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

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 77 (1986)

Heft: 4

Artikel: Vergleich der Polyacrylamidgelelektrophorese von Caseinen und HPLC-Auftrennung der tryptisch abgebauten Caseine von verschiedenen Milch- und Käsearten = Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis of caseins and high performance liquid chromatograp...

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

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-983403

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. 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. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

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. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

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. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 12.07.2025

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

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 77, 565–582 (1986)
Eingegangen 9. April 1986. Angenommen 3. September 1986

Vergleich der Polyacrylamidgelelektrophorese von Caseinen und HPLC-Auftrennung der tryptisch abgebauten Caseine von verschiedenen Milch- und Käsearten

Comparison of Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Caseins and High Performance Liquid Chromatography of Tryptically Digested Caseins from Various Milks and Cheeses

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

Einleitung

Mit der zunehmenden Beliebtheit von Ziegen-, Schaf- und Stutenmilch sowie von daraus hergestellten Produkten, wie z. B. «Ziegenkäse», «Halbziegenkäse» (mindestens 50% Ziegenmilchanteil*), «Käse mit Zugabe von Ziegenmilch» (mindestens 25% Ziegenmilchanteil*»), «Schafkäse» usw., erhöht sich die Versuchung, die teuren, zudem in kleineren Mengen anfallenden Milcharten mit billigerer Kuhmilch zu strecken bzw. den Kuhmilchanteil über das deklarierte Ausmass zu erhöhen. Das Problem der analytischen Unterscheidung von Milcharten und die Ermittlung der Mischungsanteile insbesondere von Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch ist analytisch von zahlreichen Autoren angegangen worden. Es wurden dabei in erster Linie die Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der einzelnen Milcharten ausgenützt. Sowohl die Caseine wie auch die Molkenproteine der Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch weisen tierspezifische Komponenten auf, die sich elektrophoretisch oder immunologisch charakterisieren lassen. Aus Gründen der Thermostabilität werden meist die Caseine zur Differenzierung von Milcharten herangezogen (1–5), während beim Nachweis von Kuhmilch in Käsen auch die kuhspezifischen Molkenproteine Anwendung finden (6–8).

Die Bestimmung von Kuhmilchanteilen in anderen Milcharten (oder Käsen) wird durch die natürlichen Schwankungen in der Proteinzusammensetzung erschwert. Parameter, welche die Milchproteinzusammensetzung beeinflussen, wie z. B. Tierrasse, individuelle Veranlagung, Laktationsstadium, Fütterung usw., sind

* Änderung der eidg. Lebensmittelverordnung vom 25. November 1981, Artikel 84 Absatz 5.

gut untersucht worden (9–11). In Einzelmilchen können z. B. die α- und β-Kuhcaseingehalte erheblich schwanken (12). In den Mischmilchen gleichen sich die Extremwerte jedoch weitgehend aus. *Pierre* (12) gibt die diesbezügliche «Unsicherheitsspanne» in den Mischmilchen mit ± 10% an.

Im Käse werden zudem während der Käsereifung die Proteine proteolytisch abgebaut. Somit sind jeder Methode, bei der die quantitative Analyse der Milchmischungsverhältnisse über ein natives «Leitprotein» erfolgt, schon von vorneherein Grenzen gesetzt.

Eine andere Komponente, die sich heranziehen liesse, ist das Milchfett. Das Fett hätte an sich den Vorteil, von der Käsereifung weitgehend unabhängig zu sein (13, 14). Fettgehalt und Fettzusammensetzung schwanken jedoch stärker als Gesamteiweissgehalt und Eiweisszusammensetzung (3, 11), wobei insbesondere der Einfluss der Futterzusammensetzung auf die Fettsäuregehalte recht ausgeprägt ist (15). Zudem lässt sich mit dieser Methode kein Magermilchzusatz feststellen.

Tobler et al. (16) konnten zeigen, dass sich bei der HPLC-Auftrennung der Peptide aus tryptisch abgebauten Caseinen aus gereiftem Kuh- und Ziegenkäse die Chromatogramme nur unwesentlich von denjenigen aus frischem Käse bzw. Milch unterscheiden.

In der vorliegenden Arbeit haben wir nun versucht, mittels Polyacrylamidgelelektrophorese der Caseine (3, 4) und Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-(HPLC)Auftrennung der Caseinpeptide (16), die Kuhmilchanteile in gemischten Kuh-/Ziegenkäsen bekannter Zusammensetzung und von unterschiedlicher Reifungsdauer zu bestimmen. Ferner wurden die beiden Methoden zur Differenzierung von Milcharten herangezogen. Der Gedanke wäre nahegelegen, die Caseine bzw. Molkenproteine mittels RP-HPLC aufzutrennen und auf diese Weise die Milcharten und deren Milchgemische zu charakterisieren. Der Aufwand solcher Abklärungen muss indessen späteren weiteren Arbeiten vorbehalten bleiben.

Material und Methoden

- Ziegenkäse, Halbziegenkäse, Käse mit Zugabe von Ziegenmilch und Kuhkäse der Reifungsdauer 1–30 Tage, jeweils 6 identische Proben, wurden von der Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld, hergestellt.
- Rohe Ziegen-, Stuten- und Schafmilch sowie Schafkäse wurden im entsprechenden Betrieb erhoben. Die Totalprotein- bzw. Caseingehalte (Kjeldahl) betrugen:

Kuhmilch	3,81%	bzw.	3,04%
Ziegenmilch	3,47%	bzw.	2,67%
Schafmilch	5,81%	bzw.	4,19%
Frauenmilch	0,90%	bzw.	0,31%
Stutenmilch	2,10%	bzw.	1,40%

– Frauenmilch wurde uns freundlicherweise von Privatpersonen zur Verfügung gestellt.

Caseinisolierung

2,5 ml entfettete Milch oder 350 mg Käse (aus dem Zentrum des Laibes) mit 20 ml 0,1-m Essigsäure (pH 4,5) homogenisieren und 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen. Zentrifugieren (10 min, 24 100 × g), Sediment in 20 ml 0,1-m Essigsäure suspendieren, 10 min stehen lassen und wie oben beschrieben zentrifugieren. Die Caseinsedimente direkt für Polyacrylamidgelelektrophorese und für die Trypsinspaltung verwenden.

Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Elektrophorese der Caseine erfolgte nach *Foissy* (4) mit folgenden Modifikationen: Die Acrylamidkonzentration im Trenngel betrug 8,5%, ferner wurde 0,1% Triton-X (Fluka, Schweiz) zugesetzt. Die Caseinsedimente wurden in 5 ml 0,3-m Natriumphosphatpuffer pH 7,2 mit 7-m Harnstoff suspendiert (bei den Frauenmilchcaseinen in 2,5 ml) und davon wurden 5–10 μl auf die Rundgele $\emptyset$ = 5 mm, Länge = 10 cm) aufgetragen. Die Elektrophoresedauer betrug rund 5 Stunden bei einer Stromstärke von 2 mA/Rundgel. Die Intensitäten der gefärbten Banden wurden bei 640 nm ausgemessen und die Peakflächen manuell mit einem Planimeter bestimmt.

Trypsinspaltung der Caseine

Die Spaltung erfolgte wie bei *Tobler* et al. (16): Die Caseinsedimente in 20 ml 0,05-m (NH4)2 HPO4 (pH 8,1) suspendieren, zu 8 ml der Lösung 180 μl 0,2% Trypsinlösung zusetzen (Trypsin für biochemische Zwecke, TPCK-behandelt, 3,5 U/mg, Merck) und während 16 h bei 37 °C schütteln. Anschliessend während 8 min im siedenden Wasserbad erhitzen, abkühlen und durch ein 0,2 μ Membranfilter filtrieren.

HPLC-Auftrennung

Sie wurde gemäss *Tobler et al.* durchgeführt (16). Die Elution der Peptide von der RP-300-Säule (10 μ, 250 × 4,6 mm, Brownlee Labs.) erfolgte mit einem linearen Gradienten von 10–100% A in B.

Eluent A: 50% Acetonitril, 50% B. Eluent B: 0,02% SDS, 0,02% Trifluoressigsäure (pH 5,5). Die Flussrate betrug 1 ml/min, die Detektion erfolgte bei 210 nm. Verwendet wurde ein Perkin-Elmer Hochdruckchromatograph, Serie 2/2 mit au-

tomatischer Steuerung, ausgerüstet mit Rheodyne-Injektor (Modell 7125), Hewlett-Packard Integrator (HP-3390A) und ein Perkin-Elmer LC-75 Spektrophotometer. Es wurden 40–60 μl der Caseinpeptidlösung eingespritzt.

