

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 74 (1983)

Heft: 2

Artikel: HPLC-Auftrennung von Peptiden aus Casein von Kuh- und Ziegenkäse = Analysis of peptides from casein of cow and goat cheese by high performance liquid chromatography

Autor: Tobler, M. / Windemann, Helena / Baumgartner, E.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-983006>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 09.01.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

HPLC-Auftrennung von Peptiden aus Casein von Kuh- und Ziegenkäse

Analysis of Peptides from Casein of Cow and Goat Cheese
by High Performance Liquid Chromatography

M. Tobler, Helena Windemann und E. Baumgartner
Institut für Lebensmittelchemie der Universität, Bern

Einleitung

Die neuen Bestimmungen der eidgenössischen Lebensmittelverordnung über «Ziegenkäse», «Halbziegenkäse» und «Käse mit Zugabe von Ziegenmilch» können erst überwacht werden, wenn hierfür entsprechende Methoden zur Verfügung stehen.

Im Rahmen einer Dissertation (1) versuchten wir, eine geeignete und zuverlässige Methode zur Erfassung der Anteile eines Käses an Kuh- und Ziegenmilch zu entwickeln. Die elektrophoretische Auftrennung der Käsecaseine erwies sich hierbei als stark reifungsabhängig, so daß sich die Methode nur auf frischen Käse anwenden ließ (1).

Aufgrund einer Überlegung von *Reimerdes* (2), daß die spezifischen Sequenzgegebenheiten für die Analytik der Proteine ausgenützt werden können, versuchten wir die HPLC-Auftrennung von Peptiden, die aus dem Casein der verschiedenen Milch- und Käsesorten mittels tryptischer Spaltung erhalten werden. Dabei zeigte sich, daß sich die Peptidspektren von Kuh- und Ziegencasein in charakteristischer Weise unterscheiden und daß die Chromatogramme der Peptide aus den untersuchten Käseproben eine Altersunabhängigkeit zeigen.

Dies soll im folgenden belegt werden. Wie weit sich die Chromatogramme quantitativ auswerten lassen, wird das Thema einer späteren Arbeit sein.

Material und Methoden

Material

Reiner Ziegen- und reiner Kuhkäse (Typ Camembert) der Reifungsdauer 1 und 15 Tage wurden von der Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld-Bern, hergestellt. Die fertigen Käse wurden bis zur Analyse bei -32°C aufbewahrt.

Caseinisolierung

Die Isolierung von Casein aus Ziegenmilch erfolgte nach Angaben von *Zittle* und *Custer* (3) sowie *Richardson* et al. (4), diejenige von Kuhcasein nach *Davies* und *Law* (5).

Die Caseine aus Käse wurden in Anlehnung an die Arbeiten von *Assenat* (6) zweimal mit 0,1 m Essigsäure (pH 4,5) gefällt. Die Caseinsedimente wurden direkt, d. h. ohne Entfettung mit Tetrachlorkohlenstoff, für die Trypsinspaltung verwendet.

Caseinfraktionierung

Die α - und β -Caseine aus Ziegen- und Kuhmilch wurden mittels Ionenaustausch-Chromatographie isoliert. Die Fraktionierung von Ziegen- und Kuhcasein erfolgte in zwei Reinigungsschritten. In der ersten Stufe wurden die Caseine auf CM-52 Cellulose (Whatman) vorfraktioniert. Die Caseine wurden mit einem Ionenstärkegradienten von 0,00–0,07 m NaCl in 6,6 m Harnstoff, 0,01 m Citronensäure und 0,05% β -Mercaptoethanol (pH 3,7) eluiert und auf ihre Reinheit elektrophoretisch geprüft.

Die α - und β -Caseine von Kuhmilch sowie β -Casein von Ziegenmilch waren elektrophoretisch uneinheitlich und wurden in einer zweiten Stufe mittels Anionenaustauschchromatographie auf die DEAE-Sephacel (Pharmacia) weiter gereinigt. Hier erfolgte die Elution mit einem Ionenstärkegradienten von 0,0–0,3 m NaCl in 6,6 m Harnstoff, 0,01 m Natriumphosphat und 0,05% β -Mercaptoethanol (pH 7,2).

Elektrophorese

Die Elektrophorese der Caseine erfolgte nach *Foissy* (7). In Abänderung seiner Trennbedingungen betrug die Acrylamidkonzentration im Trenngel 8,5%. Ferner wurden 0,1% Triton-X-100 zugesetzt.

