

Elektroforézis és alkalmazása az élelmiszerfehérjék elválasztásában

Hajós Gyöngyi

Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet, Budapest

Érkezett: 1992. február 21.

Az elektroforézis történelmi előzményei

Az elektroforézis több, mint 100 évet felölelő története igen gyors fejlődést és sokrétű alkalmazási területet jelez. Az elektroforézisnek, mint elválasztási módszernek az az alapja, hogy a töltéssel rendelkező vegyületek az elektromos mező hatására elmozdulnak. A fehérjék amfiprotikus molekulák, ezért frakcionálásukra és szerkezetváltozásuk nyomon követésére az elektroforetikus módszerek rendkívül alkalmasak.

Az elektroforézis első irodalmi megemlékezései közül Lodge tézisei 1886-ból származnak. Pontosán 100 évvel ezelőtt, 1892-ben pedig Smirnow már toxinoldatok elektro-frakcionálásáról számol be. A múlt század végén tanulmányozták kolloidok és a globulin elmozdulását elektromos erőterben (Picton és Linder, 1897; Hardy, 1899). Századunk elején az elektroforetikus technikák fejlődésének jelentős eredményei: a kolloid rendszerek elektroforézisének összefoglaló leírása (Schwerin, 1914), izotópok preparatív szeparálása agar "U" csőben (Kendall and Crittenden, 1923), oldott fehérjék tanulmányozása mozgó határfelületek módszerével (Tiselius, 1930, 1937).

A mozgó határfelületek módszere

Ez, a Tiselius-féle, a mozgó határfelületek módszere volt történetileg az első, kidolgozott és széles körben alkalmazott elektroforetikus technika. E megoldás alapja az, hogy a részecskék vándorlása szabadon, oldatban megy végbe az elektromos erőter hatására. Tiselius többek között szérumfehérjék szétválasztását végezte el ily módon és a hordozó nélküli elektroforézis folyamán a fehérjék vándorlását Schlieren-optikával észlelte.

Kötött (zóna) elektroforézis

Az ősi eljárást hamarosan felváltották a hordozó közeget tartalmazó elektroforetikus módszerek. Kötött elektroforézisnek vagy zóna-elektroforézisnek nevezik e stabilizált elektrolittal működő technikát. Az alkalmazott számos hordozó anyag egy része inert, áramlástgátló és kizárólag hordozó szerepet játszik. Ilyenek például az üvegyapot (Coolidge, 1939), a szilikagél (Consden et al., 1946), a cellulóz (Porath, 1956) és a papír (Vámos-Vigyázó, 1967). Másik csoportjuk porózus és molekulaszitaként is hatnak. Ezek közé tartozik az agaróz (bár a molekulaszita hatása csekély), a keményítő és a poliakrilamid (Radola, 1980 ; Andrews, 1988, Hjerten et al., 1965).

A hordozó közeg gyors térhódítását az a rendkívüli előnye biztosította, hogy csökkenti az áramlással kapcsolatos inhomogenitásokat és a diffúziót oly mértékben, hogy az elválasztott komponensek a maximális felbontóképességnek megfelelő legélesebb zónákat eredményezik. A hordozó közegnek kémiaileg inertnek, egyöntetűnek és homogénnek kell lennie, valamint az is lényeges, hogy gyorsan és reprodukálhatóan lehessen elkészíteni.

A **poliakrilamid gél** széleskörű elterjedését (Andrews, 1988; Kaiser és Krause, 1985; Radola, 1980) az magyarázza, hogy a fenti igényeknek jól megfelel. Különleges előnye ezen felül az, hogy a poliakrilamid gélek összetétele az akrilamid és az N,N'-metilén-biszakrilamid aránnyal az igényeknek megfelelően jól ellenőrizhetően változtatható. A pórusméret az akrilamid koncentráció növekedésével csökken.

A **fehérjék festésére** az elektroforetikus elválasztás után többféle eljárás ismert. Történelmileg a legrégebb az Amido Fekete 10B festék, amelyet még ma is széleskörűen alkalmaznak. A leggyakrabban használatos fehérje-festékek, az Amido Fekete, a Coomassie Blue R 250, és a Világító Zöld (Fast Green FCF) relatív előnyeit Wilson (1979) tanulmányozta. Az Amido Fekete 10B-nél a Coomassie Brilliant Blue R250 körülbelül háromszor olyan érzékeny, és az aminosoportokkal elektrosztatikus kötéseket képez, míg a fehérjék nem-poláros részeivel nem-kovalens kötéseket alkot.

A gélelektroforézis módszerek eredményes elterjedése a fehérjesávok nagyobb érzékenységgű festését igényelte. 1980 körül már világszerte alkalmazták az ezüst-festési módszereket, amelyeknek érzékenysége 5-100 szorosa lehet a Coomassie Blue-festés fehérje-detektálásához képest. Az első ezüst-festési változatok még hisztokémiai módszerekből származtak (Switzer et al., 1979; Oakley et al., 1980), de az ezüstoffestési módszerek fotokémián alapuló csoportja gyakrabban használt, mert gyorsabb, olcsóbb, egyszerűbb (Merril et al., 1982).

Az elektroforetikus elválasztások élelmiszeripari alkalmazása esetén a fehérjefestést többnyire Coomassie Brillant Blue R250 vagy G250-nel végzik, de enzimes festési technikákat is alkalmaznak (Thompson, 1968; Chua et al., 1978).

Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

A fehérjék illetve peptidek hagyományos poliakrilamid gélelektroforézissel való elválasztása a töltésüktől és a méretüktől egyaránt függ. Az 1960-as években a poliakrilamid gélelektroforézist már számos élelmiszerfehérje kimutatására és elválasztására alkalmazták (Kaiser és Krause, 1985 ; Hay et al., 1973; Mikkers et al., 1979a, b).

SDS-PAGE

Ha a poliakrilamid gélelektroforézist nátrium dodecil-szulfát (SDS) jelenlétében végezzük, akkor az elválasztás kizárólag a molekula méretétől függ. Az SDS a részecskéket negatív töltésfelhővel úgy burkolja be, hogy a

polipeptidek jellegzetes saját töltése nem juthat érvényre. Az SDS egységnyi polipeptidhez alkalmazott mennyisége jelentős szerepet játszik az elválasztásban (Delincée és Hajós, 1984).

A poliakrilamid gélelektroforézist - SDS jelenlétében - nem csupán a fehérjék molekulatömegének meghatározására használják (Weber és Osborn, 1969), hanem addig ismeretlen fehérjék detektálására (Laemmli, 1970) és bioszintetizált fehérjék azonosítására, kvantitatív kimutatására (Zahringer és mtsai, 1976). A poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE és SDS-PAGE) jelentős szerepet játszik az élelmiszeralitikában is, ahol fehérjék azonosítására, idegen fehérjék kimutatására, fajta-vizsgálatokra és a fehérjék szerkezetében bekövetkező változások nyomon követésére egyaránt alkalmazzák.

Az izotachoforézis

Az izotachoforézist állandó sebességű ion-vándorlásnak vagy eltolódásos elektroforetikus módszernek is nevezik. Ez az elektroforetikus technika a molekulákat töltés-különbségeik alapján választja el többnyire nem gélzűrésre alkalmas közegben. Az analitikai elválasztásoknál folyadékkal töltött kapilláris csöveket, poliakrilamid gél hengereket vagy réteget használnak. A kis léptéknövelésű preparatív kísérleteket általában horizontális gélágyakban, géllal töltött oszlopokban vagy speciális, pufferral töltött több-rekeszű készülékekben végzik.