Ergebnisse

Polyacrylamidgelelektrophorese der Caseine

Milch

Die Elektropherogramme der Caseine aus Ziegen-, Schaf-, Stuten- und Frauenmilch sowie deren Mischungen mit Kuhmilch sind in den Abbildungen 1a–1d dargestellt. Die starke Bande der α_s-Caseine der Kuh stellt (im alkalischen System) die schnellste Caseinkomponente dar und eignet sich am besten zum Nachweis von Kuhmilch in Ziegen- und Schafmilch.

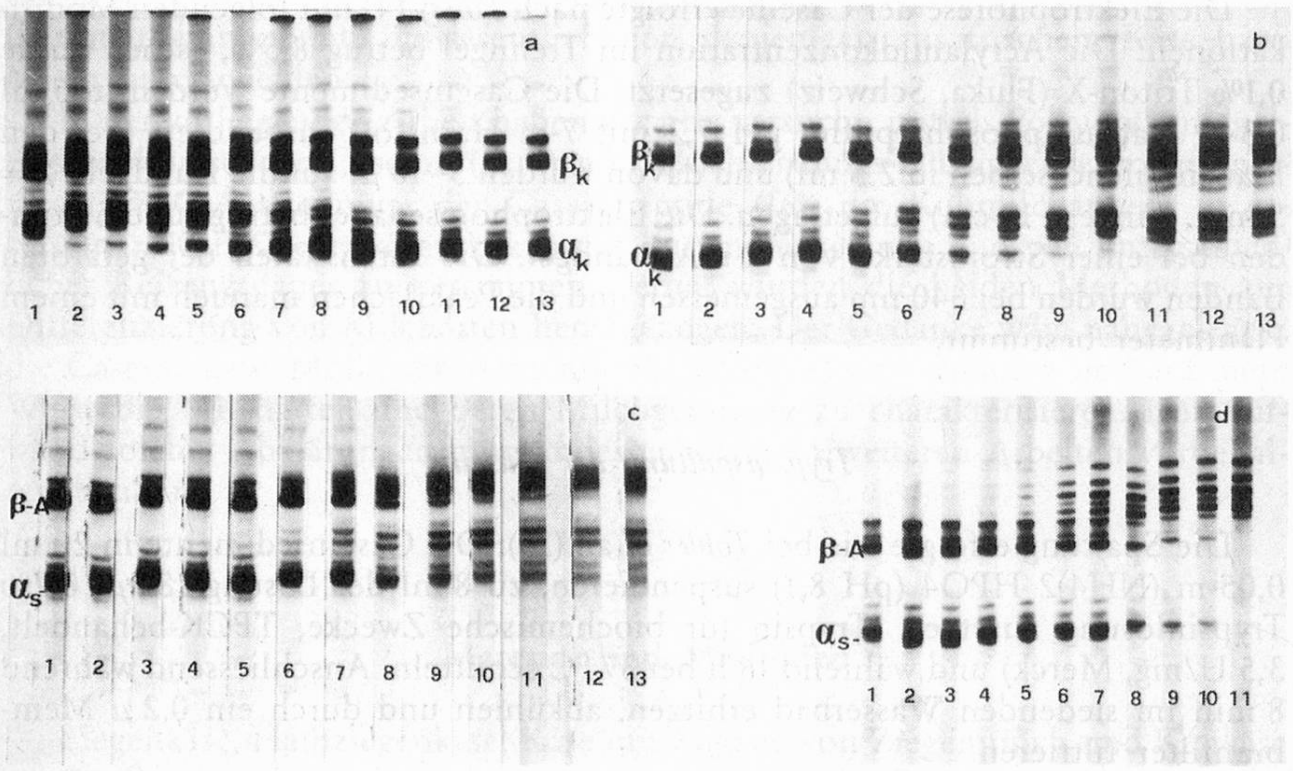

Abb. 1. Polyacrylgelelektrophorese der Caseine aus Ziegen-, Schaf-, Stuten- und Frauenmilch sowie deren Mischungen mit Kuhmilch

a) Caseine aus *Ziegen-* und Kuhmilch sowie deren Mischungen. Anteil von Kuhmilch (%), Nr. 1–13: 0; 1; 2; 5; 10; 25; 50; 75; 90; 95; 98; 99; 100

b) Caseine aus Kuh- und *Schafmilch* sowie deren Mischungen. Anteil von Kuhmilch (%), Nr. 1–13: 100; 99; 98; 95; 90; 75; 50; 25; 10; 5; 2; 1; 0

c) Caseine aus Kuh- und *Stutenmilch* sowie deren Mischungen. Anteil von Kuhmilch (%), Nr. 1–13: 100; 99; 98; 95; 90; 75; 50; 25; 10; 5; 2; 1; 0

d) Caseine aus Kuh- und *Frauenmilch* sowie deren Mischungen. Anteil von Kuhmilch (%), Nr. 1–11: 100; 98; 95; 90; 75; 50; 25; 10; 5; 2; 0

Zum Nachweis von Kuhmilch in Frauenmilch, deren Caseine unter den verwendeten Analysenbedingungen sehr kleine Mobilität aufweisen, kann sowohl die α_s- wie auch die β-A-Kuhcaseinbande herangezogen werden.

In den Caseinen aus Stutenmilch entspricht die Mobilität der schnellsten Caseinbande etwa derjenigen von α_s-Kuhcaseinbande, womit eine Unterscheidung schwierig wird (Abb. 1c). Zum Nachweis von kleinen Kuhmilchmischungen (1–2%) eignet sich die Kuh-β-A-Caseinbande wesentlich besser.

Wie die Abbildungen 1a–1d zeigen, lässt sich die Anwesenheit von bereits 1% Kuhmilch in Ziegen-, Stuten- und Frauenmilch deutlich nachweisen. Bei Schafmilch hingegen gelingt dieser Nachweis erst bei einem 5%igen Kuhmilchzusatz (Abb. 1b). Allerdings bewirkt der hohe Protein- bzw. Caseingehalt der Schafmilch (5,8% bzw. 4,2%), dass weniger Kuhcasein in das Gemisch kommt. Beim Mischen von Frauenmilch mit Kuhmilch liegt der Fall genau umgekehrt; bei 1% Kuhmilchanteil in Frauenmilch beträgt der Kuhcaseinanteil bereits rund 9%.

Bei *Zumischen von anderen Milcharten zu Kuhmilch* lassen sich für Ziegenmilch rund 5%, für Schafmilch 2%, für Stutenmilch 5% und für Frauenmilch 10% erkennen. Um die erwähnten Nachweisgrenzen, insbesondere bei den Mischungen von Ziegen- und Schafmilch einerseits, mit Kuhmilch andererseits, erreichen zu können, müssen allerdings die Gele «überladen» werden, so dass die feine Auftrennung der α- und β-Caseine der Hauptkomponente nicht mehr einwandfrei möglich ist (vgl. Abb. 1a und 5).

Die genauere *quantitative Ermittlung der Kuhmilchanteile* kann anhand der Bandenintensitäten (Peakflächen) der Kuh-α_s- und β-A-Caseinbande erfolgen. Um von der Methodik herrührende Einflüsse (aufgetragene Caseinmenge) auszuschliessen, wurde der α_s- bzw. β-A-Caseingehalt nicht als Absolutwert bestimmt, sondern relativ zu anderen Proteinen desselben Elektropherogramms. In den Mischungen von Ziegen- bzw. Schafmilch mit Kuhmilch sind dies die β-Caseine insgesamt (Peakverhältnisse γ), da die Kuh-β-Caseine von denjenigen der Ziege bzw. des Schafs schlecht abgetrennt werden (Abb. 2). In den Mischungen von Stuten- bzw. Frauenmilch mit Kuhmilch sind dies die β-Caseine der Stute bzw. der Frau (Abb. 2).

Diese Peakverhältnisse können in der ersten Näherung direkt als Funktion der Kuhmilchanteile dargestellt werden. Sie zeigen in einem bestimmten Konzentrationsbereich eine enge Korrelation mit dem Kuhmilchanteil (Korrelationskoeffizient $r = 0{,}98–0{,}99$), und zwar zwischen 5–96% in den Mischungen mit Ziegenmilch, zwischen 10–95% in den Mischungen mit Schafmilch, zwischen 5–50% in den Mischungen mit Stutenmilch und zwischen 2–20% in denjenigen mit Frauenmilch.