Trypsinspaltung der Caseine

Die Spaltung mit Trypsin erfolgte grundsätzlich nach *Roy* (8) mit folgenden Modifikationen:

30–40 mg der isolierten Caseine (α - und β -Casein, Gesamtcasein aus Milch und aus Käse) wurden in 8 ml 0,05 m Diammoniumhydrogenphosphatpuffer (pH 8,1) gelöst oder suspendiert und während 60 s in siedendem Wasser gehalten. Die Spaltung mit Trypsin (für bioch. Zwecke, TPCK-behandelt, 3,5 U/mg, Merck) erfolgte bei einem Enzym-Substratverhältnis von ca. 1:100 während 16 Stunden bei 37 °C. Die Lösung wurde anschließend während 8 min in kochendem Wasser erhitzt und nach Abkühlen durch ein 0,22 μ Membranfilter filtriert.

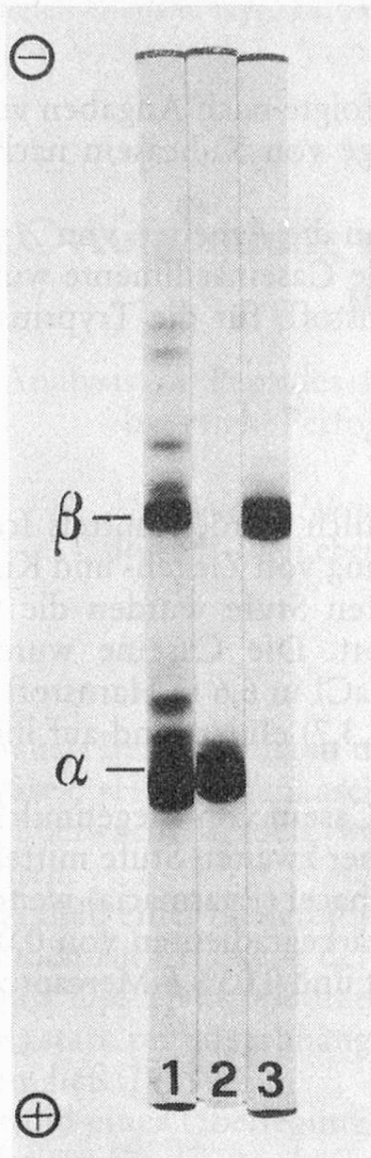


Abb. 1. Elektrophoretische Untersuchung der Reindarstellung von Kuh- α - und Kuh- β -casein nach der DEAE-Sephacel Anionenaustauschchromatographie
 1 = Kuhtotalcasein (Kontrolle)
 2 = Kuh- α -casein
 3 = Kuh- β -casein
 Zuordnung der Caseinbanden gemäß Wake und Baldwin (9)

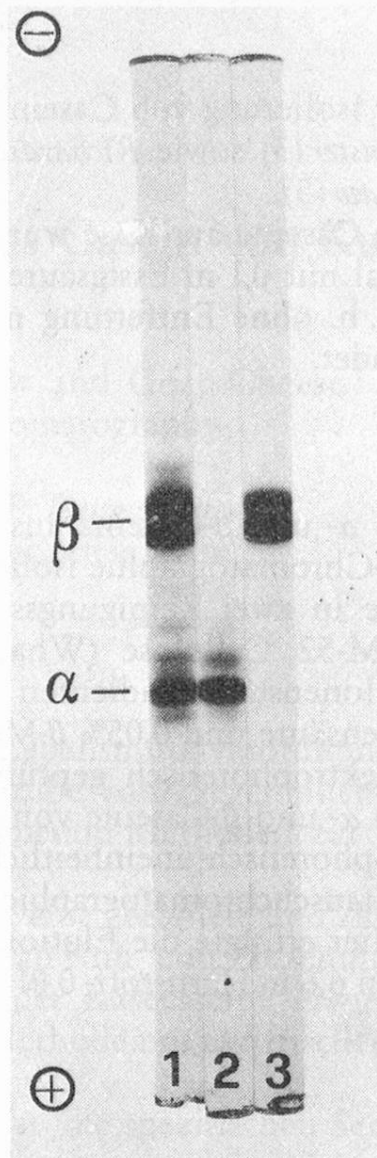


Abb. 2. Elektrophoretische Untersuchung der Reindarstellung von Ziegen- α -casein mittels CM-52 Cellulose Kationenaustauscher und von Ziegen- β -casein mittels CM-52 Cellulose Kationenaustauscher und DEAE-Sephacel Anionenaustauscher
 1 = Ziegentotalcasein (Kontrolle)
 2 = Ziegen- α -casein
 3 = Ziegen- β -casein
 Zuordnung der Caseinbanden gemäß Richardson und Creamer (10)

Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Verwendet wurde ein Perkin-Elmer Hochdruckchromatograph Serie 2/2 mit automatischer Steuerung, ausgerüstet mit Rheodyne-Injektor (Modell 7125) und ein Perkin-Elmer LC-75 Spektrophotometer.