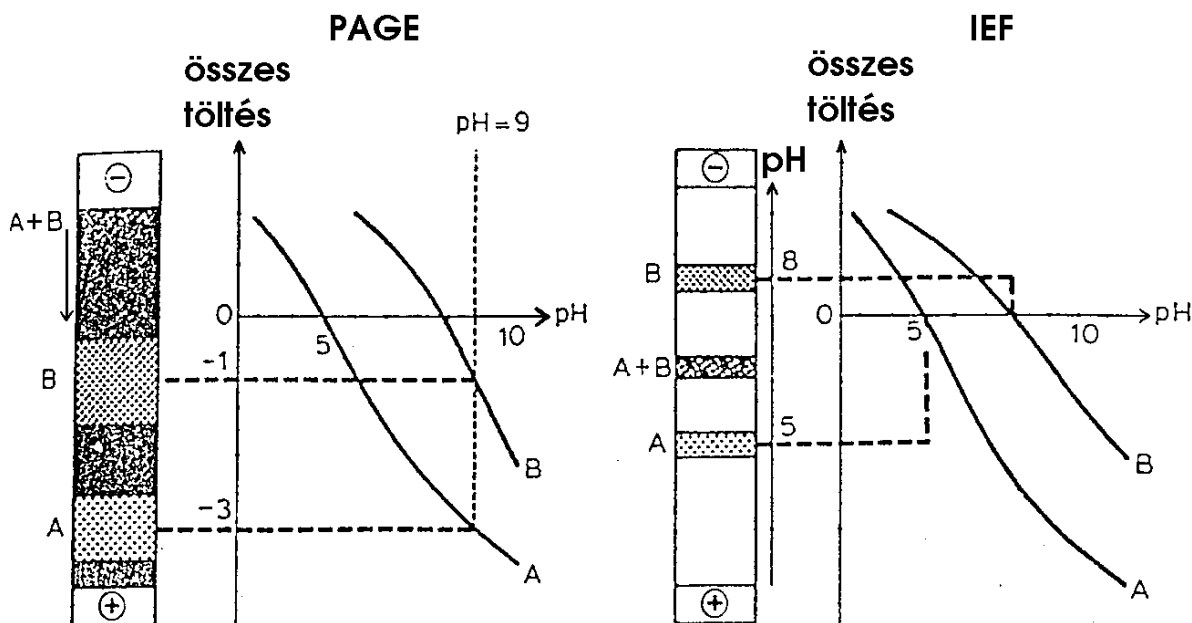
Lényeges, hogy az izotachoforézist kétféle elektrolittal játszadják le. Az egyiknek a mozgékonyága kisebb (ez a terminátor), a másiké nagyobb (ez a vezető elektrolit), mint az elválasztandó anyagoké. Az elektromos erőter hatására a vezérion és a terminátor ion között elhelyezkedő elválasztandó ionok a terminátor felé csökkenő sebességek sorrendjében rendeződnek el. Az összes zóna állandó sebességgel vándorol tovább, miközben az egyes anyagok (zónák) egyre jobban elválnak egymástól (Mikkers et al., 1979a).

Az izotachoforézis feloldó képessége nem olyan jó, mint a többi elektroforetikus módszerké (PAGE, IEF). Előnye azonban, hogy azokban az esetekben, amikor más módszerek alkalmazása nehézkes vagy megvalósíthatatlan, akkor jól kivitelezhető elválasztást eredményez. Különösen eredményesen használható az izotachoforézis metabolitok vagy általában kis molekulák szétválasztása területén (Zelensky' et al., 1984; Repásová et al., 1984), de fehérjék szeparálására is alkalmazzák (Manabe et al., 1989; Delmotte, 1977).

Az izoelektromos fókuszálás (IEF)

Az izoelektromos fókuszálás egy pH-gradiensben lejátszódó elektroforézis. A hagyományos elektroforézis (PAGE) és az izoelektromos fókuszálás közti különbséget az 1. ábra szemlélteti (Andrews, 1988; Righetti, 1985). A makromolekulák vagy a peptidek a pH-gradiensben mindaddig vándorolnak, amíg pozitív vagy negatív töltésüket megőrzik. Amikor a pH-gradiensben belül

elérik azt a pontot, amelyik az izoelektromos pontjuknak felel meg, ahol a molekuláris töltésük zéró, ott megszűnik a mozgásuk. Az izoelektromos fókuszálás előtt az elválasztandó anyagot ezért bárhol felvihetjük a rétegre, sőt, ha egy anyag kimozdulna a pI zónájából, akkor is visszarendeződik ismét. Ha például egyetlen fehérjét (B, $pI=8,0$) a gél két különböző helyére viszünk fel, így az IEF indulásakor az egyik helyen negatív (-1), a másik helyen pozitív (+2) töltéssel rendelkezik a fehérje. A két fehérjezóna így egymás felé mozdul el, fókuszálódik az izoelektromos pontjának megfelelő zónáig, ahol az összes töltése zéró és megszűnik a vándorlása.



1. ábra: A zóna-elektroforézis (PAGE) és az izoelektromos fókuszálás (IEF) összehasonlítása

A pH-gradienst amfolitok, azaz kis molekulatömegű amfoter anyagok keveréke szolgáltatja. A pH-gradiens egyenletességét és jó minőségét az alkalmazott amfolitok tulajdonságai döntően befolyásolják.

Svensson (1962) szerint az amfolitok legfontosabb tulajdonságai a következők:

1. Jó pufferkapacitás, annak érdekében, hogy a pH-t determinálják izoelektromos pontjaikon még nagy molekulatömegű amfolitok jelenlétében is.
2. Jó legyen a vezetőképességük az izoelektromos pontjaikon, hogy más elektrolitok hiányában is fenn tudják tartani az elektromos vezetőképességet.
3. Alacsony molekulatömeg, hogy a vizsgálandó makromolekuláktól könnyen elkülöníthetők legyenek (Vesterberg, 1969b).
4. Az összetételük különbözzék a vizsgálandó anyagokétól.
5. A vizsgálandó makromolekulákat ne denaturálják és ne reagáljanak azokkal.

Az izoelektromos fókuszálás céljára alkalmas amfolitokat sokféle amfi-protikus anyag keverékéből állítottak elő, így aminosavakból, peptidekből vagy amfoter és nem-amfoter pufferek komponenseiből (Bosisio, 1981). Vinogradov és Righetti munkacsoportjai (Vinogradov et al., 1973; Righetti et al., 1975) által leírt eljárás szerint a vivő amfolit hexametilén-tetramin, trietilén-tetramin, tetraetilén-pentamin és pentaetilén-hexamin vizes elegyének melegítésével előállítható. Legfontosabb kereskedelmi termékek az AMPHOLINE[®], a PHARMALYTE[®], a SERVALYT, a BIO-LYTE stb. A hazánkban előállított amfolitok közül a "Symolyt" (MTA Izotóp Intézet) nevű amfolittal végzett IEF után a fehérje-sávok igen előnyösen voltak festhetők (Hajós, 1990). Egy új típusú amfolit előállításával és alkalmazási területének vizsgálatával a DOTE Biológiai Intézetében is foglalkoznak (Szeszák et al., 1991).

Az izoelektromos fókuszálás alkalmazhatóságának bővítését Righetti és Chillemi (1978) az elválasztott peptidek festésére kidolgozott új eljárással érték el. Mivel az amfolitok és a peptidek nagyon hasonló fiziko-kémiai sajátságokkal rendelkeznek, az IEF elválasztás utáni festésük, jelzésük gondot okozott. A peptidek és a festék közötti kötés kialakítása jelentős lépés volt a peptidek elektroforetikus elválasztásában.

Az izoelektromos fókuszálás a molekula-fajtákat kizárólag izoelektromos pontjuk alapján differenciálja. Ezt az elválasztást nem befolyásolja sem a molekula-méret, sem a molekulaszita-hatás az elektroforetikus vándorlás során. Ezért az izoelektromos fókuszálást egy alapvetően nem-szűrő közegben végzik. A legáltalánosabban nagy porozitású poliakrilamid gélt vagy granulált gél-ágyat, például Sephadex gyantát vagy agarózt alkalmaznak.

Az IEF egy igen nagy felbontóképességgel rendelkező analitikai módszer, különösen akkor, ha a vékonyrétegben immobilizált pH-gradienst alkalmaznak. A makromolekulák ilyen körülmények között már 0,001 pH izoelektromos pont különbséggel is elválaszthatók.

Az **immobilizált pH-gradiens** az IEF új forradalmi fejlődését jelenti, mivel az ismert molaritású és ionerősségű, kémiaileg meghatározott közeg esetén a "mérték szerinti" szeparálás is megoldható bármilyen kívánt pH-gradienssel. A mátrixhoz kötött (rögzített) pH-gradiens másik előnye várhatóan az, hogy az izoelektromos fókuszálással elválasztott fehérjék a makro-, ill. mikromolekuláris szennyezők nélkül eluálhatók izoionosan.

Görg és mtsai (1988) nagy felbontású két dimenziós elektroforézises eljárást alkalmaztak immobilizált pH-gradienssel élesztő sejt fehérjéinek vizsgálatára.

Az IEF kisléptékű preparatív elválasztásra (~1 g anyagig) is alkalmas, mégpedig 0,01-0,02 pI egység különbséggel ad jó elválasztást.

Az izoelektromos fókuszálás az anyagok és a technikai oldal állandó fejlődésével a fehérjék elválasztásában a legelterjedtebben és a legnagyobb sikerrel alkalmazható módszer (Bishop, 1979; Righetti 1983; Vesterberg, 1978).

Kapillár elektroforézis

A kapillár elektroforézis számos elektroforetikus technikából kifejlesztett módszer, melynek során a komponensek elektroforetikus elválasztása egy szűk csőben, kapillárisban játszódik le. A szeparálás hordozó közegeként jelenleg legelterjedtebbek a folyadékok, így a puffer-oldatok, szerves oldószerek, felületaktív anyagok, ion-pár reagensek stb. (Fujiwara és Honda, 1987), de számos esetben a kapillárisok az elektroforéziseknél alkalmazott géleket vagy a kromatográfiában használatos töltőanyagokat tartalmazzák (Green és Jorgenson, 1989).