Genauere Bestimmung der Kuhmilchanteile in den Mischungen mit *Ziegen-* und *Schafmilch* kann nach der Methode von *Pierre* und *Portmann* (3) durchgeführt werden. Der Kuh-α_s-Caseingehalt einer unbekannten Probe wird dabei mit dem mittleren α_s-Caseingehalt von reiner Kuhmilch (α_MK) verglichen. Ferner wird die bereits erwähnte schlechte Abtrennung der β-Ziegen- bzw. β-Schafcaseine von β-Caseinen der Kuhmilch berücksichtigt. Hierzu ist die Kenntnis der mittleren β-Ziegen-bzw. β-Schafcaseingehalte in den entsprechenden reinen Milcharten

(β_MZ bzw. β_MS) sowie des mittleren β-Kuhcaseingehaltes von reiner Kuhmilch (β_MK) notwendig. Der Gehalt an α_s-Kuhcasein wird wiederum, wie vorher beschrieben, als das Peakverhältnis

$$\gamma = \frac{\alpha_s \text{ Casein Kuh}}{\beta \text{ Casein total}}$$

bestimmt.

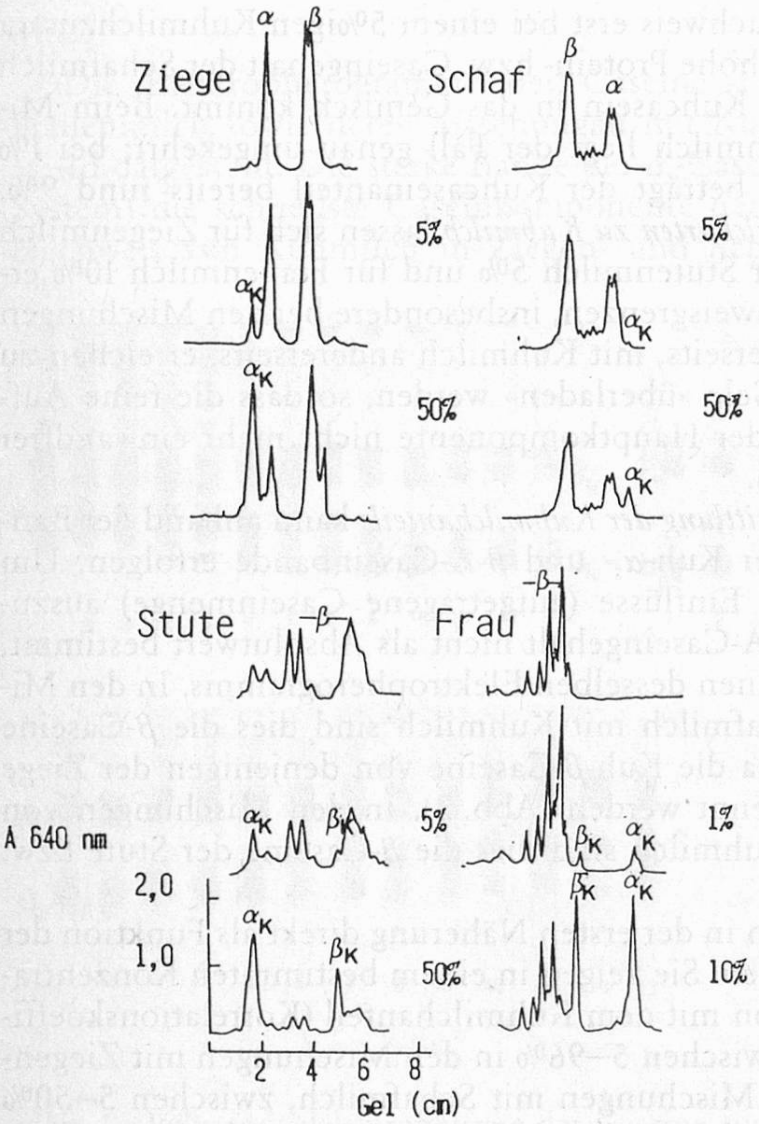

Abb. 2. Densitogramme der Caseine aus Ziegen-, Schaf-, Stuten- und Frauenmilch sowie deren Mischungen mit Kuhmilch. Die prozentuellen Kuhmilchanteile sowie die Caseinkomponenten sind im Bild bezeichnet

Die Berechnung der prozentualen Kuhmilchanteile in den Mischungen mit Ziegenmilch (und in analoger Weise in den Mischungen mit Schafmilch) wird nach der folgenden Formel durchgeführt:

$$X \text{ (Kuhmilchanteil in \%)} = \frac{100 \cdot \gamma \cdot \beta_M Z}{\alpha_M K - \gamma\,(\beta_M K - \beta_M Z)}$$

Die so berechneten Kuhmilchanteile in den Mischungen mit Ziegen- und Schafmilch (vgl. Abb. 1a und 1b) sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Die «mittleren» Gehalte an α_MK, β_MK, β_MZ und β_MS wurden für unsere Verhältnisse in der entsprechenden Milch wiederholt ($n = 5$) elektrophoretisch ermittelt (Tabelle 1).

Tabelle 1. Bestimmung der Kuhmilchanteile (%) in den Mischungen von Ziegen- bzw. Schafmilch mit Kuhmilch
Berechnung nach der Methode von *Pierre* und *Portmann* (3) unter Anwendung der in der entsprechenden Milch elektrophoretisch ermittelten Gehalte an α_MK = 44,8%, β_MK = 46,3%, β_MZ = 63,3% und β_MS = 55,3%

Kuhmilch-anteil % (Vol./Vol.)	Kuhcasein-anteil (%) Ziegenmilch	Kuhcasein-anteil (%) Schafmilch	Berechneter Kuhmilchanteil % Ziegenmilch		Schafmilch	
			γ	%	γ	%
5	6	4	0,05	7	–	–
10	13	8	0,09	12	0,07	8
25	28	20	0,21	27	0,17	20
50	53	42	0,47	56	0,37	43
75	77	69	0,71	79	0,64	70
90	91	87	0,88	93	0,82	87
95	96	93	0,94	98	0,89	93
100	100	100	1,02	104	0,98	101

Wie die Tabelle 1 zeigt, werden die effektiven Caseinanteile in den untersuchten Milchmischungen recht genau ermittelt. An 3 Tagen wurde je eine Doppelanalyse an jeder Milchmischung durchgeführt. Der mittlere Variationskoeffizient betrug in der Serie 3,6% und zwischen den Testen 7,5%.

Käse

In der Abbildung 3 finden sich die Densitogramme der Käse vom Typ Camembert, geordnet nach Alter und Zusammensetzung. Es fällt auf, dass bei allen Proben die Kuh- und Ziegen-α_s-Caseine rasch abgebaut werden. Die Abbauprodukte des α_s-Kuhcaseins sind bereits nach 3 Tagen Reifung deutlich sichtbar. Nach 30 Tagen überwiegen die Abbauprodukte die Reste des unveränderten α_s-Kuhcaseins bereits deutlich. Der Abbau der α_s-Caseine der Ziege ist nur an der Verminderung der entsprechenden Peakflächen zu erkennen; neue Peaks treten nicht auf. In Übereinstimmung mit den Befunden von *Pierre* und *Portmann* (3) sind somit im reinen Ziegenkäse keine Banden der Abbauprodukte des Ziegenmilchcaseins zu finden, welche den Nachweis von Kuh-α_s-Casein stören könnten.

