





Projekten: Ontwikkeling en verbetering van onderzoekmethoden voor vlees en vleesprodukten

Onderzoek naar de kwaliteit van pluimvee en eieren

Onderwerp: Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).

---

Doel:

Het beoordelen omtrent de mogelijke toepassing van FPLC bij het kwaliteitsonderzoek in land- en tuinbouwprodukten.

Samenvatting:

De FPLC apparatuur werd gedurende één week door de fabrikant (Pharmacia) beschikbaar gesteld. In deze korte periode werd de apparatuur gebruikt om een indruk te verkrijgen omtrent de mogelijke bruikbaarheid bij het vleesspeciesonderzoek en bij het onderscheiden van verse en bebroede onbevuchte eieren aan de hand van het eiwitpatroon. De bruikbaarheid van FPLC bij het speciesonderzoek lijkt goed, aangezien tussen waterige extracten van diverse vleessoorten een duidelijk verschil waarneembaar is. Naast het identificeren van vlees moet het mogelijk zijn om in mengsels van rund- en varkenseiwit (gehakt) de afzonderlijke percentages te bepalen. Bij bebroede eieren werd een component, in kleine concentratie, waargenomen, die mogelijk een afbraakprodukt van albumine is. De mogelijkheid om deze component te gebruiken om bebroede eieren te identificeren moet nader onderzocht worden.

Conclusie:

Het aanschaffen van FPLC apparatuur lijkt zeker zinvol gezien de bruikbaarheid bij het speciesonderzoek en de mogelijke bruikbaarheid bij het aantonen van bebroede eieren.

Deze techniek heeft een aantal voordelen boven de electroforetische technieken zoals:


- snellere scheiding
- te automatiseren
- de gescheiden eiwitten kunnen worden uitgevangen ten behoeve van bevestigingstechnieken
- beter geschikt voor het kwantificeren van eiwitten
- groot scheidend vermogen.


Naast bovengenoemde wordt gedacht om deze techniek te gebruiken bij de hiervolgende onderwerpen:


- kwalitatief en kwantitatief aantonen van vleesvreemde eiwitten in vleesprodukten
- kaasrijping: het langs chemische weg vaststellen van de rijping van kaas aan de hand van het eiwit/peptidepatroon
- verhitting van melk- en zuivelprodukten: aan de hand van het eiwit/peptidepatroon vaststellen van de verhittingsgraad
- kwaliteit van vlees: het direct bepalen van het spiervleesgehalte aan de hand van specifieke eiwitten (b.v. actine en myosine)
- isolatie van enzymen: ten behoeve van onderzoek naar de rijpheid van tuinbouwprodukten.

Voor de afdeling Eiwitchemie geeft deze techniek de mogelijkheid om de eerst komende jaren nieuw onderzoek te verrichten en bij te dragen aan de ontwikkeling van snelle methoden voor het bepalen van parameters ten behoeve van het kwaliteitsonderzoek.

---

Verantwoordelijk: drs H.L. Elenbaas 

Samensteller: W. Haasnoot 

Projectleiders: G. Cazemier  en drs H.L. Elenbaas

### Inleiding:

Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) is een techniek welke speciaal ontworpen is voor het scheiden van biologische makro-moleculen, zoals eiwitten en polypeptiden.

Het systeem bestaat uit twee pompen, een programmeerbare gradient-mixer, een U.V.-detektor, een fractieverzamelaar en een dubbelkanaals-recorder.

Het gedeelte welke met de mobiele fase in aanraking komt is gemaakt van glas en/of kunststof waardoor het geoorloofd is om grote zoutconcentraties te gebruiken.

Het meest essentiële onderdeel van het systeem is de kolom.

Er zijn vier soorten kolommen beschikbaar namelijk een sterke anionen-uitwisselkolom (mono Q), een sterke kationenuitwisselkolom (mono S), een zwakke anionenuitwisselkolom (Polyanion Si) en een polybufferuitwisselkolom (mono P).

De kolommen zijn gepakt met harsen die bestaan uit bolletjes welke precies even groot zijn ( $9,8 \mu\text{m} \pm 0,4$ ). Door deze zeer kleine spreiding in deeltjesgrootte kunnen de kolommen worden gebruikt bij een relatief lage druk (maximaal 40 bar) waarbij een goede scheiding wordt verkregen (schotelgetal 25.000-30.000/meter). Bij gebruik van de eerste drie omschreven kolommen berust de scheiding van eiwitten op het principe van de ionchromatografie.

Bij gebruik van de polybufferuitwisselkolom, met speciaal hiervoor ontwikkelde polybuffers als mobiele fase, berust de scheiding van de eiwitten op het verschil in iso-electrisch punt.

### Experimenten:

#### 1. Speciesonderzoek:

Het doel was om verschil in eiwitpatroon van verscheidene rauwe vleessoorten te kunnen waarnemen aangezien een nauwkeurige identificatie en zeker het kwantificeren met behulp van elektroforese in mengsels rauw vlees nog problemen geeft.

Van vier soorten vlees (rund, varken, paard en kip) werden waterige extracten gemaakt door aan 5 gram vlees 40 ml water toe te voegen en 2 minuten te homogeniseren met behulp van een Sorvall mixer.



Na centrifugeren en filtreren werd 100 µl extract geïnjecteerd op de mono Q kolom.

In figuur 1 worden de chromatogrammen en de chromatografische condities weergegeven en een verschil tussen de soorten vlees is duidelijk waarneembaar.