A kapillár elektroforézissel szétválasztható minták mennyisége és térfogata viszonylag igen kicsi, ezért a szeparált komponensek detektálása ultraérzékeny kijelzőket igényel.

A kapillár elektroforézis sajátos előnyei Compton és Brownlee (1988) szerint:

- gyorsaság (percek alatt teljes elválasztást adhat)
- felbontóképessége (nagy hatékonyságú frakcionálási módszer, amelyben az elválasztás élességét csupán a diffúzió limitálja)
- érzékenység (attomolnyi detektálás is lehetséges)
- kis minta mennyiség (nanoliterek illetve nanogrammok elegendőek)
- minimális reagens szükséglet
- a detektálási módszerek széles választéka:
 - UV/VIS (Jorgenson, 1984),
 - fluoreszcens detektálás (Green és Jorgenson, 1986),
 - konduktometria (Huang et al., 1989),
 - tömeg-spektroszkópia (Lee et al., 1989),
 - elektrokémia (Wallingford és Ewing, 1987),
 - termooptika (Yu és Dovichi, 1988) stb.
- automatizálhatóság

A kapillár elektroforézis alapjában analitikai technika. Egyrészt azért, mert az alkalmazott mintamennyiség általában csekély, nanogrammszintű, másrészt, mert az ilyen kis mennyiségeknek az elválasztás utáni összegyűjtése és kinyerése rendkívül nehéz. Talán a megfelelő mintagyűjtési módszerek fejlődése új utat nyithat majd a kapillár elektroforézisen alapuló mikro-preparatív szeparálás előtt (Rose & Jorgenson, 1988).

A kapillár elektroforézis vitathatatlan előnyei mellett az érzékenysége igen nagy. Figyelmet kell fordítani a nem kívánt fizikai-kémiai kölcsönhatások kiküszöbölésére, az elektromos mező egyenletességére és a szeparálás nagy sebessége miatt a kapillárisokban keletkező hő elvezetésére, a rendszer hűtésére.

A jelenlegi kapillár elektroforézis technológiai alapjai már az 1980-as években ismertek voltak (Mikkers et al., 1979b). A módszer nem csupán az analitikai jellegű kutatásban használható, hanem lényeges szerepe van a klinikai alkalmazásban (Fujiwara és Honda, 1987) és a fehérje-kutatás széles területén is (Kilár, 1991, 1989; Jokl et al., 1989).

A kapillár elektroforézis, mint szeparálási technika, rendkívül hatékony, az elválasztás során igen nagy elméleti tányérszám érhető el. Elvileg a módszer igen sokféle molekula elválasztására és detektálására is alkalmas (Cheng és Dovichi, 1988). A kapillár elektroforézist legelőnyösebben a fehérjeanalízisben, ill. a peptid-térkép, a "fingerprint" meghatározásában használják, ami minden fehérjére sajátosan jellemző (Cobb és Novotny, 1989). Humán szérumfehérjék elválasztásáról Manabe és munkatársai (1989) számoltak be teljesen automatizált kapillár izotachoforézissel.

A kapillár elektroforézis irodalmát és fejlődését több összefoglaló mű jelzi (Gordon et al., 1988; Ewing et al., 1989; Widmer, 1989; Thormann et al., 1989).

Elektroforetikus elválasztás két dimenzióban

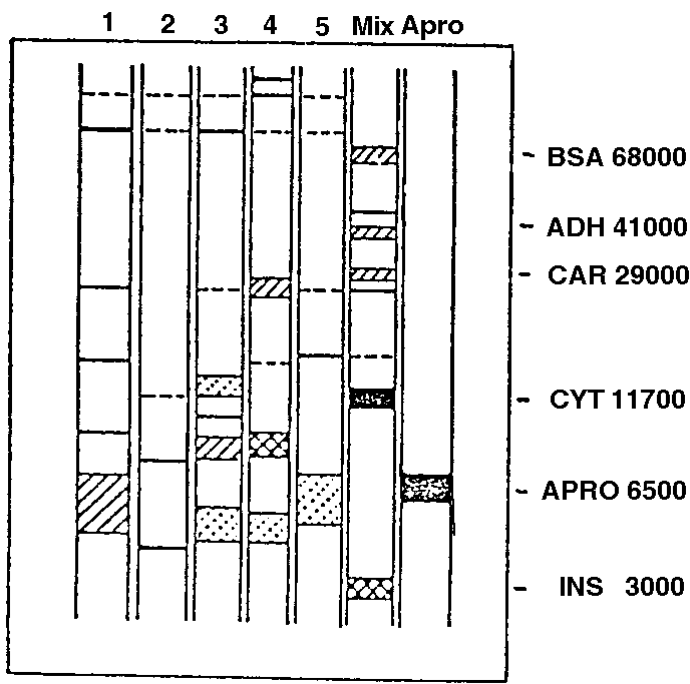
Az elektroforetikus elválasztástechnika egyik fejlődési iránya a két-dimenziós szeparálás volt. A kétdimenziós peptid-térképek elkészítése a fehérje-ill. a peptid-kutatást fellendítette. Cobb és Novotny (1989) kazein immobilizált tripszines hidrolizátumából kapillár elektroforézis alkalmazásával készítettek nagy érzékenységű peptid-térképet.

Az elektroforetikus módszerek alkalmazásának néhány eredménye a fehérjekutatásban

A fehérjék és a peptidok amfiprotikus molekulák, ezért frakcionálásukra és szerkezetváltozásuk nyomon követésére az elektroforetikus módszerek kiválóan alkalmasak.

SDS jelenlétében végzett poliakrilamid gélelektroforézissel (Weber és Osborn, 1975) sikerült igazolni, hogy **az enzimes peptidmódosítás (EPM) folyamán transzpeptidáció** játszódik le (Delincée és Hajós, 1984). Saját vizsgálataink során (Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe; KÉKI, Budapest) az SDS-fehérje arányt az irodalmi elvárások szerint (Weber és Osborn, 1975) alkalmaztuk, a szeparálást urea tartalmú gélben végeztük és a peptidsávokat ezüstoffestési módszerrel (Merril et al., 1982) jeleztük.

A gélelektroforetogramok (2. ábra) azt jelzik, hogy az enzimes peptidmódosítási reakcióban főként transzpeptidáció játszódik le, de meghatározott körülmények között a kondenzációs reakciók is jelentőssé válhatnak.

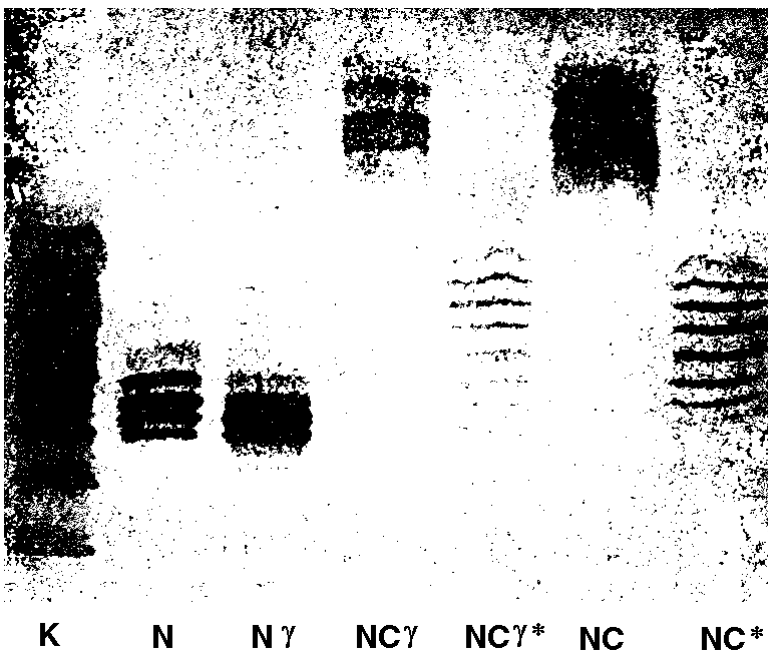


- 1 - a kazein enzimes hidrolizátuma dialízis nélkül
- 2 - a pronázkatalízissal nyert EPM-termék
- 3 - az α -kimotripszines katalízissal kapott EPM-termék
- 4 - a papainos katalízissal nyert EPM-termék
- 5 - a kazein enzimes hidrolizátuma dialízis után

2. ábra: EPM-termékek molekulatömeg eloszlásának SDS-PAGE elektroforetogramja

Az izoelektromos fókuszálás a legnagyobb felbontóképességű módszerek egyike a fehérjék elválasztásában. A lehetséges legelősebb sávelválasztás eléréséhez azonban mindig az adott mintának megfelelő körülményeket kell megválasztani. Az IEF körülményeit többféle típusú fehérjeszerkezet kimutatásában vizsgáltuk, melyekre néhány példát mutatunk be.

