ill. a frakciók egymástól való távolsága gyakran még az 1 mm-t sem éri el.

A kvantitatív értékelés történhet nagy feloldóképességű denzitométerrel, vagy úgy, hogy a gél vékony szegmensekre szeletelik, mindegyik szegmensen pufferoldattal eldörzsölik, így külön-külön meghatározzák a festékfelvétel mértékét (pl. fotométerrel) vagy az enzimátikus aktivitást.

### Az elektroforézis alkalmazása

Az akrilamid-gélelektroforézis nem régi módszer. Alig 10 esztendővel ez előtt írták le először *Raymond* (3), valamint *Ornstein* és *Davis* (5). Azóta az orvostudományi kutatásokban (főleg klinikai laboratóriumi diagnosztikai céllal) és a biokémiai kutatásokban alkalmazzák leginkább.

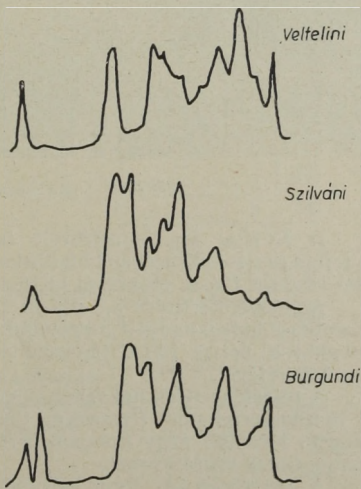
Kisebb számban történtek már kísérletek élelmiszerfehérjék vizsgálatára is, melyeket a fehérjespecifikusság miatt fel lehet használni fajtaazonosításra, hamisítás kimutatására stb.

Így pl. a közelmúltban *Freimuth* és *Krause* (6) közölte *tehéntejnek* kecsketejjel történt hamisítás-kimutatását. Ezzel foglalkozik *Dance* (7) hasonló tárgyú közleménye is.

*Izomfehérjékkel* foglalkozott *Cohen* (8), vizsgálva sonka fehérjéinek változását a tárolási idő és hőmérséklet függvényében. Két New Jersey-beli kutató: *Maier* és *Fischer* (9) csirkehús fehérjéinek postmortalis változásaival foglalkozva a vízdíszítható extraktban fedezett fel olyan komponenseket, melyeknek intenzitása a húsok tárolása közben növekszik.

*Tojásfehérjék* mennyiségének meghatározását vizsgálta szárított tészta-ból *Silano* (10).

A gyümölcsök fehérjéinek jellegzetes elektroferogramjairól számol be *Clements* (11), mint azt az alma, körte, narancs, banán és avokáto-körte vizsgálatai bizonyították. Az ausztriai Seibersdorf kutatóintézetében *Radola*



2. ábra

(12) és munkatársai szőlőfajták fehérjéit vizsgálva megállapították, hogy a módszer fajtaazonosításra kiválóan alkalmazható.

A 2. ábrán három szőlőfajta: Veltelini, Burgundi és Szilváni denzitométerrel nyert görbéit láthatjuk (*Radola* után).

Megállapították azt is, hogy gélelektroforézissel lényegesen több frakciót lehet kapni, mint papírelektroforézissel (6–12, ill. 20).

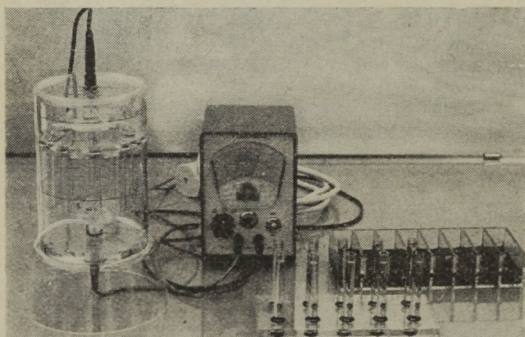
Búzaliszt fehérjéket vizsgált *Nimmo* és munkatársaival (13) kutatta azt, hogy a búzaliszt globulin-komponensében milyen arányban van purotionin. (A purotionin bakteriosztatikus hatású búzafehérje, nagyobb mennyiségben gátolja az élesztősejtek növekedését és megakadályozza a tészta kelését.)