Hierbij werd een gradient toegepast waarbij in 6 minuten de concentratie natriumacetaat opliep van 0 naar 40%. Dit heeft tot gevolg dat de eiwitcomponenten vrij snel achter elkaar elueren.

Door een minder stijle gradient toe te passen (in 10 min. van 0 naar 15% NaAc) worden de snel eluerende componenten beter gescheiden en in figuur 2 worden de chromatogrammen van de vier vleessoorten weergegeven.

Onder deze condities is een duidelijk verschil waarneembaar tussen de vier vleessoorten en een aantal componenten lijkt geschikt om te gebruiken bij het kwantificeren in vleesmengsels.

Figuur 2a en 2b geven b.v. de mogelijkheid aan om het percentage varkensiwit en rundewit in half om half gehakt te kunnen kwantificeren. Het identificeren en kwantificeren van kip in rauwe vleesmengsels is mogelijk vanwege een component die identiek is voor kipextracten (zie figuur 2d (\*) ).

Bij rund- en varkensvleesextracten wordt niet alleen bij snel eluerende componenten verschil aangetoond, ook bij later eluerende componenten wordt een verschil waarneembaar indien de gradient wordt aangepast (zie figuur 3).

In figuur 4 worden chromatogrammen weergegeven van twee rund- en twee varkensvleesmonsters. Hieruit blijkt dat de resultaten reproduceerbaar zijn. In figuur 4c wordt een kleine verontreiniging van rundvlees waargenomen welke vermoedelijk werd geïntroduceerd tijdens de injectie.

Het identificeren van de verschillende pieken was niet mogelijk vanwege het ontbreken van de geschikte standaarden. Alleen van myoglobine werd waargenomen, dat deze in het begin elueert (zie figuur 5).

In het FPLC systeem kunnen verschillende condities gevarieerd worden om het resultaat zo mogelijk nog te verbeteren. Zoals gebleken is zijn de gradientcondities van groot belang, andere variabelen zijn de bufferkeuze en de kolomkeuze.

De monsterextractiecondities zijn eveneens van belang.

Zo werd bij waterige extracten van acetonpoeders van vlees geheel andere chromatogrammen verkregen (zie figuur 6). Het extract van varkensvlees vertoont een opvallend triplet aan componenten. In figuur 6 wordt een scheiding weergegeven welke verbeterd kan worden door een minder steile gradient toe te passen.

Door extractie van de vleesmonsters met 7 molair ureum werd getracht om meer eiwitten in oplossing te brengen. Bij de monstervoorbewerking traden echter problemen op tijdens het overbrengen van monsterextract in het eluens (met ureum). Door het pH verschil onstond een troebeling door precipitatie van eiwitten welke tijdens het filtreren uit het extract werden verwijderd. Het voordeel van het gebruik van ureum werd bij de filtratie weer te niet gedaan en het gevolg was dat in het FPLC chromatogram weinig componenten aantoonbaar waren.

De mogelijkheid van het gebruik van ureumextracten kon dus niet worden beoordeeld.

Een andere techniek welke met behulp van de FPLC apparatuur kan worden uitgevoerd is chromatofocussing, waarbij de scheiding berust op het verschil in iso-elektrisch punt. Monsters rund- en varkensvlees werden op deze wijze gescheiden en de chromatogrammen worden weergegeven in figuur 7. Het gebied waarin de componenten werden gescheiden liep van pH 7 tot 4. Een duidelijk verschil tussen varkensvlees en rundvlees is waarneembaar. Indien een kleiner pH gebied, b.v. pH 7 tot 5,5, zou worden toegepast wordt de scheiding vergroot.

Als snelle scheidingstechniek is chromatofocusing minder geschikt aangezien een scheiding ongeveer 1 uur in beslag neemt. Door een kleiner pH gradient te nemen is het mogelijk om de analysetijd te verkorten tot ca. 30-40 min.

Gezien de korte testperiode was het niet mogelijk om deze techniek meer uitvoerig te testen, toch lijkt de mogelijkheid aanwezig om deze te gebruiken bij de identificatie van vleesmonsters.

## 2. Bebroede eieren:

Het doel was te kunnen beoordelen of er verschil in eiwitpatroon tussen verse en bebroede eieren aanwezig is om eventueel onbevruichte, bebroede eieren te kunnen herkennen.

Volgens de literatuur is het in eieren voorkomende ovalbumine gevoelig voor warmte. Met electroforese is m.b.t. dit eiwit een verschil waarneembaar tussen verse en bebroede eieren. Bij bebroede eieren treedt een verbreding van de ovalbumineband op. Getracht werd om dit met behulp van FPLC te kunnen waarnemen.

Hiervoor werd 10 gram eimonster geextraheerd met 40 ml water, na 2 min homogeniseren met behulp van een Ultra-Turrax en na centrifugeren en filtreren van het supernatant werd 200 µl geïnjecteerd. De resultaten worden weergegeven in figuur 8. Bij bebroede eieren wordt naast ovalbumine een tweede kleine piek waargenomen welke vermoedelijk een afbraakprodukt is van ovalbumine.

In de toekomst moet getracht worden om een betere scheiding te bewerkstelligen door b.v. een andere buffer te gebruiken waarna eventueel meer monster kan worden geïntroduceerd om het afbraakprodukt van ovalbumine beter te kunnen detecteren. Door het analyseren van meerdere monsters kan dan beoordeeld worden of deze snelle methode gebruikt kan worden voor het aantonen van onbevruichte bebroede eieren als zodanig.