A fehérjék vizsgálatában a **védőcsoportok felvitelének és azok lehasításának nyomon követésére** az IEF alkalmas módszerek bizonyult (3. ábra).



- K: kontroll fehérjekeverék
- N: kezeletlen ribonukleáz (RN-áz)
- NY: besugárzott RN-áz
- NCY: citrkonilsavanhidriddel védett aminocsoportú besugárzott RN-áz
- NCY*: a védőcsoportok lehasítása utáni besugárzott RN-áz
- NC: citrkonilsavanhidriddel védett aminocsoportú RN-áz
- NC*: a védőcsoportok lehasítása utáni RN-áz

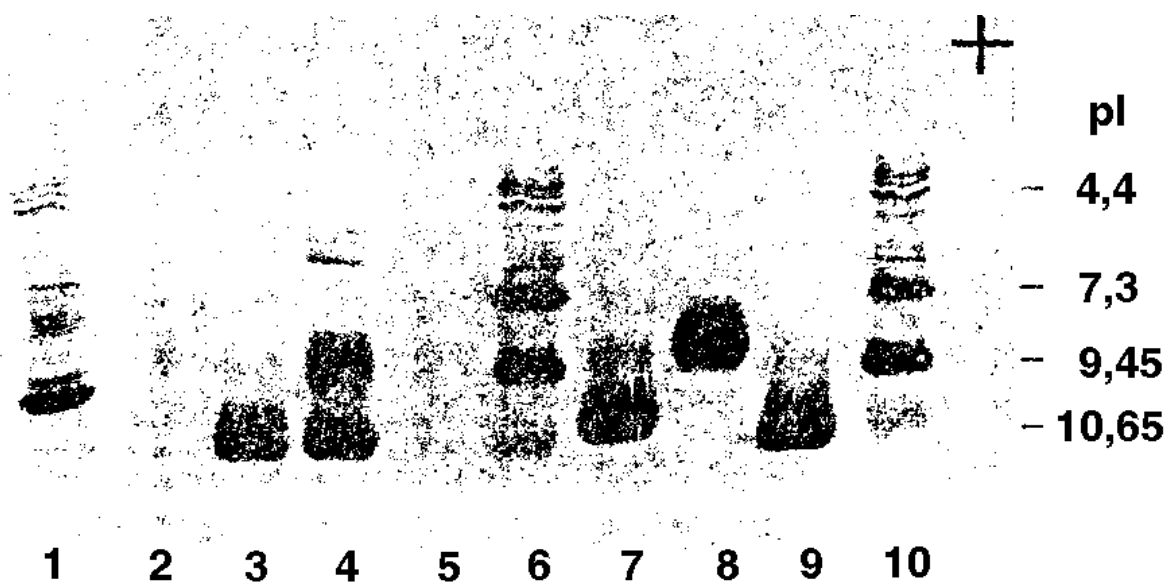
3. ábra: Fehérjék szerkezetváltozásának nyomon követése IEF-el védőcsoportok felvitelére és lehasítására

Az elektroforetogramon nyomon kísérhető a besugárzott ribonukleáz (Hajós és Delincée, 1983) zónáinak változása citrakonilsavanhidriddel védett aminosz csoportokkal és a védőcsoportok lehasítása után.

Globuláris fehérjék szerkezetében γ -besugárzás hatására bekövetkező változásokat izoelektromos fókuszálással sikerült nyomon követni (Hajós és Delincée, 1983). Ebben az esetben a fehérjék tripszines hidrolizátumait Sephadex vékonyrétegen a plazminos hidrolizátumokat pedig agaróz rétegen tudtuk a legsikeresebben elválasztani.

A 0,8 % agaróz IEF-et (Pharmacia) 10 % sorbitot (Pharmacia), 2 % amfolitot tartalmazó szuszpenziót 0,8 mm vastagságban vittük fel GelBond film (Pharmacia) 8x10 cm-ére. A futtatást 2,5 órán keresztül 13°C-on (50 V - 1000 V) végeztük, és a gélhez 6 M ureát is adtunk mivel kísérleteink szerint ez még élesebb sávelválást eredményezett (Hajós és Delincée, 1983). A fehérjék festését az amfolitok eltávolítása után Coomassie Brilliant Blue G-250-el végeztük (Radola, 1973).

Az izoelektromos fókuszálás segítséget nyújtott a mongol juh és kecske eredetű pankreáz készítményből származó **tripszin** és **kimotripszin tulajdonságainak** vizsgálatában is (Zhigzihiddorzhin és munkatársai, 1985). Az eredményeket a 4. ábra mutatja.



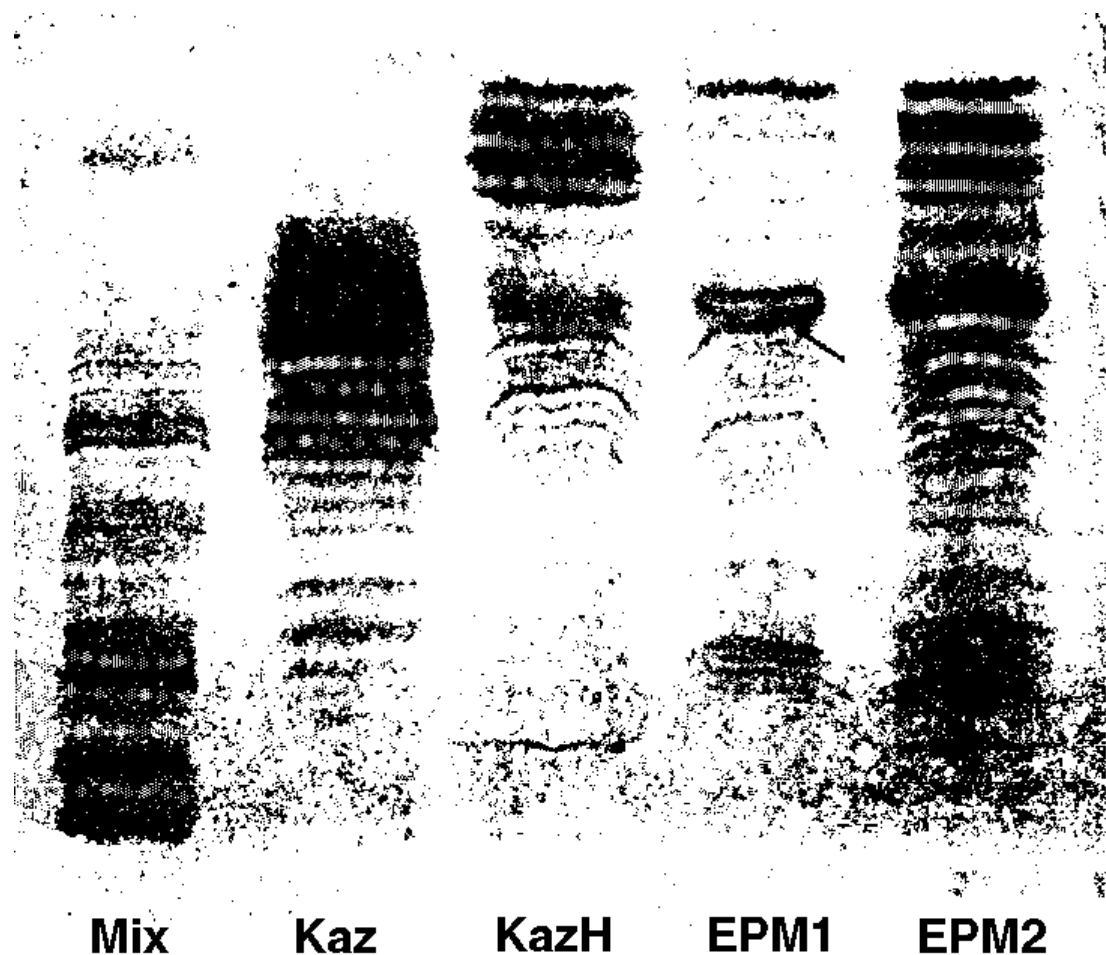
1, 10: kontroll fehérjék	2, 5: juh és kecske eredetű kimotripszin
3, 7: juh és kecske eredetű tripszin	4: pankipszin (Ulan-Bator, Húskombinát)
8: kristályos kimotripszin (Reanal)	9: kristályos tripszin (Merck)

4. ábra: Pankreáz készítmény tripszin és kimotripszin összetételének vizsgálata izoelektromos fókuszálással

Újabban az izoelektromos fókuszálást **könnyfehérjék elválasztásában** is alkalmaztuk. Úgy választottuk meg az IEF körülményeit, hogy a szem különböző

megbetegedései esetén a könnyfehérjék összetételében jelentkező változásokat nyomon tudjuk követni (Tapasztó és munkatársai, 1987).