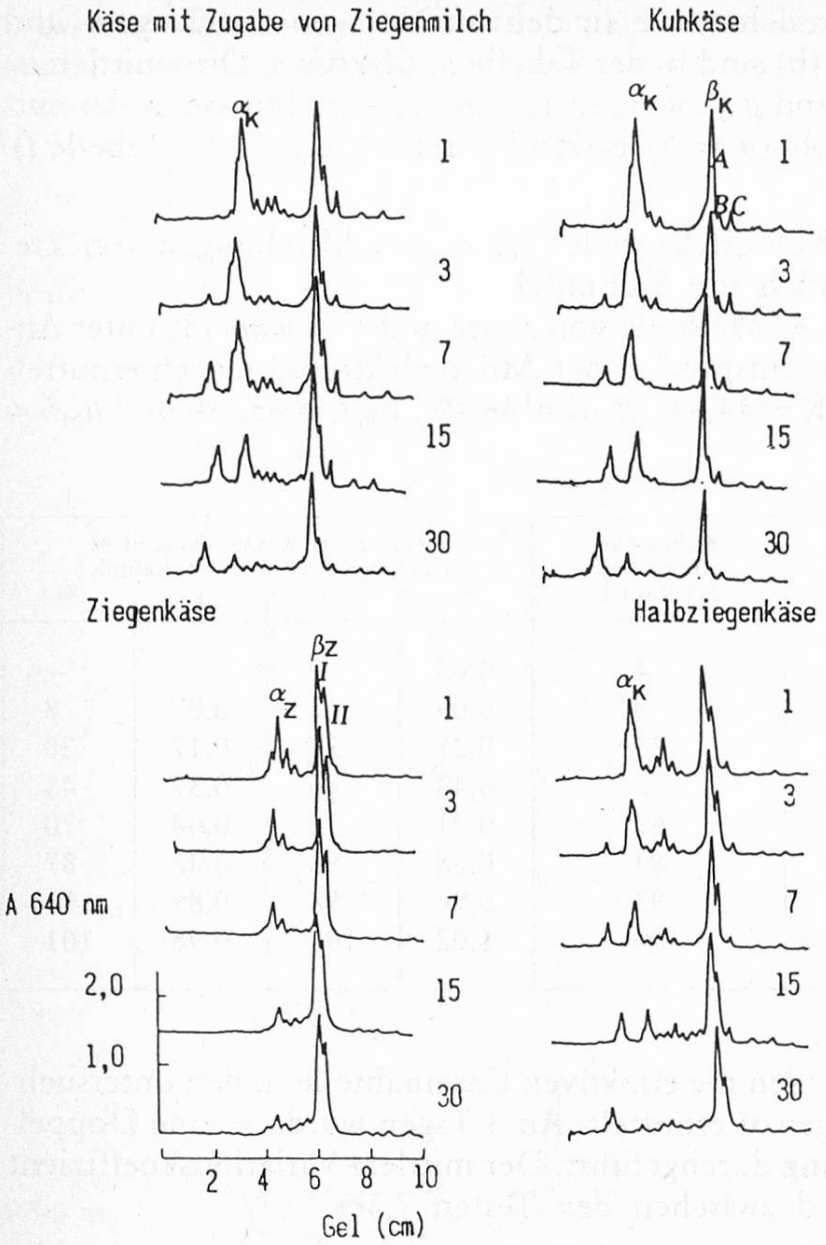

Abb. 3.
Densitogramme der Caseine aus Käsen definierter Zusammensetzung und Reifungsdauer von 1–30 Tagen (im Bild bezeichnet). Der Kuhmilchanteil betrug im Kuhkäse 100%, im «Käse mit Zugabe von Ziegenmilch» 75%, im «Halbziegenkäse» 50% und im Ziegenkäse 0%

Demgegenüber bleiben die β-Caseine weitgehend unverändert. Im jungen wie im reifen Käse zeigt das Ziegen-β-Casein ein charakteristisches Dublett (β I und II [15]), das Kuh-β-Casein ein Triplett (β A, B, C).

Die quantitative Bestimmung der Kuhmilchanteile in je 6 Käseproben wurde in analoger Weise zu der Analyse von Milchmischungen nach der Methode von *Pierre* und *Portmann* durchgeführt (3). Die Peakflächen der Abbauprodukte des α_s-Kuhcaseins wurden in unserem Fall in die Bestimmung der Peakverhältnisse gamma miteinbezogen. Für die Berechnung wurden die bereits erwähnten elektrophoretisch ermittelten Gehalte an α_MK (44,8%), β_MK (46,3%) und β_MZ (63,3%) eingesetzt.

In der Abbildung 4 sind die auf diese Weise berechneten *Mittelwerte der Kuhmilchanteile in Käse,* ferner die entsprechenden Standardabweichungen und Ver-

trauensbereiche in Abhängigkeit vom Alter der Käse dargestellt. Der Vertrauensbereich g wurde dabei wie folgt berechnet:

$$g = X \pm s \sqrt{\frac{n+1}{n}} \quad t\,(1-\alpha/2)^*$$

mit X = Mittelwert aus n-Messungen
s = Standardabweichung
n = Anzahl identischer Käse (6)
t = Quantil der Student's description
α = Irrtumswahrscheinlichkeit, hier 5%.

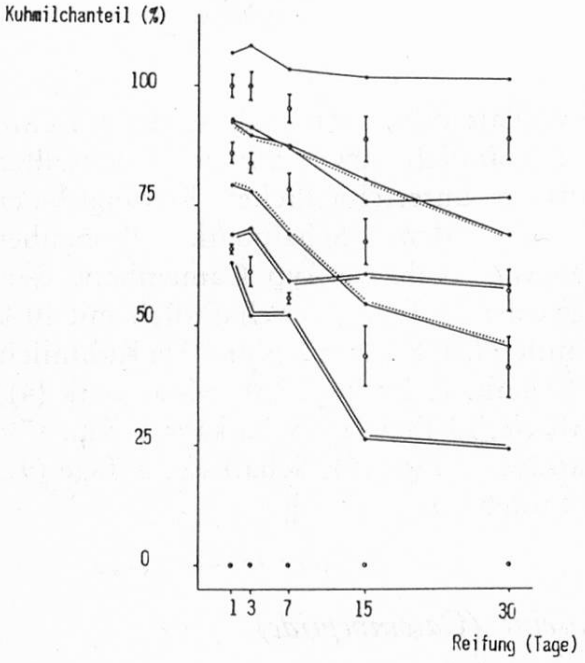

Abb. 4.
Mittelwerte, Standardabweichungen und 95% Vertrauensbereich der ermittelten Kuhmilchanteile in Käsen definierter Zusammensetzung in Abhängigkeit von Reifungsdauer. Der Kuhmilchanteil betrug im Kuhkäse 100%, im «Käse mit Zugabe von Ziegenmilch» 75%, im «Halbziegenkäse» 50% und im Ziegenkäse 0%. Bezeichnung des Vertrauensbereiches: ——— für den Kuhkäse, ····· für den «Käse mit Zugabe von Ziegenmilch», ═══ für den Halbziegenkäse. Es wurden je 6 identische Proben (je 1–2mal extrahiert) bestimmter Zusammensetzung und Reifungsdauer in je Doppelanalyse an zwei Tagen untersucht

Die mittleren Kuhmilchanteile für die eintägigen Käse betrugen für den reinen Kuhkäse 100% ($\gamma = 0{,}97$), für den «Käse mit Zugabe von Ziegenmilch» 86% ($\gamma = 0{,}79$) und für den Halbziegenkäse 64% ($\gamma = 0{,}55$).

Wie aus der Abbildung 4 ersichtlich ist, weisen die Mittelwerte der Kuhmilchanteile – trotz des Miteinbeziehens der Abbauprodukte des α_s-Caseins – insbesondere bei den gemischten Käsen eine deutliche Abnahme in Abhängigkeit vom Alter des Käses auf. Die Streuung nimmt hingegen mit dem zunehmenden Alter zu, so dass eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Käsetypen höchstens mit 1- bis 3tägigen Käsen möglich ist. Bereits nach 7tägiger Reifungsdauer überschneiden sich die Vertrauensbereiche von Kuhkäse und «Käse mit Zugabe von Ziegenmilch». Nach 15 Tagen überschneiden sich auch diejenigen von «Halbziegenkäse» und «Käse mit Zugabe von Ziegenmilch». Nach 30tägiger Reifungsdauer ist einzig eine Unterscheidung von Halbziegenkäse und Kuh- bzw. Ziegenkäse möglich.

* Dem Institut für mathematische Statistik und Versicherungslehre der Universität Bern sei für den Vorschlag dieser Formel bestens gedankt.

In der Abbildung 5 sind die *Elektropherogramme der Caseine aus Schafmilch* sowie daraus hergestelltem *Schafkäse* unterschiedlicher Reifungsdauer und von Quark dargestellt. Verglichen mit dem Caseinbandenmuster reiner Schafmilch treten in den entsprechenden Käsen und im Quark mehrere neue Banden mit grösseren Mobilitäten als die α-Schafcaseine auf. Die Intensität dieser Banden nimmt mit der zunehmenden Reifungsdauer zu. Die Mobilität einer der intensiveren Banden entspricht ungefähr derjenigen von α_s-Kuhcasein, die Mobilitäten der übrigen liegen zwischen denen von Kuh-α_s-Casein und Kuh-α_s-Casein-Abbauprodukten. In reifen Schafkäsen stören somit solche Banden den ohnehin wenig empfindlichen Nachweis von Kuhmilch.