Figuur 1: Chromatogrammen van waterige extracten van vers vlees

Kolom: mono Q.

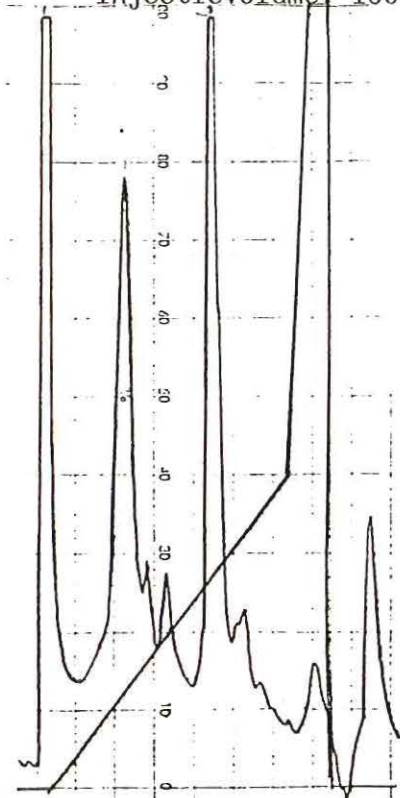
Eluens: A 0,02 mol BisTris pH 6,4

B 0,02 mol BisTris + 1 mol natriumacetaat pH 6,4.

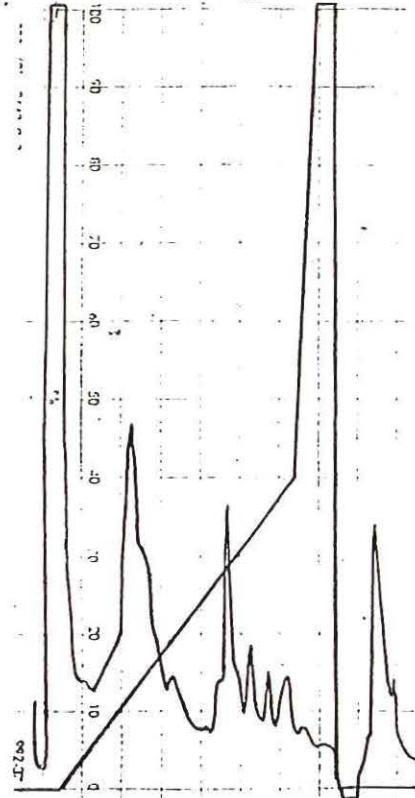
Flow : 2 ml/min.

Speed : 0,5 cm/ml.

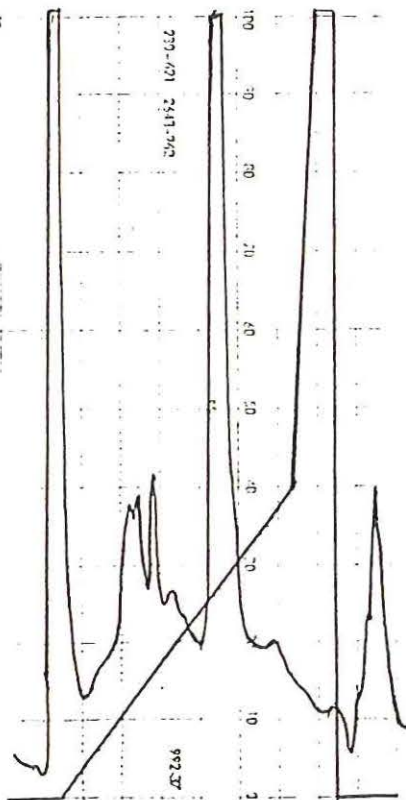
Injectievolume: 100  $\mu$ l.