Die Auftrennung der Peptide wurde auf der Reverse-Phase Säule RP-300 (10 μ , 250 x 4,6 mm, Brownlee Labs) mit Vorsäule durchgeführt. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von 10–87% Eluent A im Eluent B. Der Gradientenverlauf ist aus der Abbildung 3 ersichtlich.

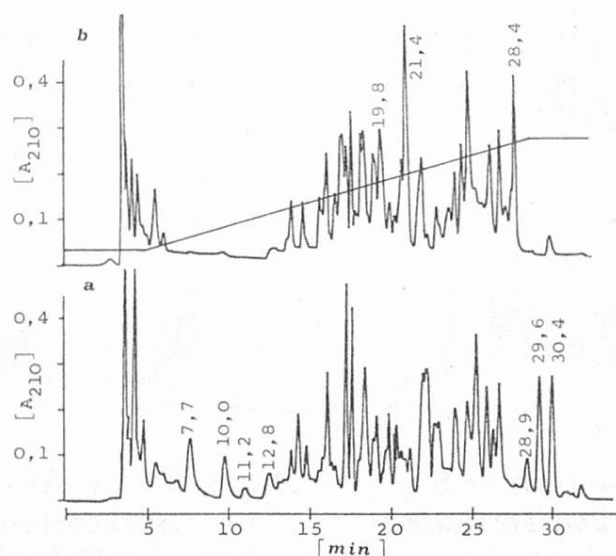


Abb. 3. HPLC-Analyse von tryptisch gespaltenem Ziegen- und Kuhtotalcasein (Die charakteristischen Peaks sind mit der Retentionszeit bezeichnet)
a = 36 mg Ziegentotalcasein gespalten
b = 36 mg Kuhtotalcasein
Chromatogramm b zeigt zusätzlich den Gradientenverlauf (5–43,5% Acetonitril)

Eluent A: 50% Acetonitril (Fluka, HPLC-Qualität)
50% Eluent B

Eluent B: 0,02% SDS, 0,02% Trifluoressigsäure, pH 5,5

Die Flußrate betrug 0,8 ml/min bei einer konstanten Temperatur von 25 °C. Die Detektion erfolgte bei 210 nm.

Resultate

Die elektrophoretische Reinheit der fraktionierten α - und β -Caseine aus Ziegen- und Kuhmilch ist mit den Abbildungen 1 und 2 belegt. Das Spektrum der Peptide aus tryptisch gespaltenem Ziegen- und Kuhcasein ist aus der Abbildung 3 ersichtlich. Die für Ziegen- bzw. Kuhcasein charakteristischen Peaks sind mit der