*Narayan* és munkatársai (14) búzaliszt proteinek különböző pH-n történő elválaszthatóságát vizsgálták. Az indiai *Sastry* és *Virupaksha* (15) köles fehérjéinek szétválasztását végezte el a módszer segítségével.

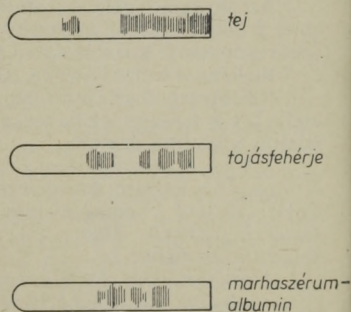
### Kísérletek

Az elektroforézist a KÉKI-ben levő belga gyártmányú ACRILOPHOR elnevezésű készüléken végeztük. A készüléket a 3. ábrán mutatjuk be.

Fő részei: a két puffertartály, az elektródok, valamint a csövek (6 mm átm., 50 mm hosszú), melyekből egyszerre 8 illeszthető a felső tartály nyílásaiba. A készülékhez egy 50 mA max. áramerősségű feszültségstabilizáló tartozik. A feszültséget 0–240 V-ig lehet szabályozni.



3. ábra



4. ábra

A 4. ábra tej, tojásfehérje és marhaszérumalbumin gélelektroferogramjai. A tejből és a tojásfehérjéből hígítatlan állapotban vizsgáltunk 10  $\mu$ l-nyit, a marhaszérumalbumin 1%-os oldatából vittünk fel ugyanannyit.

Az elektroforizálás 8,5 pH-jú Tris-glicin pufferkeverékben történt. (TRIS: 2-amino-2-hidroxi-metil-1,3-propándiol) 8 gélcsővel 45 percig 80 Volt, majd további 20 percig 160 V tápfeszültség mellett. Festés 2%-os ecetsavban oldott amidofeketével.

A tojásfehérjéből hat fehérjekomponenst sikerült egymástól jól elkülöníteni. A marhaszérumalbumin (Browning Chemical Corporation, USA gyártm.) sem homogén, legalább négy komponensre különül, noha vékonyréteg gélfiltrációval homogénnek mutatkozott.

A következő két ábrán búzából készült kivonatok elektroferogramjait láthatjuk.



A búzafehérjék kinyerése úgy történt, hogy a légszáraz Bezosztája fajtájú búzából NDK ütőmalommal 3 perces aprítással nyert anyagot szemcseosztályozó szitasorozaton átszitálunk és a 0,63 és 1,0 mm közötti lyukbőségű sziták között fennmaradt (a héjrészeket is tartalmazó) frakcióból a proteineket Boundy és munkatársai (16) módszere szerint vontuk ki.

20 g őrleményt 100 ml oldószerrel szuszpendáltunk, egy óráig rázattuk, majd „Laborfug” szögcentrifugán 20 percig teljes fordulattal centrifugáltuk. A kiülepített anyagot újabb 50 ml-nyi oldószerrel ismét rázattuk, centrifugáltuk, és a szupernatánokat egyesítettük.