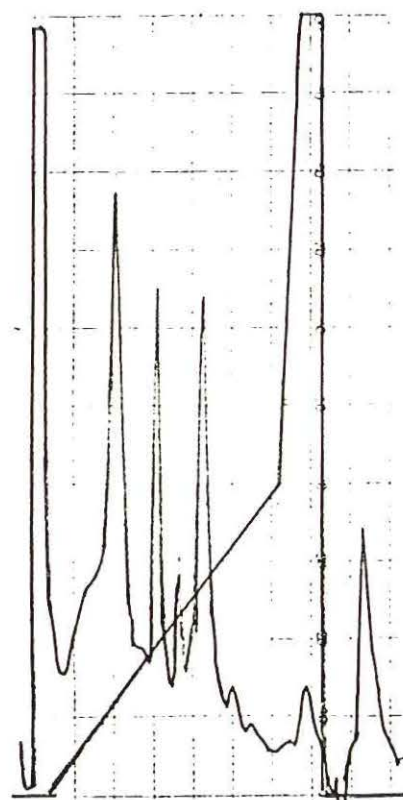
a. rund



b. varken

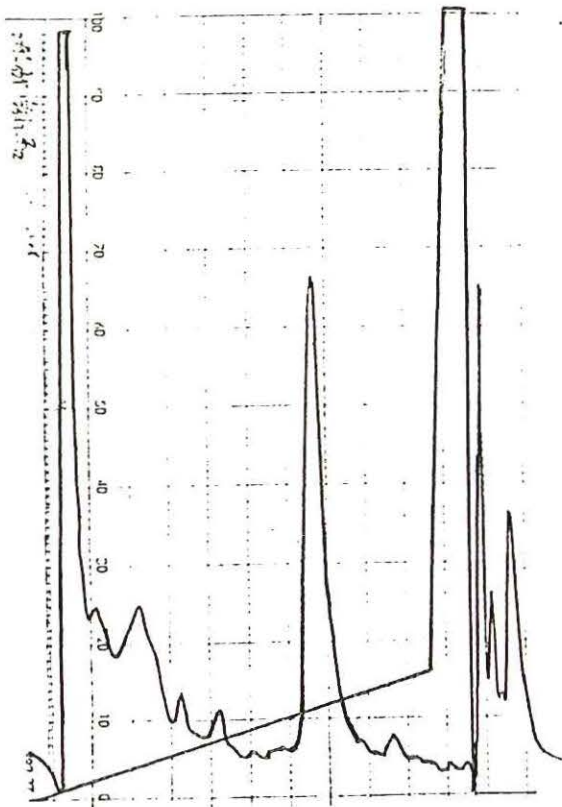


c. paard

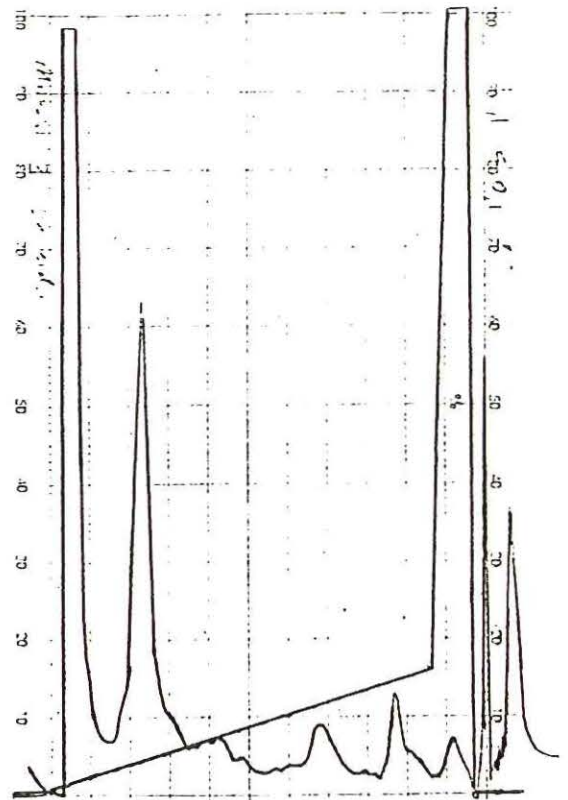


d. kip

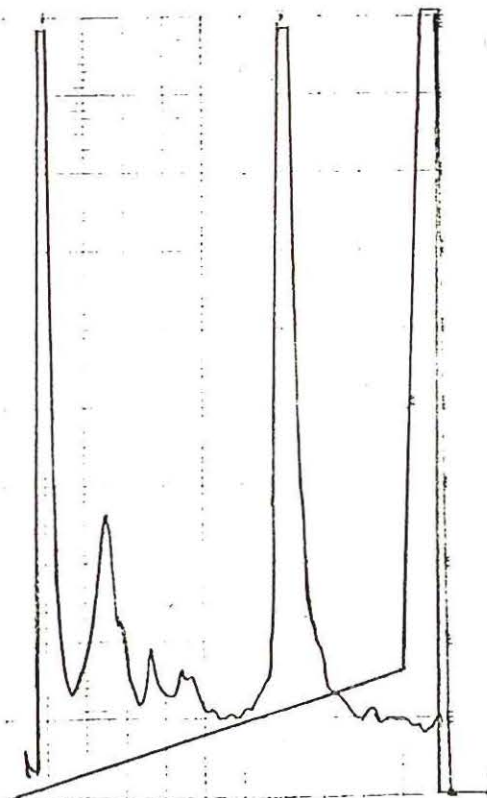
Figuur 2: chromatogrammen van waterige extracten van vers vlees onder de condities zoals beschreven in figuur 1, behalve de gradiënt.