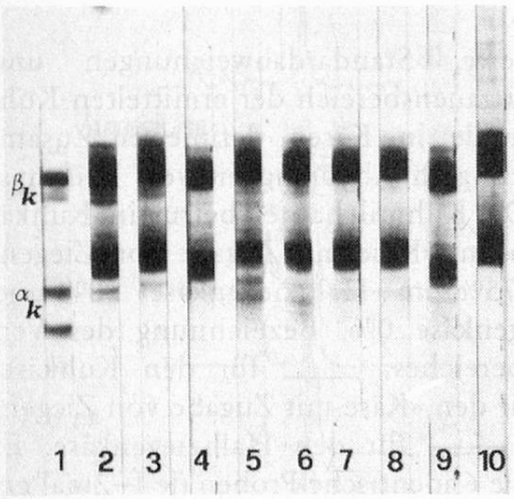

Abb. 5.
Polyacrylamidgelelektrophorese der Caseine aus Schafmilch sowie daraus hergestellter Schafkäse unterschiedlicher Reifungsdauer und aus dem Schafquark. Probenbezeichnung: Kuhkäse Typ Camembert, Reifungsdauer 15 Tage (1); Schafmilch mit 10% Kuhmilch (2); Schafmilch mit 5% Kuhmilch (3); Schafkäse, 20 Tage (5); Schafquark (4); Schafkäse, 10 Tage (6); Schafkäse, 7 Tage (7); Schafkäse, 5 Tage (8); Schafkäse, 3 Tage (9); Schafmilch (10)

HPLC tryptisch abgebauter Caseine (Caseinpeptide)

Milch

Die Caseinpeptide der einzelnen Milcharten zeigen nach der HPLC-Auftrennung charakteristische Chromatogramme (Abb. 6). Unter den angewandten Analysenbedingungen weisen die Spektren der Caseinpeptide aus Stuten- und Frauenmilch nur wenige markante Peaks auf. Die Chromatogramme der Caseinpeptide aus Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch sind wesentlich komplexer. Indessen ist es durchaus möglich, überall einige spezifische Peaks zu finden, die im Prinzip zum Nachweis von Beimischungen herangezogen werden könnten.

Wie die Abbildung 6 zeigt, lässt sich die Anwesenheit von 25% Kuhmilch in Ziegenmilch, von 10% Kuhmilch in Schaf-, Frauen- und Stutenmilch deutlich erkennen. Steht die entsprechende reine Milch als Vergleich zur Verfügung, lässt sich die Anwesenheit von rund 15% Kuhmilch in Ziegenmilch sowie von rund 5% in Schaf-, Frauen- und Stutenmilch nachweisen.

Bei einer Zumischung von Ziegen- bzw. Schafmilch zu Kuhmilch (andere Mischungen wurden nicht getestet) lässt sich die Anwesenheit von rund 15—25% Ziegenmilch und 5—10% Schafmilch eben noch erkennen (die entsprechenden spezifischen Peaks sind in der Abb. 6 bezeichnet).

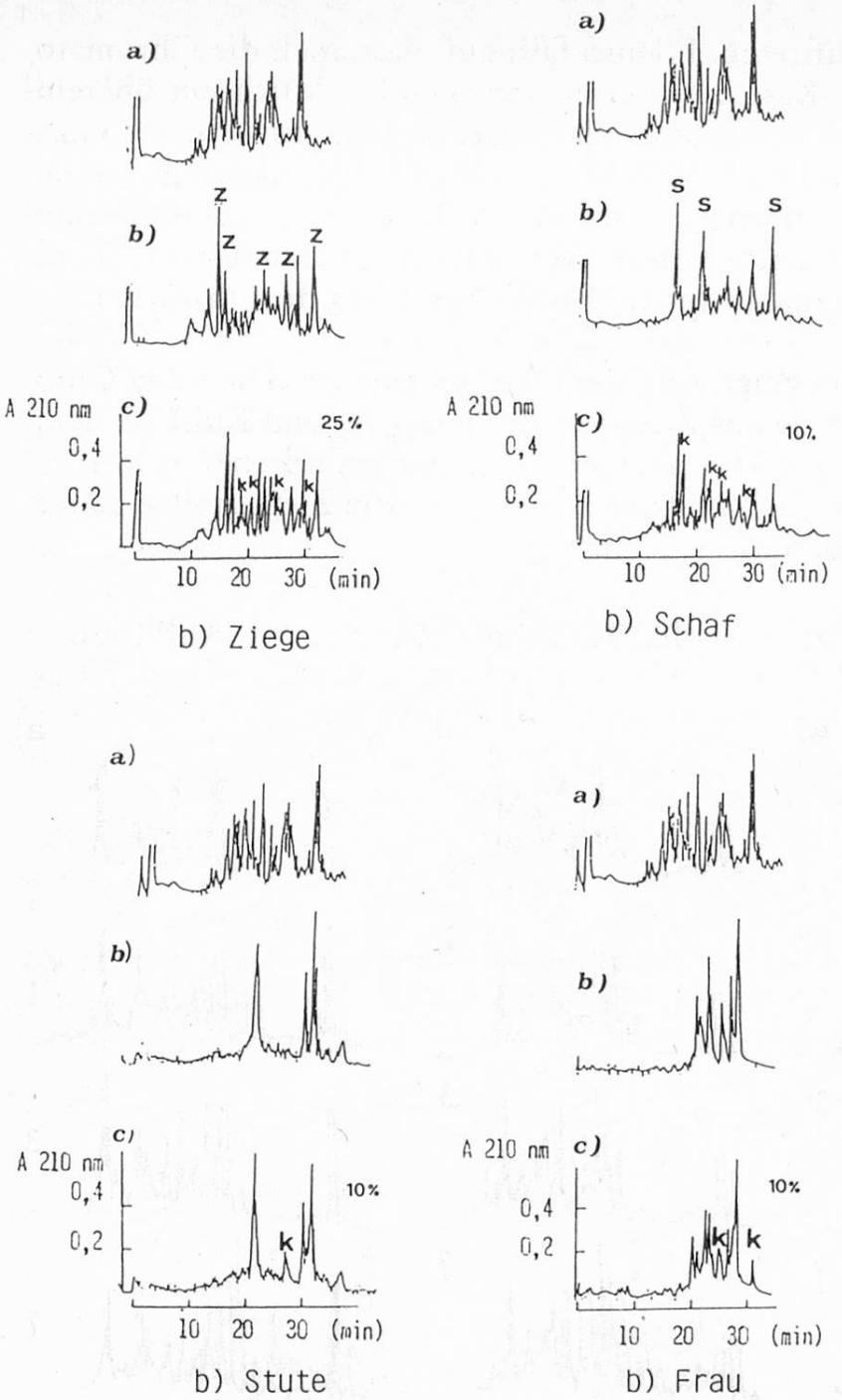

Abb. 6.
RP-HPLC-Auftrennung der tryptisch abgebauten Caseine aus Kuhmilch (a), verschiedenen Milcharten (b) sowie deren Mischungen mit Kuhmilch (c). Die prozentualen Kuhmilchanteile und die kuh- (K), ziegen- (Z) und schafspezifischen (S) Peptide sind im Bild bezeichnet

Käse

In der Abbildung 7 finden sich die Chromatogramme der Caseinpeptide aus dem Käse Typ Camembert*, geordnet nach Alter und Zusammensetzung. Als erstes fällt auf, dass die Caseinpeptide aus 1- bis 15tägigen Käsen weitgehend übereinstimmen, mit Ausnahme des Bereichs der Peaks der schwach gebundenen Pep-

* Infolge einer technischen Panne (Ausfall der Kühlung) während der Käseaufbewahrung standen nur noch 2 identische Käse der gleichen Reifungsdauer (1–15 Tage) zur Verfügung.

tide, die teilweise gar nicht auftreten. Ebenso fällt auf, dass auch die Chromatogramme der Peptide aus dem Käse und der entsprechenden Milch gut übereinstimmen. Einzig in den Chromatogrammen der Caseinpeptide aus reinen Kuhkäsen tritt ein Peptid bei 28,4 min rund 2- bis 3mal stärker auf als dasjenige aus der Kuhmilch. Dieses Peptid interferiert mit einem solchen aus Ziegenmilch und Ziegenkäse, welches nur unwesentlich früher (bei 27,8 min) eluiert wird. Damit wird der Nachweis von Ziegenmilch in Kuhkäse anhand von diesem Peptid verunmöglicht.