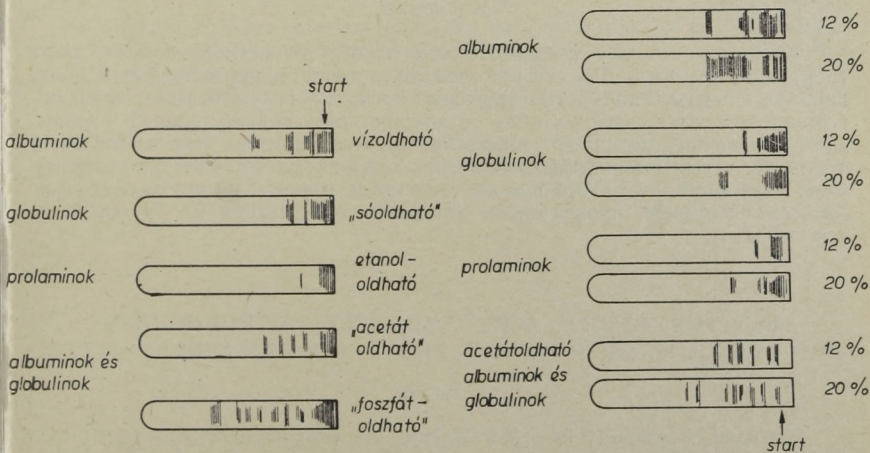
Oldószerül sorjában: az albuminok kivonására desztillált vizet, a globulinok kinyerésére 0,5 NaCl-ot, a prolaminokéra 70%-os etanol és a glutelinekére 0,1 n NaOH-t használtunk. Albuminok és globulinok együttes kivonására 6,7 pH-jú 0,1%-os foszfát – 1 m NaCl-ot, illetve 0,1 n ecetsav – 0,5 m NaCl elegyét alkalmaztuk.

Az oldhatóságuk szerint ily módon elválasztott fehérjéket besűrítettük: az extrakt 10 ml-ét Sartorius gyártmányú túlnyomásos ultraszűrő készülékbe vittük és 14 atm. nyomású nitrogént vezetünk az oldat fölé. Az ultraszűrő pórusnagysága olyan volt, hogy a 10 ezernél nagyobb molekulásúlyú anyagokat fenntartotta, a kisebb molekulásúlyú anyagok a vízzel együtt átpréselhetők voltak a membránon. A membránszűrőn maradt anyagot kevés vízzel kis fiolákba mostuk át úgy, hogy a végtérfogat 0,5 ml volt. (A besűrítés mértéke a búza extrakthoz képest tehát hússzoros volt.) A szűrlet fehérjementességét szulfosalicilsavas reagenssel ellenőriztük.

Ebből a szűrletből 10  $\mu$ l-t vittünk fel a poliakrilamid géltre. A start (felvitel) helye nyíllal van jelölve. A vízdoldható frakcióból (albuminok) 7–8 komponenst, a sóoldhatóból 5–6-ot (globulinok), az etanol oldhatóból (prolaminok) 3–4-et, az acetát oldhatóból (szintén albuminok és globulinok) 8–10 komponenst sikerült egymástól jól elkülöníteni (5. ábra).

Vizsgáltuk búzafehérjéknek nedvesítés hatására bekövetkező változását is.

Nedv. tart.



6. ábránk kétféle légszárász, 20%-os nagy nedvességtartalomra búzaminták fehérjéinek gélelektroferogramjait mutatja. Az extrakció a nedvesítés után 2 nappal történt. Látható, hogy valószínűleg a nedvesítés hatására meginduló biokémiai folyamatok következtében a nagy nedvességtartalomra beállított búzaminták számos fehérjekomponense jelentősen eltérő mobilitást mutatott.

A hosszabb ideig tartó nedvesítés hatásának vizsgálatára, valamint e változások a búzában levő egyéb anyagok, pl. szabad aminosavak változásaival való összefüggésének felderítése tanszéki kutatási munkánk keretében még folyik.

A KÉKI eszközeinek használati engedélyéért köszönetet mondunk az intézet vezetőségének. A kísérleteknél adott technikai segítségért *Udvardy Lujza* laboránsnak tartozunk köszönettel.