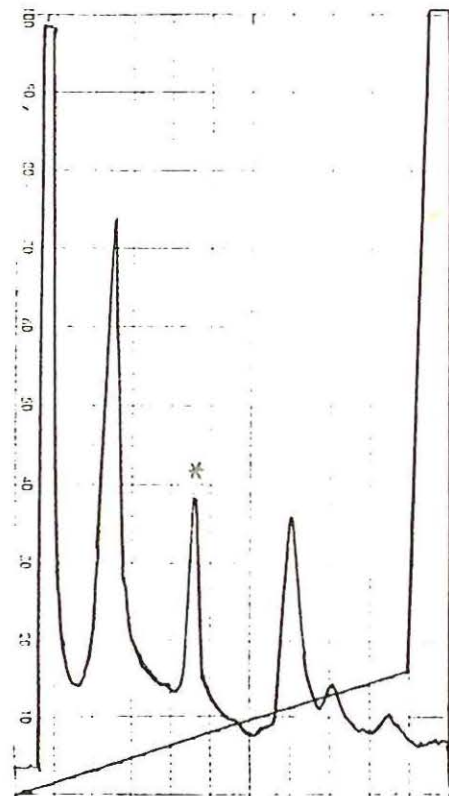
a. rund



b. varken

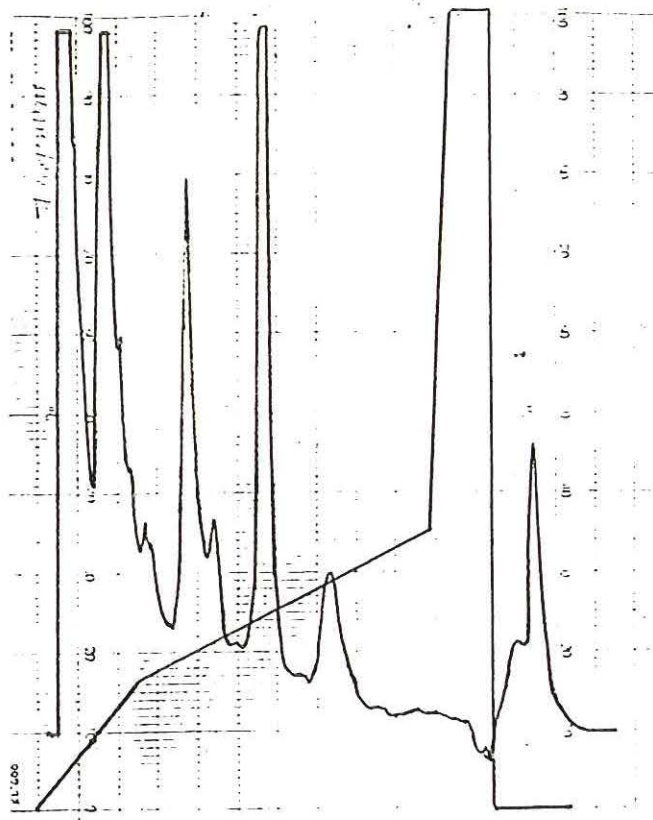


c. paard

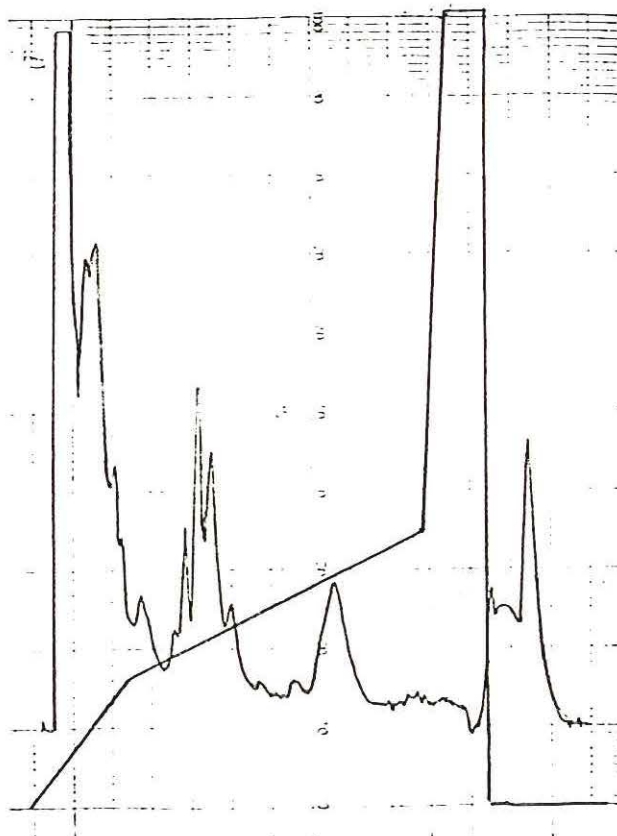


d. kip

Figuur 3: chromatogrammen van waterige extracten van vers vlees onder de condities zoals beschreven in figuur 1 (flow 1,5 ml/min).