Az **enzimes peptidmódosítás reakciómechanizmusának és az aminosavbeépülés** a vizsgálatához mind Sephadex, mind agaróz vékonyréteget használtunk. A 5. ábrán látható elválasztás esetén (Sephadex IEF) az EPM lejátszódását és a metionin kovalens beépítését vizsgáltuk. Az elektroforetogramokat denzitóméterhez kapcsolt számítógépes módszerrel is kiértékeljük (Hajós et al., 1989). A 6. ábra az EPM 2 minta esetében az elektroforetikus elválasztás grafikus ábrázolását a homológ és nem-homológ zónákkal együtt szemlélteti.

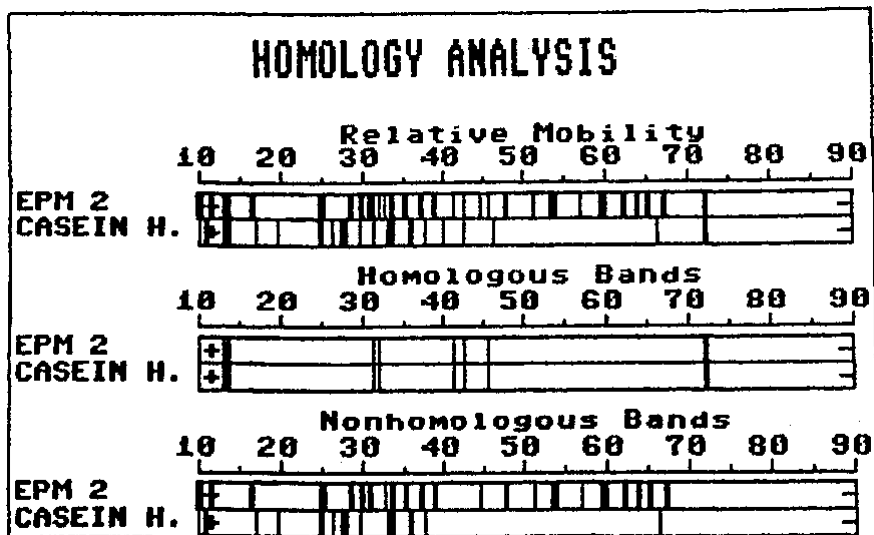


Mix: Kontroll fehérje keverék	Kaz: Kazein
KazH: Kazein α -kimotripszines hidrolizátuma	
EPM1: Kazein α -kimotripszines hidrolizátumából α -kimotripszin jelenlétében készített EPM termék	
EPM2: Kazein α -kimotripszines hidrolizátumából metionin beépítéssel készített EPM termék	

5. ábra: EPM termékek izoelektromos fókuszálása Sephadex vékonyrétegen

Eredményeink szerint mindkét EPM termék fehérje-frakcióinak töltés szerinti elválasztása jelentősen különbözött a kazein hidrolizátumáétól. Mivel előző vizsgálataink szerint (Delincée és Hajós, 1984) a peptidfrakciók átlagmolekulatömegében jelentősebb változást nem tudtunk kimutatni, ezért ezeket az

itt kapott különbségeket transzpeptidáció eredményeként valószínűsítjük. A nem-homológ zónák tekintélyes száma mindkét reakció-termék esetében (akár aminosav beépítéssel, akár anélkül játszódtott le az enzimes peptidmódosítás) azt jelzi, hogy a transzpeptidáció során nagyszámú peptidkötés hasadt el és alakult ki (Hajós, 1986).



6. ábra: EPM minta elektroforetikus elválasztásának grafikus ábrázolása a homológ és nem-homológ zónákkal együtt

Az elektroforetikus módszerek alkalmazása élelmiszerfehérjék kimutatásában

Az élelmiszeranalitika területén az utóbbi két évtizedben igen nagy szerepet kaptak az elektroforetikus módszerek a fehérjék vizsgálatában, izolálásában, tisztításában, valamint a növényi- és állati eredetű fehérjék jellemzésében egyaránt. Elektroforézissel kimutathatók az idegen fehérjék az élelmiszerekben, és a fehérjék változásai is nyomon követhetők.

Halférfjék

A halfajták elektroforetikus azonosításában a fehérje elválasztási kép alapján Lundstrom (1983) igen értékes eredményeket kapott. Egyes halfajták megkülönböztetését sikerült ebben az időben gélelektroforézissel megoldani (Payne, 1963; Thompson, 1967; Chu, 1968). A 70-es évek végén az izoelektromos fókuszálás alkalmazása (Kaiser és mtsai, 1980) hal- és húsmintákra jelentős fejlődést hozott az azonosítás biztonságában. A fókuszálás módszerét 1981 óta az USA-ban hivatalos vizsgálati módszerként is bevezették halfajták azonosítására (Willet és mtsai, 1981).

A konzervált haltermékek megkülönböztetésére urea jelenlétében végzett izoelektromos fókuszálást dolgoztak ki (Rehbein, 1983).

Húsfehérjék

Giles már 1962-ben keményítőgél-elektroforézissel meg tudta különböztetni a marha, a borjú, a disznó, a bárány, a juh és a nyúl szakroplazma-fehérjéit (Giles, 1962). Az állati termékek azonosítására a poliakrilamid gélelektroforézist Höyem és Thorson (1970) vezette be a mioglobinzónák szeparálása alapján. A húsminták előkészítésében a pufferes extrahálás fontos szerepet játszik. Őz és szarvas húsfehérjéinek megkülönböztetéséhez az észterázmintázatot javasolták (Heinert és Klinger, 1980; Thompson, 1968). PAGE módszerrel Kaiser és munkatársai (1980) 14 melegvérű és 18 hidegvérű állat fehérjemintázatának összehasonlító vizsgálatát végezték el.

Az izoelektromos fókuszálás alkalmazása az elválasztási módszer felbontóképességét jóval megnövelte (Rubach et al., 1978) a húsfehérjék területén is. Tinbergen és Olsman már 1976-ban izoelektromos fókuszálást vezetett be egyes húsminták vizsgálatára. Acetonporos mintaelőkészítéssel nyers és hőkezelt húsokat egyaránt vizsgálták. Ureás extrakcióval nem csak a szarkoplazma-fehérjéket, hanem a miofibrilláris fehérjéket is szeparálták. A különböző elektroforetikus elválasztási technikák előnyeit, ill. hátrányait a vizsgálandó húsminták esetén figyelembe kell venni (King & Kurth, 1982; Kaiser et al., 1982).

A legújabb kutatási eredmények szerint a hőkezelt húsok és hústermékek fehérjéinek izoelektromos fókuszálása alapján jól azonosítható a hús eredete marha, sertés, ló, bárány, szarvas és még néhány más hús-fajta esetében (Hofmann és Blüchel, 1991).

Mann és Bauer (1991) azt vizsgálták, hogy húsfajták szarkoplazma-fehérjéinek elektroforetikus viselkedése hogyan változik meg tárolás, sózás és hőkezelés hatására. Az elektroforetikus módszerek alkalmazhatóságának határait mérték fel hústermékek és húsok fajtaazonosításának területén, melynek során megállapították, hogy a húsok sózása és hőkezelése erősen befolyásolja a fehérjeterképet.

Húsfajták gyors elektroforetikus fajta-azonosítási módszeréről Mann és munkatársai (1991) számoltak be hét állat húsfehérjéinek összehasonlításával.

Idegen fehérjék kimutatása húсарukban

A húskutatásban a húsfehérjék azonosítása és eredetvizsgálata mellett jelentős szerepet játszik a növényi és egyéb állati eredetű fehérjék kimutatása is. Az adalékfehérjéket egyrészt a húsipari termékek funkcionális sajátságainak javítása, másrészt a húsfehérjék olcsóbb fehérjékkel való helyettesítése céljából alkalmazzák. Az adott húsfehérjéktől eltérő eredetű fehérjéket elsősorban elektroforetikus módszerekkel mutatják ki (Olsman és Hitchcock, 1980, és Llewellyn és Flaherty, 1976).

A szója- és a húsfehérje arány kvantitatív meghatározására többféle módszert dolgoztak ki SDS-PAGE (Armstrong et al., 1982) és urea jelenlétében

végzett PAGE (Válas-Gellei, 1981) segítségével, míg mások egy-egy szójazóna kiválasztásával végeztek mennyiségi meghatározást (Molander, 1982).

Gabonafélék

Cooke (1984) az "Electrophoresis" c. folyóiratban számos irodalmat gyűjtött össze a gabonafélék fehérjéinek elektroforetikus módszerekkel való szétválasztásáról.