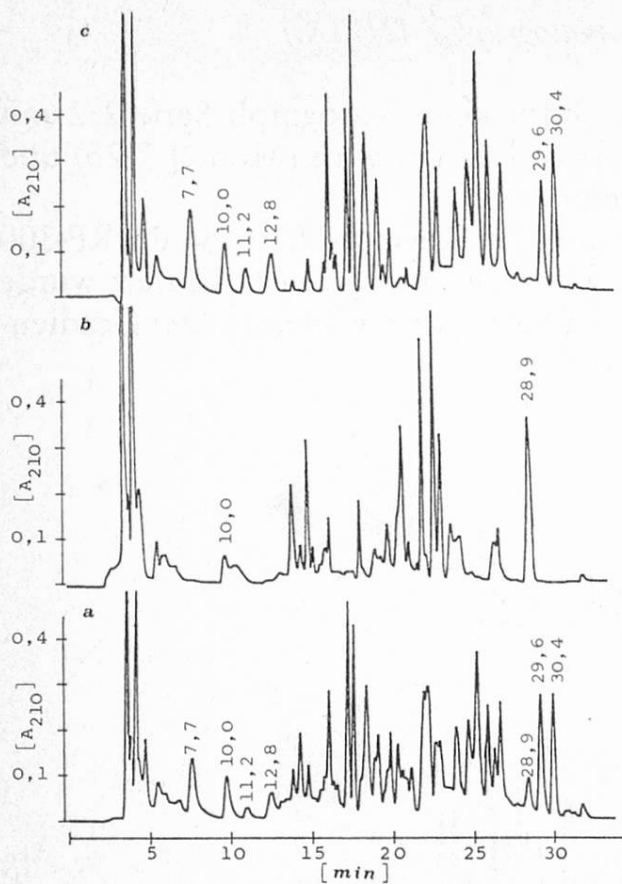


Abb. 4. HPLC-Analyse von tryptisch gespaltenem α -, β - und Totalcasein aus Ziegenmilch
 a = 36 mg Ziegentotalcasein gespalten
 b = 36 mg Ziegen- α -casein gespalten
 c = 36 mg Ziegen- β -casein gespalten

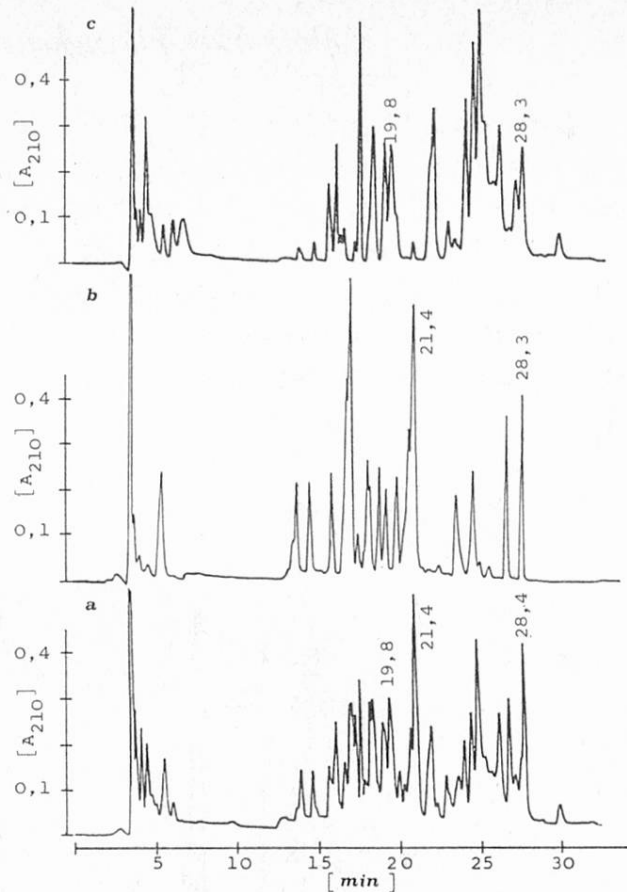


Abb. 5. HPLC-Analyse von tryptisch gespaltenem α -, β - und Totalcasein aus Kuhmilch
 a = 36 mg Kuhtotalcasein gespalten
 b = 36 mg Kuh- α -casein gespalten
 c = 36 mg Kuh- β -casein gespalten

dazugehörigen Retentionszeit bezeichnet. Die Abbildungen 4 und 5 geben zusätzlich Auskunft darüber, aus welchen Caseinkomponenten diese charakteristischen Peaks stammen:

beim Kuhcasein etwa gleichermaßen aus α - und β -Casein, beim Ziegencasein größtenteils aus dem β -Casein.

Nach der Untersuchung der reinen Caseine erfolgte die Auftrennung der tryptischen Spaltprodukte der aus Käse isolierten Caseine (Abb. 6 und 7). In dem Chromatogramm kommt deutlich zum Ausdruck, daß sich die charakteristischen Peptide aus Casein von Ziegen- und Kuhmilch auch im gespaltenen Käsecasein zu erkennen geben, und zwar sowohl im frischen als auch im reifen Käse. Es fällt auf, daß die Chromatogramme der gespaltenen reinisolierten Caseine und Käsecaseine eine gute Übereinstimmung zeigen.