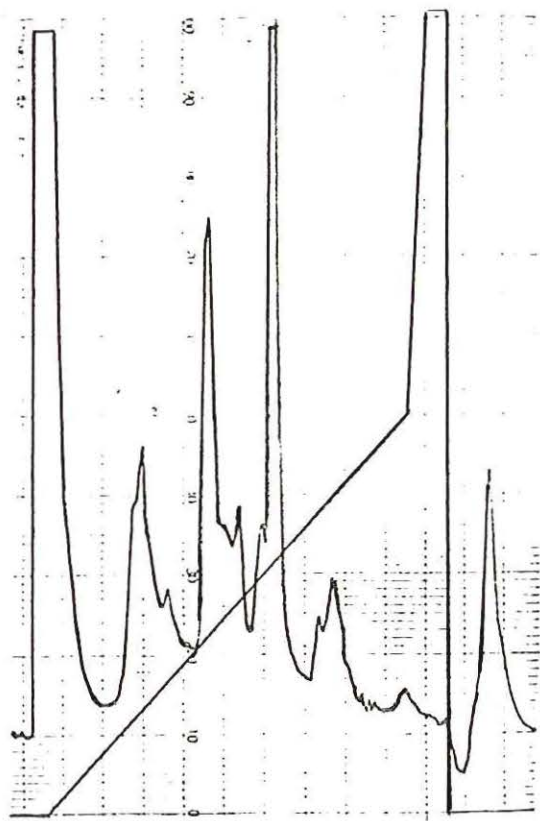


a. rund

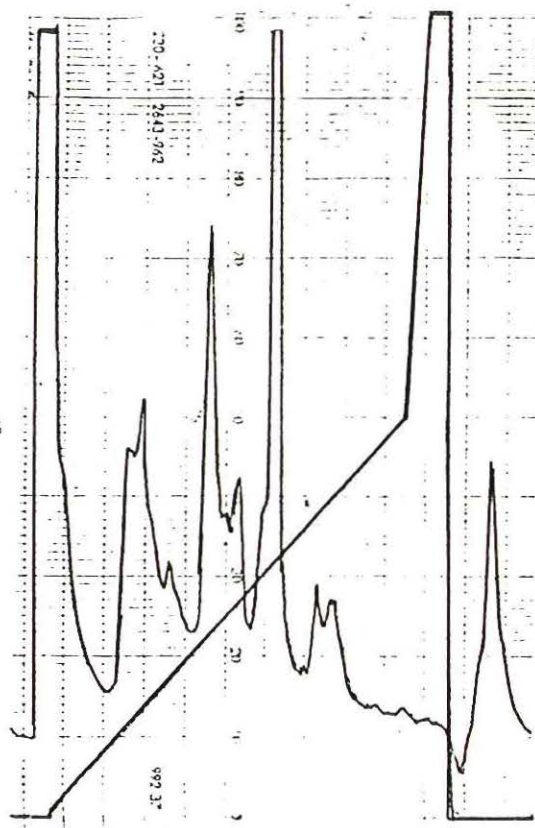


b. varken

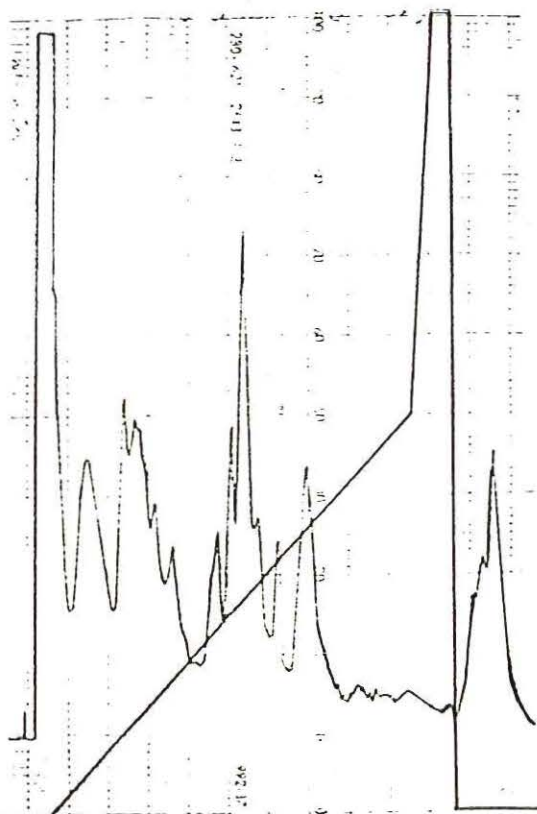
Figuur 4: chromatogrammen waterige extracten van vers vlees onder de condities zoals beschreven in figuur 1: uitzondering flow 1,5 ml/min.