Wie die Abbildung 7 weiter zeigt, sind die Unterschiede zwischen den Chromatogrammen der Caseinpeptide aus Ziegen-, «Halbziegen»- und Kuhkäse deutlich zu erkennen. Die für Ziegenkäse charakteristischen Peptide bei 31,8; 27,8; 24,6 und 23,9 min sind jedoch auch im Käse mit Zugabe von Ziegenmilch gerade noch erkennbar (nicht abgebildet).

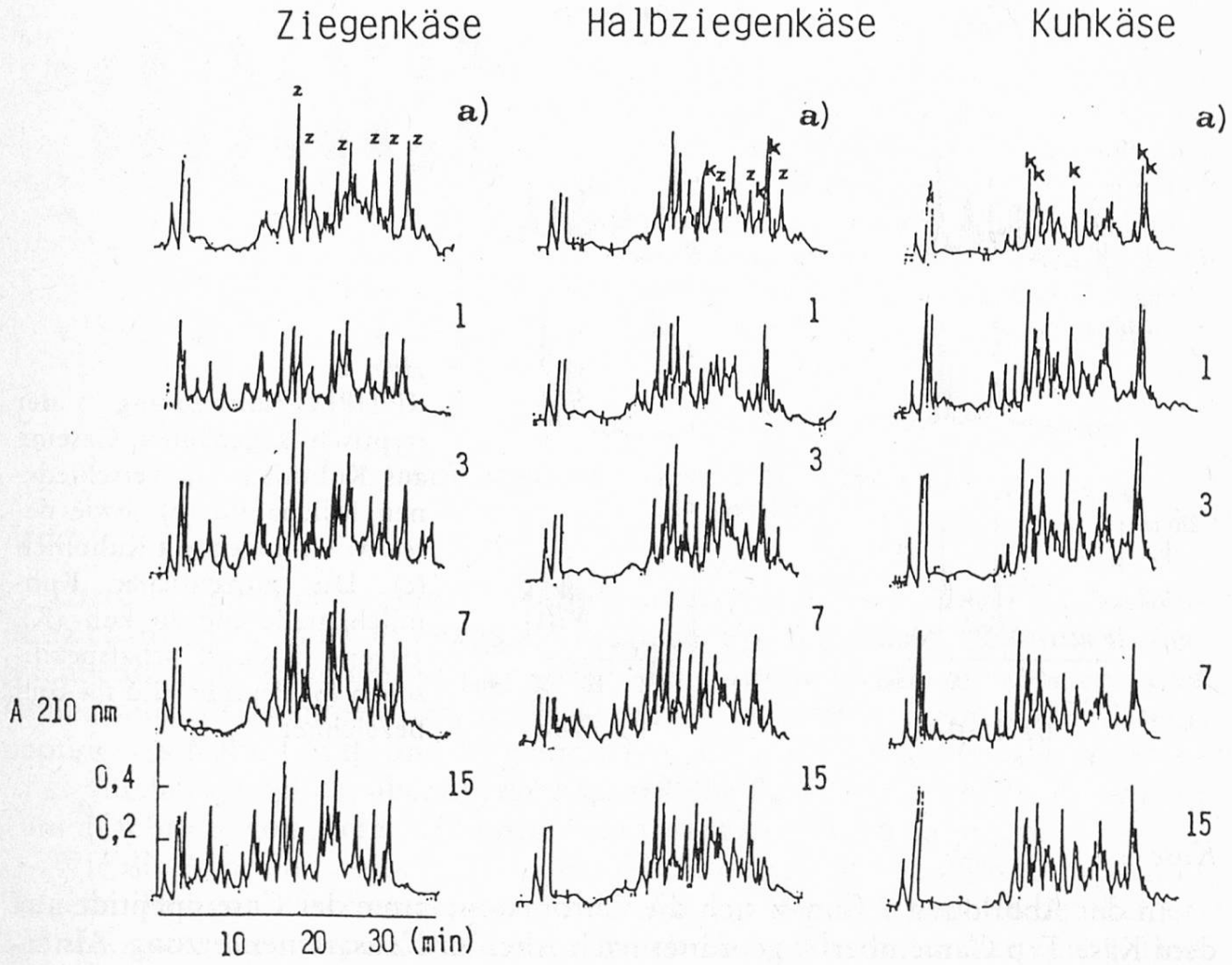

Abb. 7. RP-HPLC-Auftrennung der tryptisch abgebauten Caseinpeptide aus Käsen definierter Zusammensetzung und Reifungsdauer von 1–15 Tagen (im Bild bezeichnet). Der Kuhmilchanteil betrug im Kuhkäse 100%, im «Halbziegenkäse» 50% und im Ziegenkäse 0%. Zuoberst (a) befinden sich die Chromatogramme der Caseinpeptide aus der entsprechenden Milch bzw. Milchmischung. Die kuhspezifischen (K) und ziegenspezifischen (Z) Peptide sind im Bild bezeichnet

Für die *quantitative Bestimmung* der Kuh- bzw. Ziegenmilchanteile wurden die Peakflächen (in Prozenten der Gesamtfläche) der spezifischen Peaks herangezogen. Dies betraf die Peptide bei 30,2; 21,9 und 17,2 min (in der Abb. 7 mit K bezeichnet) bzw. bei 31,9; 27,8; 24,6 und 23,9 min (in der Abb. 7 mit Z bezeichnet). Deren Flächenprozente zeigen eine enge Korrelation mit den Mischungsverhältnissen in Milch (Korrelationskoeffizient $r = 0{,}92–0{,}99$).

Aus dem Vergleich mit den entsprechenden Peakflächen im Käse wurde der Kuhmilchanteil im reinen Kuhkäse mit 90–110%, im «Halbziegenkäse» mit 40–60% und in «Käse mit Zugabe von Ziegenmilch» mit 60–75% berechnet. Der Ziegenmilchanteil, gemessen an den Peakflächen der Ziegen-Caseinpeptide bei 31,8 und 27,8 min (bei dem letzteren wurden die entsprechenden Werte für die Peakflächen im Kuhkäse abgezogen), wurde im reinen Ziegenkäse mit 80–100%, im «Halbziegenkäse» mit 25–40% und im «Käse mit Zugabe von Ziegenmilch» mit rund 10% berechnet.

Die Peaks der spezifischen Peptide bei 24,6 und 23,9 min korrelierten zwar gut mit der Käsezusammensetzung, ergaben jedoch im Vergleich zu Milch viel zu hohe Werte. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da die Auftrennung der Peptide in diesem Bereich offensichtlich ungenügend ist.

In der Abbildung 8 finden sich die Chromatogramme der Caseinpeptide aus Schafmilch und daraus hergestelltem Schafkäse unterschiedlicher Reifungsdauer sowie aus Schafquark. Als erstes fällt wiederum auf, dass die Chromatogramme der Caseinpeptide aus Käsen aller Altersstufen unter sich und mit demjenigen von Schafquark weitgehend übereinstimmen. Die Chromatogramme der Caseinpeptide aus dem Schafkäse und aus der Schafmilch stimmen zwar auch grundsätzlich überein, jedoch treten in den Chromatogrammen der Caseinpeptide aus

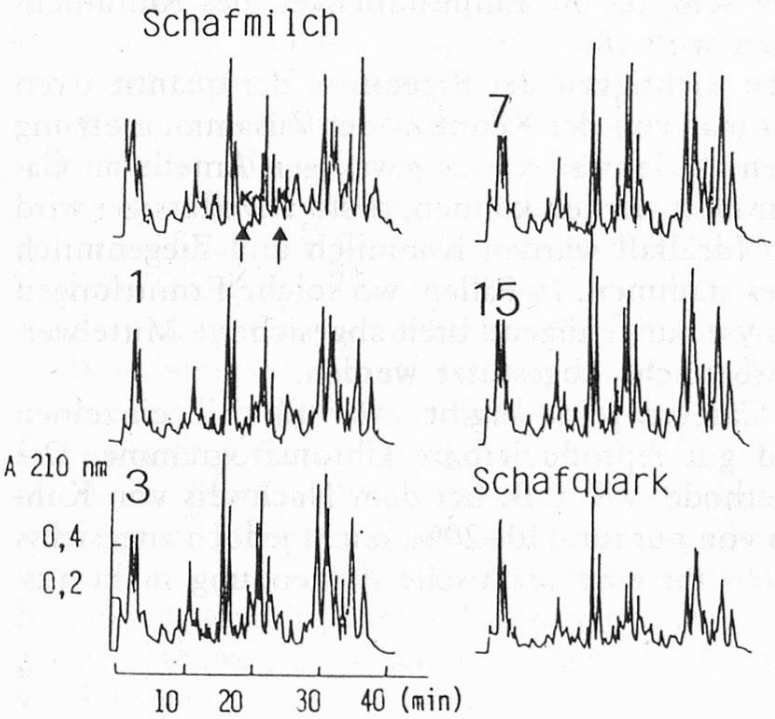

Abb. 8.
RP-HPLC-Auftrennung der tryptisch abgebauten Caseinpeptide aus Schafmilch sowie daraus hergestellten Schafkäse unterschiedlicher Reifungsdauer und aus dem Schafquark. Die Reifungsdauer (in Tagen) sowie die Lage der Kuhcaseinpeptide, welche mit den Peptiden aus Schafkäse interferieren könnten (K), ist im Bild bezeichnet

Käse und Quark zusätzlich einige Peaks neu oder verstärkt auf. Ihre Intensität korreliert nicht mit dem Käsealter. Die Schafkäsepeptide bei 18,6 und 19,7 min könnten mit denjenigen Kuhmilchcaseinpeptiden interferieren, welche praktisch mit gleichen Retentionszeiten eluiert werden (in der Abb. 8 mit K bezeichnet). In Ermangelung von geeignetem Probenmaterial konnte jedoch nicht geprüft werden, ob diese Käsepeptide tatsächlich den Nachweis von Kuhmilch im Schafkäse stören würden.