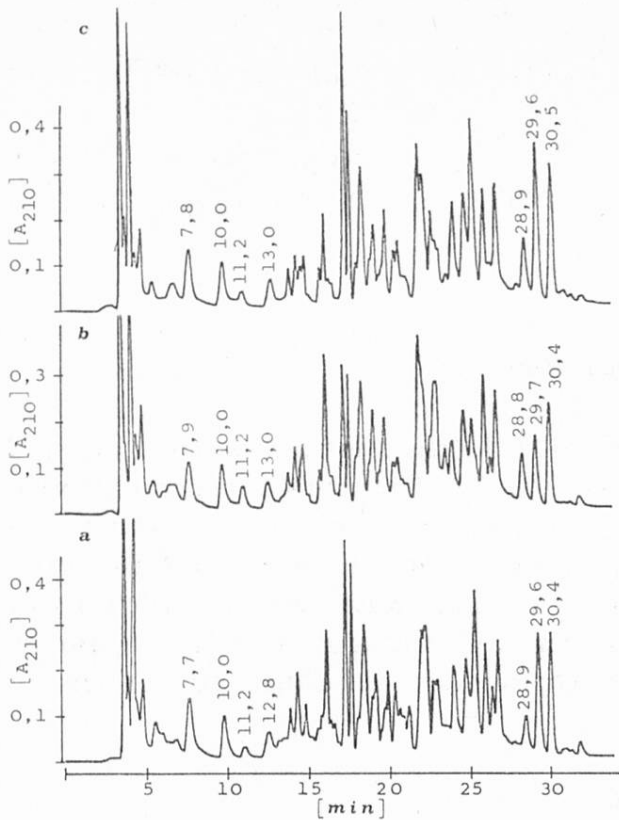


Abb. 6. HPLC-Analyse von tryptisch behandeltem Käsecasein (Ziegenkäse)
 a = Referenzchromatogramm:
 36 mg Ziegentotalcasein
 gespalten
 b = Peptidspektrum des reinen Ziegenkäses, 1tägig (Camembert)
 c = Peptidspektrum des reinen Ziegenkäses, 15tägig (Camembert)

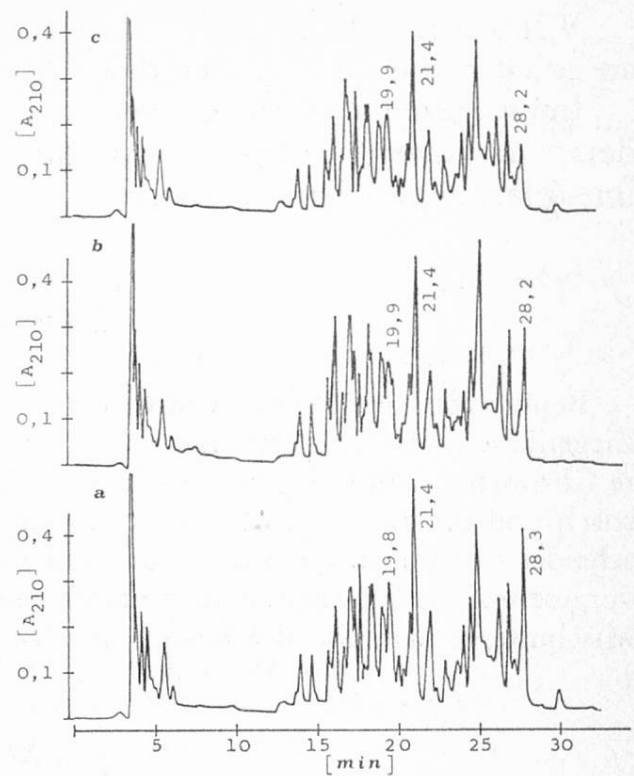


Abb. 7. HPLC-Analyse von tryptisch behandeltem Käsecasein (Kuhkäse)
 a = Referenzchromatogramm:
 36 mg Kuhtotalcasein
 gespalten
 b = Peptidspektrum des reinen Kuhkäses, 1tägig (Camembert)
 c = Peptidspektrum des reinen Kuhkäses, 15tägig (Camembert)

Diskussion

Die gute Reproduzierbarkeit der Caseinspaltung sowie der chromatographischen Auftrennung ist in den Abbildungen 3–7 klar dargelegt. Zusätzlich wurden die Caseine aus Kuh- und Ziegenmilch sowie aus Käse wiederholt tryptisch gespalten und die Peptide chromatographisch aufgetrennt. Unter gleichen experimentellen Trennbedingungen wurden charakteristische Spaltprodukte mit identischen Retentionszeiten erhalten.