E technikák között PAGE, SDS-PAGE, IEF és kétdimenziós eljárások (IEF-PAGE) egyaránt szerepelnek (Windemann et al., 1973).

A sörgyártáshoz Lubiniecki (1981) SDS-PAGE technikát dolgozott ki a maláta-fehérjék ellenőrzésére.

Téli és tavaszi búzafajták 22 közeli variánsát tudták megkülönböztetni a búzaliszt gliadin frakciók izoelektromos fókuszálásával (Kaiser és Krause, 1985).

Zöldség - gyümölcs

Görg (1973) zöldségek és gyümölcsök összehasonlító vizsgálatát végezte el elektroforetikus technikák alkalmazásával. A fajták megkülönböztetéséhez és a minősítések finomítására a vizsgált minták fehérje elektroforetogramjai mellett a specifikus enzim-printeket is elkészítette.

Burgonya

Stegemann és munkatársai 1973-ban összefoglalták a burgonya-fehérjék elektroforetikus elválasztási technikáit, melyek közül sokat genetikai tanulmányok alapjául alkalmaztak. Stegemann és Loeschke (1976) PAGE segítségével ezernél több európai burgonyamintát vizsgáltak meg. Fajtaazonosítási atlaszukban a fehérje-printek mellett az észterázferogramokat is megadták.

Növényi olajok

Napraforgó albumin-tartalma és fő globulin-frakciója IEF és PAGE eljárással Schwenke et al. (1973, 1974) szerint jól jellemezhető.

Hüvelyesek

Zöldborsó, bab és szója fehérjéinek vizsgálatára elektroforetikus elválasztás-technikát alkalmazott Cooke (1984), valamint Görg és munkatársai (1983).

Mogyorófélék

Kaiser és Krause (1985) SDS-PAGE segítségével a hüvelyesek, a tejfehérje frakciók, a mandula és a mogyorófajták fehérje-mintázatait sikerrel tudta megkülönböztetni. Ureát tartalmazó poliakrilamid gélben való izoelektromos fókuszálással jól elválaszthatók a mogyorófélék, a mandula és egyes szója-frakciók is.

Tejfehérjék

A kazein és a savófehérjék különböző elektroforetikus technikákkal összetevőikre (α_S -, β -, κ -, γ -kazein, α -laktalbumin, β -lactoglobulin, szérumalbumin, immunoglobulinok) bonthatók (Aschaffenburg 1964, Schleusener et al., 1982, Josephson, 1972, Triev-Cuot és Gripon 1981). Az elektroforetogramok alapján a különböző állatfajták (tehén kecske, juh stb.) tejei egymástól jól megkülönböztethetők.

A sajt-gyártás folyamán nagyon hasznos az elektroforetikus módszerek segítségével nyomon követni a sajt érésére jellemző, egyes kazeinzónák megváltozását.

A különböző sajtajtók érésének igazolására és minőségének jellemzésére Krause és Belitz (1982) kétdimenziós elektroforézist dolgoztak ki. PAGE-vizsgálatokkal mutatták ki nyerstejben a tej saját enzimei által katalizált kazein-hidrolízist is (Reimerdes, 1979).

Bican és Blanc (1982) kétdimenziós elektroforézis segítségével összefüggést tudtak kimutatni a tej hőkezelési eljárása és a savófehérjék peptidterképe között.

Az elektroforetikus technikák jövője

Az elektroforézis további fejlődése sokféle irányt vehet. Alapvető igény lesz a komputeres kiértékelésre és valószínűleg előnyt élvez az a módszer, amelynél az elválasztott frakciók kinyerése is megoldható. Elsősorban annak a technikai vonalnak a megerősödése várható az elektroforetikus módszerek közül, amely a fehérjék lehető legélesebb szeparálását segíti elő és új távlatokat nyit meg a biokémiai, klinikai és élelmiszeralitikai vizsgálatokban.

Az elektroforézis várhatóan jelentős szerepet fog betölteni az élelmiszervehérjék meghatározásában és a minőségellenőrzés folyamatában mind a fogyasztói érdek, mind a biztonságos és az egészségmegőrző táplálkozás védelmében.

Irodalomjegyzék

- Andrews, A.T. (1988): Electrophoresis. Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications, Oxford Science Publications, Clarendon Press, Oxford, 1988.
- Armstrong, D.J., Richert, S.H., Riemann, S.H. (1982): The determination of isolated soybean protein in raw and pasteurized meat products, J. Food Technol, 17, 327
- Aschaffenburg, R. (1964): Protein phenotyping by direct polyakrylamide-gel electrophoresis of whole milk, Biochem. Biophys. Acta, 82, 188-191.
- Bican, P., Blanc, B. (1982): Peptide analysis of whey proteins-A comparison of raw, pasteurized and UHT treated milk Milchwissenschaft, 37, 69-71.
- Bishop, R. (1979): Current major application areas in electrofocusing, Sci. Tools, 26 (1), 2-8.
- Bosisio, A.B. (1981): Molecular weight distribution of carrier ampholytes for isoelectric focusing, J. Chromatogr. 209, 265-272.

- Cheng, Y.F., Dovichi, N.J. (1988): Laser-induced fluorescence detection using the sheath-flow cuvette for capillary zone electrophoresis, *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, 910; Fluorescence Detection 2, 112-115. Bellingham, WA, SPIE.
- Chu, R. (1968): Fish and other Marine products; Identification of Commercially used Fish Found in the Pacific by Disk Electrophoresis, *J. Assoc. Off Anal. Chem.* 51, 743-746.
- Chua, K.E., Crossmann, E.J., Gilmore, C.A. (1978.): Lactate dehydrogenase (LDH) isozymes in muscle of freshwater fish by isoelectric focusing in thin-layer polyacrylamide gel, *Sci. Tools* 25 (1), 9-11.
- Cobb, K.A., Novotny, M. (1989): High-sensitivity peptide mapping by capillary zone electrophoresis and microcolumn liquid chromatography, using immobilized trypsin for protein digestion, *Anal. Chem.* 61, 2226-2231.
- Compton, S.W., Brownlee, R.G. (1988): Capillary Electrophoresis Bio Techniques, 6 (5), 432-437.
- Consden, R., A.H. Gordon and A.J.P. Martin (1946): Ionophoresis in Silica Jelly, *Biochem. J.* 40, 33-41.
- Cooke, R.J. (1984): The characterization and identification of crop by electrophoresis, *Electrophoresis* 5, 59-72.
- Coolidge, T.B. (1939): A Simple cataphoresis apparatus, *J. Biol. Chem.* 127, 551-554.
- Delincée, H., Hajós, Gy. (1984): Investigation of Plasteins by "SDS" Polyacrylamide Gel Electrophoresis, *Acta Alimentaria*, 13 (4), 309-313.
- Delmotte, P. (1977): Analysis of complex protein mixtures by capillary isotachopheresis-some qualitative and quantitative aspects *Sci. Tools* 24, 33-41.
- Ewing, A.G. , Wallingford, R.A. , Olefirowicz, T.M. (1989): Capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 61, 292 A - 294 A.
- Fujiwara, S., and S. Honda (1987): Effect of addition of organic solvent on the separation of positional isomers in high voltage capillary zone electrophoresis, *Anal. Chem.* 59, 487-490.
- Giles, B.G. (1962): Species differences observed in the sarcoplasmic proteins of mammalian muscle, *J. Sci. Food. Agric.*, 13, 264-268.
- Gordon, M.J., Huang, X., Pentoney, S.L. Jr., Zare, R.N. (1988): Capillary electrophoresis , *Science*, 242, 224-228.
- Görg, A. (1973): Dissertation, TU München.
- Görg, A., Postel, W., Westermeier, R., Bjellquist, B., Ek, K., Gianazza, E., Righetti, P.G. (1983); In: Stathakos D. (ed) *Electrophoresis '82*. De Gruyter W, Berlin, New York, p. 353.
- Görg, A., Postel, W., Weser, J. , Günther, S. , Strahler, J.R. , Hanash, S.M. , Somerlot, L. and Kuick, R. (1988): *Electrophoresis* 9, 37-46.
- Green, J.S., Jorgenson, J.W. (1989): Minimizing adsorption of proteins on fused silica in capillary zone electrophoresis by the addition of alkali metal salts to the buffers. *J. Chromatogr.*, 478, 63-70.
- Green, J.S., Jorgenson, J.W. (1986): Variable-Wavelength on Column Fluorescence Detector for Open-Tubular Zone Electrophoresis *J. Chrom.* 352 , 337-343 .
- Hardy, W.B. (1899): Movement of globulins in an electric field. *J. Physiol.* 24, 288.
- Hajós, Gy. and H. Delincée (1983): Structural investigation of radiation induced aggregates of ribonuclease. *Int. J. Radiat, Biol.* Vol. 44, N.4. 333-342.
- Hajós, Gy. (1986): *Élelmiszerfehérjék módosítása proteázokkal*. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest
- Hajós, Gy. (1990): *Laboratóriumi megfigyelések*