Diskussion

Milch

Wie unsere Ergebnisse zeigen, bewährt sich die *PAGE der Caseine* bei der Differenzierung von Kuhmilch einerseits, gegenüber Ziegen-, Schaf-, Frauen- und Stutenmilch andererseits sowie auch bei der Ermittlung von Mischungsanteilen. Die Methode ist schnell, reproduzierbar, leicht durchzuführen, und die Empfindlichkeit des Kuhmilchnachweises ist für die praktische Anwendung ausreichend. Einzig bei Schafmilch ist die Nachweisgrenze von nur 5% Kuhmilch nicht befriedigend. Dass die 5% Kuhmilch in Schafmilch bei Anwendung der PAGE als Nachweisgrenze zu gelten haben, wurde auch von anderen Autoren bestätigt (4, 13). Mit Hilfe der Immunodiffusion konnten *Gombocz* et al. (5) ebenfalls nur 5% Kuhmilch in Schafmilch sicher nachweisen. Um die Kreuzreaktionen mit Schafmilch zu eliminieren, musste jedoch das käufliche Anti-Rindercasein-Serum zuerst mit einem vorbehandelten Schafmilchextrakt abgesättigt werden. In diesem Fall könnte möglicherweise der immunologische Nachweis von Immunglobulinen besser geeignet sein, da die Empfindlichkeit des Kuhmilchnachweises mit 0,1–1% angegeben wird (8).

Wie bereits erwähnt, hängt die Richtigkeit der Ergebnisse der quantitativen Analyse der Milchmischungen primär von der Kenntnis der Zusammensetzung der betreffenden Ausgangsmilchen ab. Je präziser die jeweiligen Anteile an Casein sowie an α- und β-Casein ermittelt werden können, desto zuverlässiger wird naturgemäss die Berechnung. Im Idealfall würden Kuhmilch und Ziegenmilch aus Beständen desselben Betriebes stammen. In Fällen, wo solche Ermittlungen nicht möglich sind, muss die Analyse auf genügend breit abgesicherte Mittelwerte und entsprechende Vertrauensbereiche abgestützt werden.

Die *HPLC-Auftrennung* der Caseinpeptide ergibt zwar für die einzelnen Milcharten charakteristische und gut reproduzierbare Chromatogramme. Die Nachweisempfindlichkeit der Methode, wie z. B. bei dem Nachweis von Kuhmilch in Schaf- oder Ziegenmilch von nur rund 10–20%, reicht jedoch angesichts anderer analytischer Möglichkeiten für eine praktische Anwendung nicht aus.

Der primäre Abbau der α_s-Caseine der Kuh- und Ziegenkäse entspricht jenem Ablauf der Proteolyse bei der Käsereifung, der unter vergleichbaren Bedingungen (pH, Labgerinnung) häufig beobachtet wurde (17–19). Erwähnenswert ist die Tatsache, dass im reinen Kuhkäse durch das Miteinbeziehen der (bei pH 4,5 fällbaren) Abbauprodukte von α_s-Kuhcasein nach 30 Tagen Reifung (Konsumreife) die «Caseinabnahme» nur etwa 10% beträgt. Der Zusatz von 25% (bzw. 50%) Ziegenmilch bewirkt jedoch insofern eine Änderung der Proteolyse, als nur noch 60–66% der ursprünglichen Caseinmenge elektrophoretisch zu ermitteln sind (Abb. 4). Dieser Effekt kann als erstes dem Einfluss von Rohmilchflora der Ziegenmilch zugeschrieben werden, da alle anderen Parameter unverändert blieben.

Wie aus der Abbildung 4 ersichtlich ist, liegen die ermittelten Kuhmilchanteile für den eintägigen «Käse mit Zugabe von Ziegenmilch» sowie für den «Halbziegenkäse» rund 10% höher als in den entsprechenden Milchmischungen (Tabelle 1). Dies stimmt mit den Beobachtungen von *Pierre* (12) überein und ist durch die Caseinveränderung infolge der Labeinwirkung zu erklären. Die Eichung sollte im Prinzip, wie bei *Pierre* (12), mit Käsen bekannter Zusammensetzung anstelle mit Milch erfolgen.

Wie bereits erwähnt, werden bei der Käsereifung die α_s-Caseine häufig schneller abgebaut als die β-Caseine. Die Abbaugeschwindigkeit der α_s-Caseine (und der Caseine generell) ist von vielen Faktoren wie pH, NaCl-Gehalt, Mikroflora usw. abhängig, so dass jede Käsesorte im Prinzip eine typische Reifung durchläuft (17). Deshalb kann die quantitative Ermittlung der Milchanteile anhand von α_s-Casein mittels PAGE bei unbekanntem Probenmaterial praktisch nur im frischen Käse angewendet werden. Diese Überlegungen haben auch bei der Analyse von reinem Ziegenkäse zu gelten, da kleine Kuhmilchanteile in reifen Käsen unter Umständen nicht mehr nachzuweisen sind. Das Verhalten von Ziegenkäse mit relativ kleinen Kuhmilchanteilen (5–20%) müsste noch untersucht werden.

Die bedeutend resistenteren β-Caseine könnten sich demnach besser zum Nachweis von Kuhmilch im Käse eignen. Unter gewissen Bedingungen werden jedoch auch die β-Caseine der Proteolyse während der Käsereifung unterliegen. So kann z. B. die Rohmilchflora im Raclette-Käse einen nicht zu vernachlässigenden Abbau der β-Caseine bewirken (20). Da in der Schweiz sämtliche Hart- und ein Teil der Halbhartkäse aus Rohmilch hergestellt werden, sind auch mittels Analyse der β-Caseine völlig reifungsunabhängige Ergebnisse nicht zu erwarten.

Wie bereits erwähnt, erschweren im reifen Schafkäse die Banden, welche wahrscheinlich den Abbauprodukten des α-Schafcaseins zuzuordnen sind, den Nachweis von Kuhmilch. *Ramos* et al. (13) bezeichnen den Nachweis von Kuhmilch im Manchego-Käse mittels PAGE ebenfalls als schwierig. Die Autoren konnten in 10tägigen Käsen einen 10%igen Kuhmilchzusatz noch erkennen. Es war uns mangels definierten Probenmaterials leider unmöglich, diese Aussage zu bestätigen. Auch in diesem Fall liegen Anzeichen dafür vor, dass der immunologische Nachweis der PAGE überlegen sein könnte (7, 8). Indessen sind hier noch viele Fragen offen.

Bei der *HPLC-Auftrennung* der Caseinpeptide fallen die störenden Einflüsse der Alterung dagegen weg. Sowohl bei Schaf-, Kuh- und Ziegenkäse wie auch in den gemischten Käsen der Reifungsdauer 1–15 Tage waren keine deutlichen mit dem Alter der Käse korrelierbaren Unterschiede festzustellen. Wie bereits unter Milch erwähnt, liegt die Schwäche der Methode zunächst in deren mangelnder Empfindlichkeit. Zudem sind die Chromatogramme, insbesondere der Kuh-, Ziegen- und Schafcaseinpeptide, wegen ihrer Komplexität ausgesprochen schlecht integrierbar. Ferner können sich auch schwache Peaks der Peptide (welche z. B. im Käse im Vergleich zu Milch neu oder verstärkt auftreten) unter Umständen störend auswirken. Dies kann jedoch von den jeweiligen Trennbedingungen abhängig sein. So fanden *Tobler* et al. (16) im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen in den gleichen Caseinpeptiden aus Kuhkäse keine mit einem Ziegenpeptid interferierenden Peptide. Die Elution erfolgte allerdings nicht von einer identischen Säule. Ebenso war die Reproduzierbarkeit bei der Elution der schwach gebundenen Peptide bei *Tobler* et al. besser als in unserem Fall. Indessen waren auf allen RP-300-Säulen, die wir getestet haben, immer klare Unterschiede zwischen den Kuh- und Ziegencaseinpeptiden festzustellen. Einzig die Retentionszeiten der artspezifischen Peptide wiesen von Säule zu Säule gewisse Unterschiede auf.