Die tryptische Spaltung hat sich bei unseren Untersuchungen als geeignet erwiesen, Kuh- und Ziegenmilchcaseine auch im Käse zu unterscheiden. Besonders ist darauf hinzuweisen, daß im Gegensatz zu der Elektrophorese der Käsecaseine

hier die Reifung des Käses das Peptidspektrum kaum beeinflusst. Es wurden zudem unter den Kuh- und Ziegen-caseinpeptiden Fragmente gefunden, die zu deren Identifikation verwendet werden können.

Wir werden abklären, ob mit weiteren Untersuchungen an Modellkäsen und an solchen aus dem Markt diese Aussage bestätigt werden kann.

Im weiteren werden wir versuchen, die Peptidchromatogramme quantitativ derart auszuwerten, daß sich das Mischungsverhältnis Kuhmilch/Ziegenmilch im «Ziegenkäse» berechnen läßt.

Zusammenfassung

Beim tryptischen Abbau von Caseinen aus Kuh- und Ziegenmilch bzw. aus Kuh- und Ziegenkäse erhält man Peptidgemische, die bei der HPLC-Auftrennung gut reproduzierbare Chromatogramme ergeben. Diese sind für die Caseine der beiden Tierarten charakteristisch und gut unterscheidbar. Das Peptidspektrum des Caseins aus gereiftem Käse unterscheidet sich nur unwesentlich von demjenigen aus frischem Käse bzw. aus Milch. Es ist vorgesehen, die Chromatogramme einer quantitativen Auswertung zu unterziehen, um die Mischungsverhältnisse der beiden Milcharten auch im Käse berechnen zu können.

Résumé

Lors de la dégradation, par la trypsine, de la caséine du lait ou du fromage de vache et de chèvre, on obtient des mélanges de peptides, qui, par CLHP, donnent des chromatogrammes bien reproductibles; ces derniers sont caractéristiques pour les deux sortes de lait et de fromage. Les spectres des peptides d'un fromage frais et d'un fromage mûr sont pratiquement identiques. Il est prévu d'évaluer les chromatogrammes quantitativement afin de calculer les proportions de lait de vache et de chèvre dans les fromages.

Summary

Caseins from cow milk and cheese as well as from goat milk and cheese were digested with trypsin and analysed by HPLC. The resulting peptide maps were very similar for fresh and ripened cheese and for the corresponding milks and they were distinctly different for cow and goat casein. This preliminary finding could possibly be evaluated quantitatively to analyse the goat and cow milk content of cheeses.

Literatur

1. Tobler, M.: Untersuchungen zur Bestimmung des Kuhmilchanteils im Ziegenkäse. Inauguraldissertation, Universität Bern 1983.
2. Reimerdes, E. H.: Die Anwendung der HPLC zur Untersuchung von Eiweißzusätzen in Lebensmitteln. Lebensmittelchem. gerichtl. Chem. **34**, 75–76 (1980).
3. Zittle, C. A. and Custer, J. H.: Identification of the k-casein among the components of whole goat casein. J. Dairy Sci. **49**, 788–791 (1966).

4. Richardson, B. C., Creamer, L. K. and Munford, R. E.: The isolation and chemical characterization of caprine k-casein. *Biochim. Biophys. Acta* **310**, 111–117 (1973).
5. Davies, D. T. and Law, A. J. R.: An improved method for the quantitative fractionation of casein mixtures using ion-exchange chromatography. *J. Dairy Res.* **44**, 213 (1977).
6. Assenat, L.: Contribution à l'étude d'une méthode d'identification des laits et fromages au moyen de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide. *Lait* **467**, 393–414 (1967).
7. Foissy, H.: Über die Differenzierungsanalytik von Milch verschiedener Tiere. *Oesterr. Milchwirtsch. Beilage 2 zu Heft 3*, 5–8 (1976).
8. Roy, D.: Proteolysis of goat milk by trypsin in vitro. *Indian J. Dairy Sci.* **33**, 510–512 (1980).
9. Wake, R. G. and Baldwin, R. L.: Analysis of casein fractions by zone electrophoresis in concentrated urea. *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 225–239 (1961).
10. Richardson, B. C. and Creamer, L. K.: The isolation and chemical characterization of caprine β_1 -casein and β_2 -casein. *Biochim. Biophys. Acta* **365**, 133–137 (1974).

Dr. M. Tobler
 Dr. Helena Windemann
 Prof. Dr. E. Baumgartner
 Institut für Lebensmittelchemie
 der Universität Bern
 Freiestraße 1
 CH-3012 Bern