- Hajós, Gy., Halász, A., Békés, F. (1989): Designed protein modification by enzymatic technique, *Acta Alimentaria*, 18 (3), 325-330.
- Hay, J.D., Currie, R.W., Wolfe, F.H. (1973): Polyacrylamide disc gel electrophoresis of fresh and aged chicken muscle proteins in sodium dodecylsulfate, *J. Food Sci.* 38, 987-990.
- Heinert, H.H., Klinger, A. (1980): Tierartspezifische Eiweissdifferenzierung. Protein- und Enzymmuster bei Reh (*Capreolus capreolus*) und Hirsch (*Cervus elaphis*). *Fleischwirtschaft*, 60, 1682-1683.
- Hjerten, S., S. Jerstedt and A. Tiselius (1965): Electrophoretic particle sieving in polyacrylamide gels as applied to ribosomes. *Anal. Chem.* 11, 211-218.
- Hofmann, K., Blüchel, E. (1991): 37th International Congress of Meat Science and Technology, Sept. 1-6, Kulbach; Congress Proceedings, Vol. 3., p. 1151-1154.
- Høyem, T., Thorson, B. (1970): Myoglobin Electrophoretic Patterns in Identification of Meat from Different Animal Species. *J. Agric Food Chem.* 18, 737-739.
- Huang, X., Luckey, J.A., Gordon, M.J., Zare, R.N. (1989): Quantitative analysis of low molecular weight carboxylic acids by capillary zone electrophoresis/conductivity detection. *Anal. Chem.*, 61, 766-770.
- Jokl, V., Vitkovic, B., Polasek, M. (1989): Phase-heterogeneous zones in capillary isotachopheresis of low-solubility bases. *J. Chromatogr.*, 470, 263-275.
- Jorgenson, J.W. (1984): Zone electrophoresis in open tubular capillaries. *Trends in Anal. Chem.* 3, 51-54.
- Josephson, R.V. (1972): Isoelectric Focusing of Bovine Milk Caseins *J. Dairy Sci.* 55, 1535-1543.
- Kaiser, K.P., Matheis, G., Kmita-Dürmann, C., Belitz, H.D. (1980): Proteindifferenzierung mit elektrophoretischen Methoden bei Fleisch, Fisch und abgeleiteten Produkten, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 171, 415-419.
- Kaiser, K.P., Matheis, G., Schweiger-Recknagel, D., Belitz, H.D. (1982): Proteindifferenzierung mit elektrophoretischen Methoden bei Fleisch, Fisch und abgeleiteten Produkten, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, 13-17.
- Kaiser, K.P., Krause, I. (1985): Analytik von Proteinen in Lebensmitteln mit elektrophoretischen und chromatographischen Verfahren, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 180, 181-201.
- Kendall, J., and E.D. Crittenden (1923): The separation of isotopes., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 9, 75-78.
- Kilár, F. (1991): High performance capillary electrophoresis. Theoretical background and applications in protein research. 3rd ICBS, Sopron, Abstracts, 129-130.
- Kilár, F., Hjerten, S. (1989): Fast and high resolution analysis of human serum transferrin by high performance isoelectric focusing in capillaries. *Electrophoresis*, 10, 23-29.
- King, N.L., Kurth, L. (1982): Analysis of Raw Beef Samples for Adulterant Meat Species by Enzyme- Staining of Isoelectric Focusing Gels, *J. Food Sci.* 47, 1608-1612.
- Krause, J., Belitz, H.D. (1982): Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie Garching, Bericht, S. 31.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature (London)* 227, 680, 685.
- Lee, E.D., Muck, W., Henion, J.D., Covey, T.R. (1989): Capillary zone electrophoresis /tandem mass spectrometry for the determination of sulfonated azo dyes., *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 18, 253-257.

- Llewellyn, J.W., Flaherty, B. (1976): The detection and estimation of soya protein in food products by isoelectric focusing *J. Food Technol.* 11, 555-563.
- Lodge, A. (1886): D.A Report (Thesis)
- Lubiniecki, J. (1981): Dissertation, TU München
- Lundstrom, R.C. (1983): Fish and other Marine products Identification of Pacific Rockfish (*Sebastes*) Species by Isoelectric Focusing, *J. Assoc Off Anal. Chem* 66, 974, 980
- Manabe, T., Yamamoto, H., Okuyama, T. (1989): Fully automated capillary isotachopheresis of proteins. *Electrophoresis* 10, 172-177.
- Mann, M. and Bauer, F. (1991): 37th International Congress of Meat Science and Technology, Sept 1-6, Kulmbach; Congress Proceedings, Vol 3., 1163-1166.
- Mann, M., Bauer, F. and Rossmannith, W. (1991): 37th International Congress of Meat Science and Technology , Sept. 1-6 , Kulmbach; Congress Proceedings, Vol. 3., 1167-1170.
- Merril, C.R. , Goldman, D. and Van Keuren, M.L. (1982): Simplified silver protein detection and image enhancement methods in polyacrylamide gels. *Electroforesis*, 1, 17-23.
- Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M., Peek, J.A.F. (1979a): Isotachopheresis: the concepts of resolution, load capacity and separation efficiency I., II., *J. Chromatogr.*, 168, 293-332.
- Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M., Verhetgen, Th. P.E.M. (1979b): High-performance zone electrophoresis; *J. Chromatogr.*, 169, 11-20.
- Molander, E. (1982): Determination of Soya Protein in Meat Products by Standard Curves Obtained from SDS Gel Electrophoresis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, 278-281.
- Oakley, B.R., Kirsch, D.R., Morris, N.R. (1980): A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.*, 105, 361-363.
- Olsman, W.J., Hitchcock, C.H.S. (1980): In: King R.D. (ed) *Developments in food analysis techniques*, Vol. 2. Appl. Sci. Publ. London, p. 225.
- Payne, W.R. (1963): Protein Typing of Fish, Pork, and Beef by Disc Electrophoresis, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 46, 1103-1105.
- Picton , H. , Linder, S. Ernest (I 897): Solution and Pseudo-solution. Part III. The Electrical Convection of certain Dissolved Substances., *J. Chem. Soc.* 71, 568-574.
- Porath, J. (1956): Methodological studies of zone-electrophoresis in vertical columns I. Fractionation in cellulose powder columns of substances of low molecular weight exemplified by amino acids and related compounds, *Biochim, Biophys. Acta*, 22, 151-175.
- Radola, B.J. (1973): Isoelectric focusing in layers of Granulated gels I. Thin-layer isoelectric focusing of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 295, 412-528.
- Radola, B.J. (1980): *Electrophoresis '79. Advanced Methods, Biochemical and Clinical Applications*, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1980.
- Reimerdes, E.H. (1979): Model proteolysis of β -casein by immobilized trypsin, *J. of Dairy Research* 46, 223-226.
- Rehbein, H. (1983): In: Radola, B.J. (ed) *Elektrophorese forum '83 München*, p. 271.
- Repásová, L., Plonsky, J., Kosik, M., Vodny, S. (1984): Isotachopheresis of Organic Acids after Oxydation of Hydrolytic Products of some Monosaccharides, *J. Chrom.* 286, 347-351.
- Righetti, P.G., Pagani, M. and Gianazza, E. (1975): Characterization of synthetic carrier ampholytes for isoelectric focusing, *J. Chromatogr.* 109, 341, 356.