#### I R O D A L O M

- (1) *Shaw, Duncan, J.*: Electrophoresis. Academic Press, London and New York. 117. 1969.
- (2) *Maurer, J.*: Disk-elektrophorese. Berlin. 1968.
- (3) *Raymond, S.*: Ann. of the New York Ac. of Sci. 121 (2) 350. 1964.
- (4) *Ornstein, L.*: Ann. of the New York Ac. of Sci. 121 (2) 321, 1964.
- (5) *Davis, B. J.*: Ann. of the New York Ac. of Sci. 121 (2) 404, 1964.
- (6) *Freimuth, Krause*: Die Nahrung 12, 8, 881, 1968.
- (7) *Dance, J. E.*: J. Dairy Res. 35, 383, 1968.
- (8) *Cohen, E. J.*: J. Food Sci. 31, 746, 1966.
- (9) *Maier, G. E., Fischer, R.*: J. Food Sci. 31, 482, 1966.
- (10) *Silano, D'errico et al.*: J. Ass. Offic. Anal. Chem. 1968.
- (11) *Clements, R. L.*: Anal. Biochem. 13, 390, 1965.
- (12) *Radola, Richter, Kaendl*: Seibersdorf Project Report. July 1967.
- (13) *Nimmo, C. C., O'Sullivan, M. T., Bernardin, J. E.*: Cereal Chem. 45, 1, 28, 1968.
- (14) *Narayan, K. A., Vogel, M., Lawrence, J. M.*: Anal. Biochem. 12, 526, 1965.
- (15) *Sastry, Virupaksha*: Anal. Biochem. 19, 505, 1967.
- (16) *Boundy, J. A. et al.*: Cereal Chem. 44, 2, 160, 1967.

### ПРИМЕНЕНИЕ АКРИЛАМИД-ГЕЛЕВОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА В ИСПЫТАНИЯХ БЕЛКОВ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

*Й. Фаркау*

Автор знакомит принципиальные основы акриламид-гелевого электрофореза, преимущества его применения и приборы применяемых в большинстве случаев. Занимается способами изготовления геля, нанесением образцов, методами окрашивания, возможностями количественной оценки. Дает обобщение литератур занимающихся испытаниями белков пищевых продуктов гелевым электрофорезом. В конце знакомит испытания гелевым электрофорезом белка, альбумина сыворотки говяжьего мяса и белковых фракций пшеницы проведенных прибором ACRILOPHOR бельгийского производства.

### ANWENDUNG DER ACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE BEI DER UNTERSUCHUNG VON PROTEINEN DER LEBENSMITTEL

*J. Farkas*

Verfasser beschreibt in seiner Arbeit die prinzipiellen Grundlagen der Acrylamid-Gelelektrophorese, die Vorteile ihrer Anwendung und den zumeist gebräuchlichen Apparat. Er befasst sich mit den verschiedenen Arten der Zuberei-



tung des Gels, dem Auftragen der Proben, den quantitativen Auswertungsmöglichkeiten. Er gibt eine Zusammenfassung der Literatur über die Untersuchung der Proteine von Lebensmitteln mittels Gelelektrophorese. Schliesslich beschreibt er seine diesbezüglichen Untersuchungen von Milch, Eierprotein, Rinder-Serumalbumin und Weizenmehlproteinfraktionen mit dem belgischen ACRILOPHOR Apparat.

## UTILISATION OF ACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS IN FOOD PROTEIN STUDIES

*J. Farkas*

An account is given of the theory of acrylamide gel electrophoresis, its advantages and the most frequently used apparatus. The methods of gel preparations, the applications of the sample, dyeing procedures and the possibilities of quantitative evaluation are dealt with. A review of food protein studies by gel electrophoresis is given. Finally the gel electrophoresis experiments carried out in the Belgian made apparatus „Acrylophor” on milkprotein and albumen as well as on beef serum albumine and wheat protein fractions are detailed.

## UTILISATION DE L'ÉLECTROPHORÈSE DANS DES GELS D'ACRYLAMIDE AFIN D'ÉTUDE LES PROTÉINES ALIMENTAIRES

*J. Farkas*

L'auteur décrit les principes théoriques de l'électrophorèse en gel d'acrylamide, les avantages de son utilisation et l'appareil le plus répandu. Elle traite également des méthodes de la préparation du gel, de l'application des échantillons, des méthodes de coloration et des possibilités de la mise au point quantitative.

Une revue est donnée sur les examens des protéines alimentaires par l'électrophorèse en gel. Enfin on publie les résultats des expériences d'électrophorèse en gel effectuées dans l'appareil belge Acrylophor avec du lait, du blanc d'oeufs, de l'albumine du sérum bovin et des fractions de la protéine du froment.