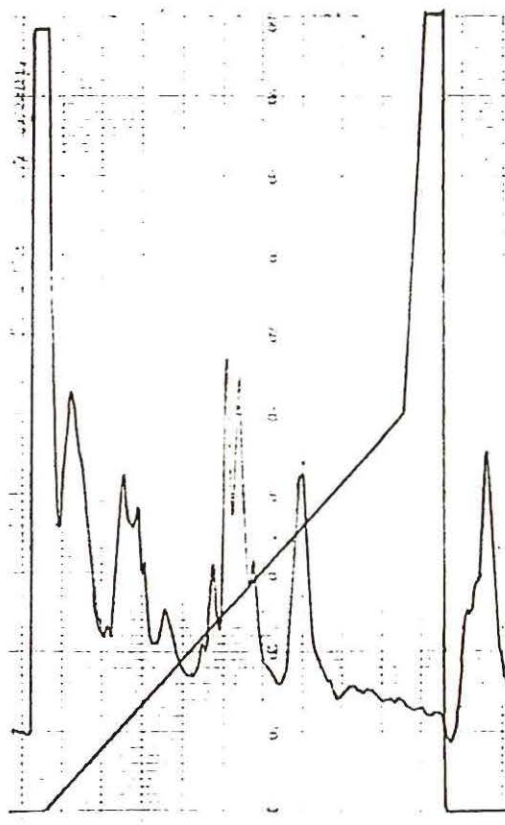
rundvlees 26458



rundvlees 26455



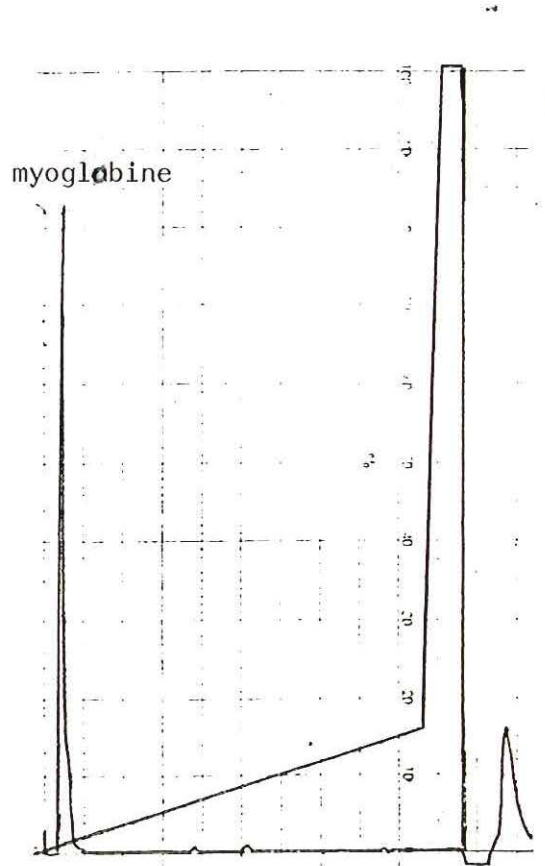
varkensvlees 26432



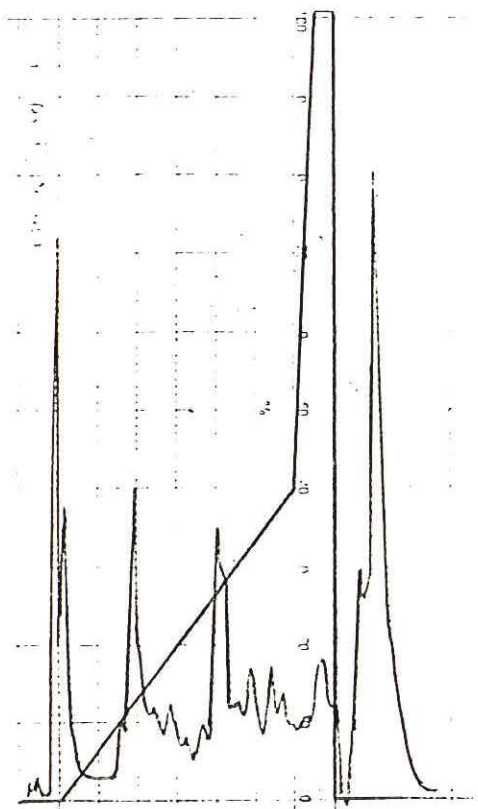
varkensvlees 26431



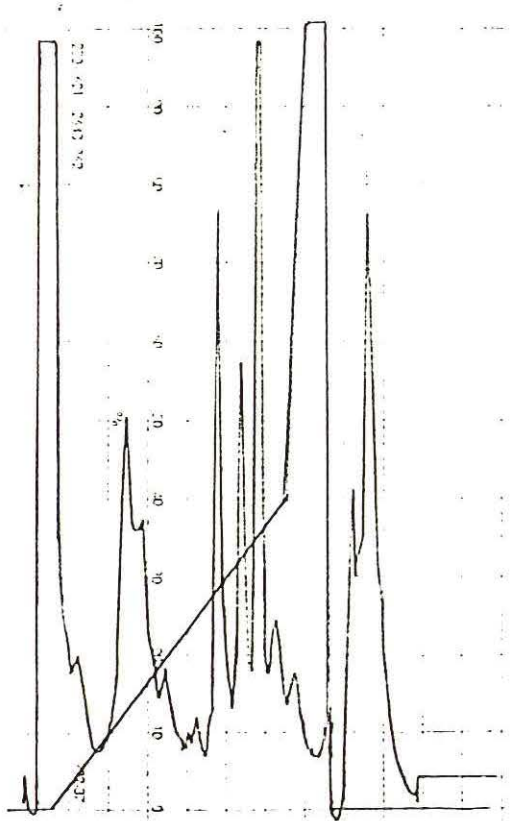
Figuur 5: chromatogram van 100  $\mu$ l standaardopl. van myoglobine (Sperm Whale) met een conc. van 268  $\mu$ g/ml onder de condities beschreven in figuur 1.



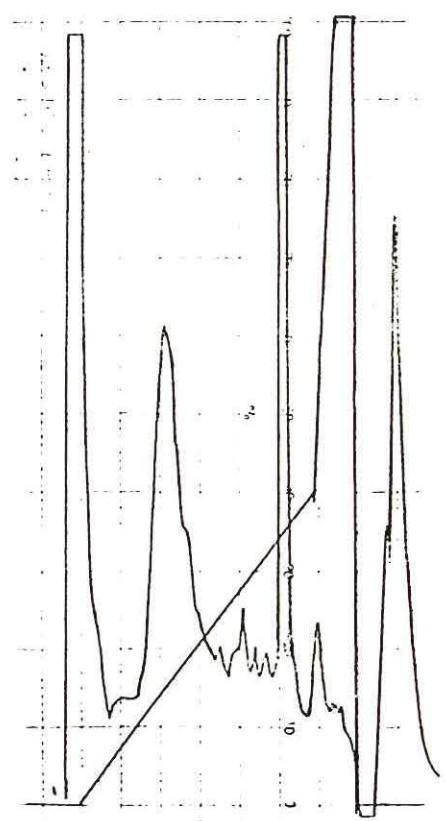
Figuur 6: chromatogrammen van waterige extracten van acetonpoeder onder de condities zoals beschreven in figuur 1.