- Righetti, P.G., Chillemi, F. (1978): Isoelectric Focusing of peptides J. Chromatogr. 157, 243-251.
- Righetti, P.G. (1983): Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Applications, Elsevier, Amsterdam
- Righetti, P.G. (1985): Isoelectric focusing: theory, methodology and applications. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
- Rose, D.J., Jorgenson, J.W. (1988): Fraction collector for capillary zone electrophoresis, J. Chromatogr. 438, 23-34.
- Rubach, K., Kirchhoff, E., Breyer, C. (1978): LKB-Producter AB Bromma, Schweden
- Schleusener, R., Kirst, E., Sienkiewicz, T. (1982): Elektrophoresesysteme zur Untersuchung der Milchproteine, Milchforsch. Milchpraxis, 24 (4), 94-97.
- Schwenke, K.D., Raab, B., Jhlig, J., Tkocz, H., Behlke, J., Boltger, M., Freimuth, U. (1973): Über Samenproteine 3. Mitt. Isolierung und Charakterisierung der Albumine aus Sonnenblumen- und Rapssamen, Nahrung 17, 791-809.
- Schwenke, K.D., Schultz, M., Linow, K.J., Uhlig, J., Franzke, C. (1974): Über Samenproteine 4. Mitt. Isolierung der Globulin-Hauptkomponente aus Sonnenblumensamen, Nahrung 18, 709-719.
- Schwerin, B. (1914): Reviewed in: Elektrophorese, elektroosmose, elektrodialyse in flüssigkeiten, by P.H. Pratusnitz and J. Reitsotter, Dresden u. Leipzig 1931.
- Smirnow (1892): Berl. klin. Woch. 32, 645.
- Stegemann, H., Francksen, H., Macko, V. (1973): Potato Proteins: Genetic and Physiological Changes, Evaluated by One- and Two-dimensional PAA-Gel-techniques., Z. Naturforsch. 28/c, 722-732.
- Stegemann, H., Loeschke, V. (1976): Index Europäischer Kartoffelsorten. Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt, Heft 168, P Parey Berlin, Hamburg
- Switzer, R.C., Merril, C.R., Shifrin, S. (1979): A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels., Anal. Biochem. 98, 231-237.
- Svensson, H. (1962): Isoelectric Fractionation, Analysis and Characterization of Ampholytes in Natural pH Gradients II. Buffering Capacity and Conductance of Isoionic Ampholytes, Acta Chem. Scand. 16, 456-466.
- Szeszák, F., Békési, I., Vitális, S., Szabó, G. (1991): Separation and analysis of the regulatory protein factor C and other basic proteins by the application of a novel type ampholyte carrier., 3rd ICBS, Sopron, Abstracts, 102.
- Tapasztó, I., Hajós, Gy., Boross, F. (1987): Examination of lachrymal proteins in external and internal eye diseases by SDS-PAGE and isoelectric focusing., Dakryologia, First Meeting, Budapest
- Thompson, R.R. (1967): Disk Electrophoresis Method for the identification of Fish Species, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 50, 282, 285.
- Thompson, R.R. (1968): An enzymatic (Esterase) Method For Identification Of Animal and Fish Species, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 51, 746-748.
- Thormann, W., Firestone, M.A., Dietz, M.L., Cecconie, T., Mosher, R.A. (1989): Focusing counterparts of electrical field flow fractionation and capillary zone electrophoresis. Electrical hyperlayer field flow fractionation and capillary isoelectric focusing, J. Chromatogr. 461, 95-101.
- Tinbergen, B. J., Olsman, W. J. (1976): Isoelektrische Fokussierung als eine Technik zur Speziesidentifizierung in der Lebensmittelüberwachung, Fleischwirtschaft 56, 1495-1498.

- Tiselius, A. (1930): The moving boundary method of studying the electrophoresis of proteins. Inaugural Dissertation University of Upsala, Sweden
- Tiselius, A. (1937): A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures, *Trans. Faraday Soc.* 33, 524-531.
- Trieu-Cuot, P., Gripon, J.C. (1981): Casein hydrolysis by *Penicillium caseicolum* and *P. roqueforti* proteinases: a study with isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis, *Neth. Milk Dairy J.* 35, 353-357.
- Válas-Gellei, Á. (1981): Quantitative determination of milk and soya proteins in meat products, *Acta Alimentaria*, 10, (3), . 187-199.
- Vámos -Vigyázó, L. (1967): *Papirelektroforézis*. Műszaki Könyvkiadó, Budapest
- Vesterberg, O. (1969a): Synthesis and Isoelectric Fractionation of Carrier Ampholytes, *Acta Chem. Scand.* 23, 2653-2666.
- Vesterberg, O. (1969b): Separation of proteins from Carrier Ampholytes, *Sci. Tools*, 16 (2), 24-27.
- Vesterberg, O. (1976): In: *Isoelectric Focusing*; Catsimpoolas, N. ed. (Academic Press, New York). 53-76.
- Vesterberg, O. (1978): Isoelectric focusing. A review of analytical techniques and applications, *Am. Lab.* 10, 6 13-14.
- Vinogradov, S.N., Lowenkron, S., Andonian, M.R., Bagshaw, J., Felgenhauer, K. and Pak, S.J. (1973): Synthetic Ampholytes for the Isoelectric Focusing of Proteins, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 54, 501-506.
- Wallingford, R.A., and A.G. Ewing (1987): Capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. *Anal. Chem.* 59, 1762-1766.
- Weber, K., and Osborn, M. (1969): The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.
- Weber, K. and Osborn, M. (1975): *The Proteins*. Ed. Neurath, J. & Hill R.L. Academic Press, New York - San Francisco - London, 1, 179-223.
- Widmer, H.B. (1989): Neochromatographic technologies: I. Capillary electrophoresis, *Chimia* 43, 134-141.
- Windemann, H., Müller, U., Baumgartner, E. (1973): Isoelektrische Fokussierung und zweidimensionale Auftrennung einer wasserlöslichen Proteinfraktion von Hart- und Weichweizen aus Teigwarenprodukten, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 153, 17-22.
- Willet, D.N. , Campbell, A.D. , Coffin, D.E. , Johnson, R. , O'Donell, M.W. (1981): Report of Committee C on Recommendations for Official Methods, *J. Assoc Off Anal. Chem.* 64, 425-429 .
- Wilson, C.M. (1979): Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins: Impurities in Amido Black Used for Staining, *Anal. Biochem.* 53, 538-544.
- Yu, M., Dovichi, N.N. (1988): Sub-femtomole determination of DANSYL-amino acids with capillary zone electrophoresis separation and laserinduced thermo-optical absorbance detection, *Mikrochim. Acta* 111, 27-40.
- Zahringer, J., Baliga, B.S., and Munro, H.N. (1976): Novel mechanism for translational control in regulation of ferritin synthesis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 73, 857-861.
- Zhigzhiddorzhin, A., Hajós, Gy. and Vámos-Vigyázó, L.(1985): Separation of, and investigation into the properties of trypsin and chymotrypsin from and ovine+caprine pancreatic enzyme preparation, *Acta Alimentaria*, Vol. 14, (3), 267-282.
- Zelensky, I., Zelenská, D., Karriansky, D., Havasi, P., Lednárová, V. (1984): Determination of Inorganic Anions in River Water by Column-Coupling Capillary Isotachophoresis, *J. Chrom.* 294, 317-327.

Elektroforézis és alkalmazása az élelmiszerfehérjék elválasztásában

Hajós Gy.

A szerző rövid áttekintést ad az elektroforézis történelmi előzményeiről és vázolja a főbb elektroforetikus technikák (a mozgó határfelületek módszere, kötött elektroforézis, izotachoforézis és izoelektromos fókuszálás) alapjait. Elemzi a kapillár elektroforézis célszerűségét és alkalmazhatóságát, valamint a kétdimenziós elválasztás néhány eredményét mutatja be a fehérje, illetve a peptid-kutatás különböző területeiről. Felhívja a figyelmet arra, hogy milyen alapvetően fontosak az elektroforetikus módszerek az élelmiszerfehérjék kimutatásában és azonosításában. Az elektroforetikus technikáknak várhatóan nagy szerepe lesz a jövőben a fehérje-kutatás területén és az élelmiszerfehérjék minőségének meghatározásában egyaránt.

Electrophoresis and its application in separating food proteins

Hajós, Gy.

The author gives a short review on the historical antecedents of the electrophoresis and outlines the basis of the main electrophoretic techniques (method of moving boundary, zone electrophoresis, isotachopheresis and isoelectric focusing). Expedience and adaptability of the capillary electrophoresis as well as possibilities for the two-dimensional separation are also analyzed. Some achievements of the application of the electrophoretic methods are demonstrated in the various fields of the protein and peptid research. She emphasizes, what an essential importance have the electrophoretic methods in the detection and identification of the food proteins. Electrophoretic techniques will probably play in the future a significant role both in the field of protein research and in specifying the quality of food proteins.

Die Elektrophorese und ihre Anwendung bei der Trennung von Lebensmitteleiweißstoffen

Hajós Gy.

Verfasser gibt einen kurzen Überblick über die Vorgeschichte der Elektrophorese und erläutert die Grundlagen der wichtigeren Elektrophorese - Techniken: Verfahren der Bewegungsgrenzflächen, Zonenelektrophorese, Isotachophorese und die isoelektrische Focussierung. Die Zweckmäßigkeit und Anwendbarkeit der Kapillarelektrophorese sowie auch die Möglichkeiten der zweidimensionalen Trennung werden analysiert. Einige Ergebnisse der Anwendung von elektrophoretischen Methoden werden auf verschiedenen Gebieten der Eiweiß- und Peptidforschung dargestellt. Dabei wird auf die Bedeutung der elektrophoretischen Methoden beim Nachweis und für die Identifizierung von Lebensmitteleiweißstoffen hingewiesen. Der Elektrophorese kommt erwartungsgemäß künftig große Bedeutung auf dem Gebiet der Eiweißforschung und bei der Bestimmung der Qualität von Lebensmitteleiweißstoffen zu.