Die Anzahl der mittels HPLC-Auftrennung getesteten Proben bestimmter Reifungsdauer (2) war leider zu klein, um eine Berechnung der Mittelwerte und Vertrauensbereiche durchführen zu können. Doch sprechen bereits die vorliegenden Ergebnisse wie auch die Analyse der Milchgemische dafür, dass eine Unterscheidung zwischen Kuh-, «Halbziegen»- und Ziegenkäse schon aufgrund einer einfachen Peakanalyse möglich sein sollte. Bei der Anwendung der Methode in einem Kontrollabor wäre allerdings notwendig, über bedeutend grössere Datenmengen verfügen zu können, um die Aussagen auf eine Multikomponentanalyse, wie z. B. lineare Diskriminanzanalyse, zu stützen. Dieser Aufwand wäre angesichts der doch relativ starken Einschränkungen der Methode in bezug auf die Empfindlichkeit wahrscheinlich nur dann gerechtfertigt, wenn andere analytische Möglichkeiten, welche noch offen sind, auch versagen (8).

Zusammenfassung

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) der Caseine bewährte sich gut sowohl bei der Differenzierung von Kuhmilch einerseits, gegenüber Ziegen-, Schaf-, Frauen- und Stutenmilch andererseits als auch bei der Ermittlung von Mischungsanteilen. In den Elektropherogrammen der Caseine aus den Kuh-, Ziegen- und Schafkäsen unterschiedlicher Reifungsdauer zeigte sich ein rascher Abbau der α_s-Caseine. Die ermittelten Kuhmilchanteile in den gemischten Kuh- und Ziegenkäsen zeigten – trotz des Miteinbeziehens der (bei pH 4,5 fällbaren) Abbauprodukte des α_s-Kuhcaseins – eine deutliche Abnahme in Abhängigkeit vom Alter des Käses auf. Demgegenüber waren bei der *HPLC-Auftrennung* der Peptide aus den Käsen praktisch keine mit dem Alter der Käse korrelierbaren Unterschiede festzustellen. Für die praktische Anwendung ist die Methode noch zu wenig empfindlich.

Résumé

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) des caséines s'est révélée bonne, aussi bien pour différencier le lait de vache du lait de chèvre, de brebis, de jument et de lait de femme que pour déterminer les pourcentages de ces laits dans des mélanges de laits. Pour la PAGE des caséines provenant des fromages de vache, de chèvre et de brebis de maturation différente, une dégradation rapide des caséines α_s peut être constatée. Pour le dosage du lait de vache dans des fromages fabriqués à partir de mélanges de laits de vache et de chèvre, la surface des pics des substances de dégradation (précipitables à pH 4,5) de la caséine de vache α_s a été inclue dans le calcul. Toutefois, les valeurs obtenues démontrent une nette diminution en fonction du degré de maturation du fromage, en particulier pour les fromages mélangés. La séparation par *HPLC des peptides de la caséine* dans des fromages de vache, de chèvre et de brebis de divers degrés de maturation a permis de constater qu'il n'y avait pratiquement aucune différence attribuable aux degrés de maturation des fromages. Cette méthode s'avère cependant trop peu sensible pour une utilisation pratique.

Summary

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of caseins from milk could be used to differentiate between cow milk and goat, sheep, horse and human milk as well as to determine the content of cow milk in the mixtures. The analysis by PAGE of caseins from cheese (cow, cow/goat, goat, sheep) at various stages of ripening revealed the rapid proteolysis of all α_s-caseins. The bands of degradation products of α_s-cow casein were also used for the determination of the content of cow milk in the cow and cow/goat cheeses. Nevertheless, the calculated values, especially in the mixed cheeses, decreased significantly with the aging of cheese. By *HPLC-analysis* of peptides from cheese (cow, cow/goat, goat, sheep) at different stages of ripening, practically no differences were found which could be correlated with the aging of cheese. However, this method is in practice not sensitive enough.

Literatur

1. *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).
2. *Aschaffenburg, R.* and *Dance, J. E.:* Detection of cow's milk in goat's milk by gel électrophoresis. J. Dairy Res. **35**, 383–386 (1968).
3. *Pierre, A.* et *Portmann, A.:* Emploi de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide pour mettre en évidence et doser le lait de vache ajouté au lait de chèvre. Application au cas des fromages. Ann. Technol. agric. **19**, 107–130 (1970).
4. *Foissy, H.:* Über die Differenzierungsanalytik von Milch verschiedener Tiere. Österr. Milchwirtsch. **3**, 5–9 (1976).
5. *Gombocz, E., Hellvig, E.* und *Petuely, F.:* Immunologischer Nachweis von Kuhmilchcaseinen in Schafkäsen. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. **172**, 178–181 (1981).
6. *Carini, S.* e *Busca, M.:* Riconoscimento del latte vaccino nel latte e nei formaggi di pecora. Latte **3**, 610–612 (1975).
7. *Elbertzhagen, H.* und *Wenzel, E.:* Nachweis von Kuhmilch in Schafkäse mittels Immunelektrophorese. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. **175**, 15–16 (1982).

8. *Bernhauer, H., Baudner, S.* und *Günther, H. O.:* Immunologischer Nachweis von Kuhmilchproteinen in Schaf- und Ziegenmilch bzw. -käse über ein spezifisches Immunoglobulin. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. **177**, 8–10 (1983).
9. *Hostettler, H.:* Schwankungen in Menge und Zusammensetzung der Milch. Milchwirtschaft, Verlagsaktiengesellschaft Thun, 166–175 (1948).
10. *Rothenbühler, E.:* Vergleichende Untersuchung über die Zusammensetzung der Milch dreier Rinderrassen während zweier Laktationsperioden und unter gleichen Fütterungs- und Haltungsbedingungen. Dissertation ETH Zürich, 1973.
11. *Duchene, D.:* Composition, structure et causes d'altérations du lait. Sci. Techn. pharm. **5**, 237–255 (1970).
12. *Pierre, A.:* Etude des facteurs influençant la précision de la méthode électrophorétique du dosage du lait de vache dans le lait et le fromage de chèvre. Ann. Fals. Exp. Chim. **70**, 213–222 (1977).
13. *Ramos, M., Martinez-Castro, I.* and *Juarez, M.:* Detection of cow's milk in Manchego cheese. J. Dairy Sci. **60**, 870–877 (1976).
14. *Tobler, M.:* Untersuchungen zur Bestimmung des Kuhmilchanteils im Ziegenkäse. Inauguraldissertation, Universität Bern, 1983.
15. *Jennes, R.:* Composition and characteristics of goat milk: Review 1968–1979. J. Dairy Sci. **63**, 1605–1630 (1980).
16. *Tobler, M., Windemann, H.* und *Baumgartner, E.:* HPLC-Auftrennung von Peptiden aus Casein von Kuh- und Ziegenkäse. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **74**, 132–139 (1983).
17. *Desmazend, M. J.* and *Cripon, J.-C.:* General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. Milchwissenschaft **32**, 731–734 (1977).
18. *Pélissier, J.-P.:* Protéolyse des caseines. Rev. Sci. Aliments **4**, 1–35 (1984).
19. *Furtado, M. M.* and *Chandan, R. C.:* Ripening changes in a bluemold surface ripened cheese from goat's milk. J. Food **50**, 545–546 (1985).
20. *Gallman, P.* und *Puhan, Z.:* Beta-Caseinhydrolyse durch Proteasen ausgewählter Mikroorganismen der Rohmilchflora. Milchwissenschaft **37**, 396–400 (1982).

Dr. Helena Windemann
Dr. M. Tobler
Prof. Dr. E. Baumgartner
Institut für Biochemie der
Universität Bern
Labor für Lebensmittelchemie
Freiestrasse 3
CH-3012 Bern