a. rund



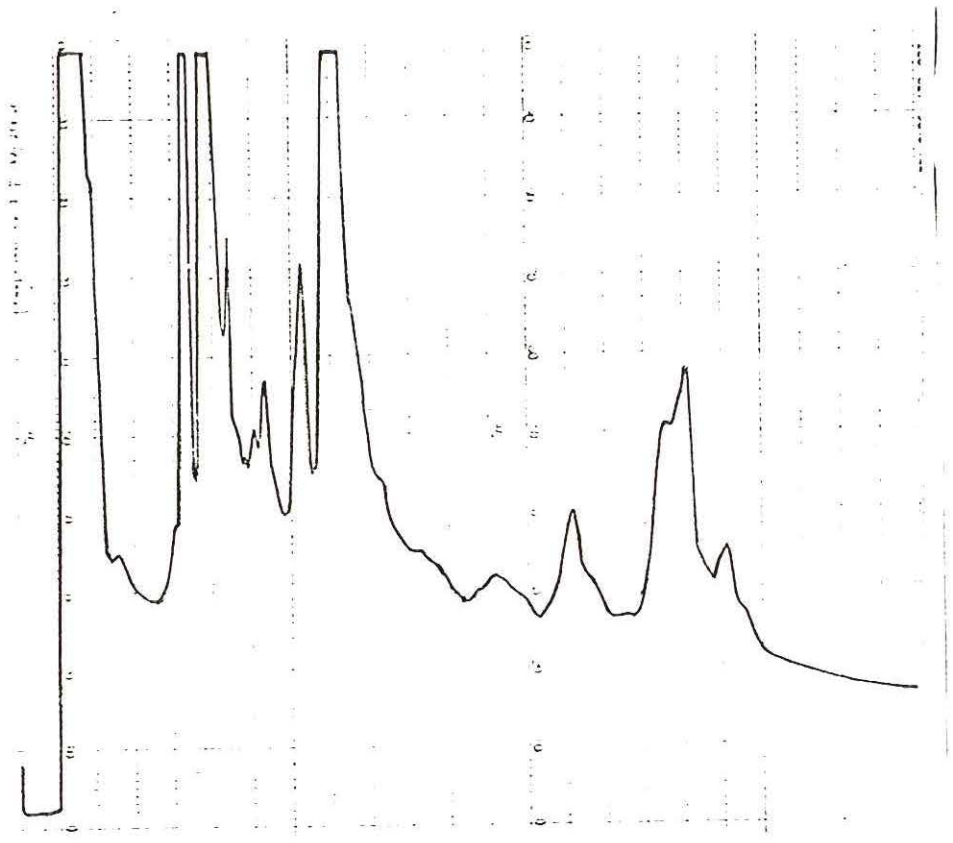
b. varken



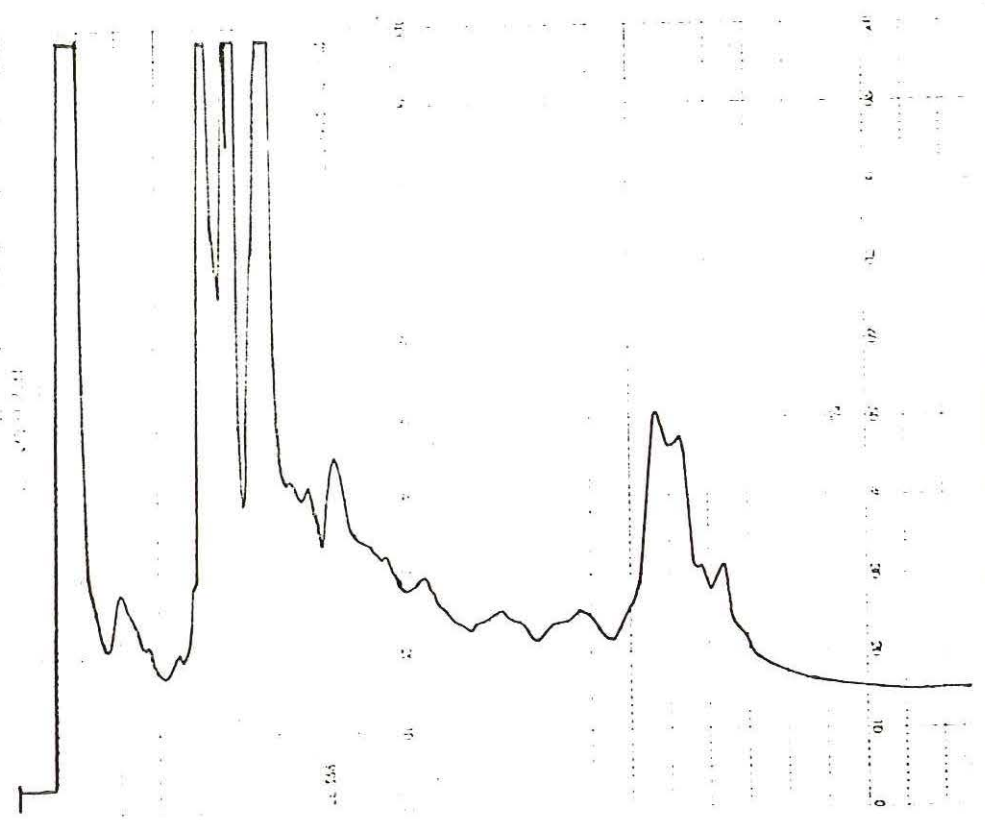
c. kip

Figuur 7: waterige extracten van vers vlees  $\lambda$  280 nm  
Kolom: mono P.  
Startbuffer: 0,025 mol Bis-Tris pH 7.  
Eluens: polybuffer 7,4 pH 4.

a. rund



b. varken



Figuur 8: Waterige extracten van eieren en standaard ovalbumine.

Kolom : mono Q.

$\lambda$  : 280 nm.

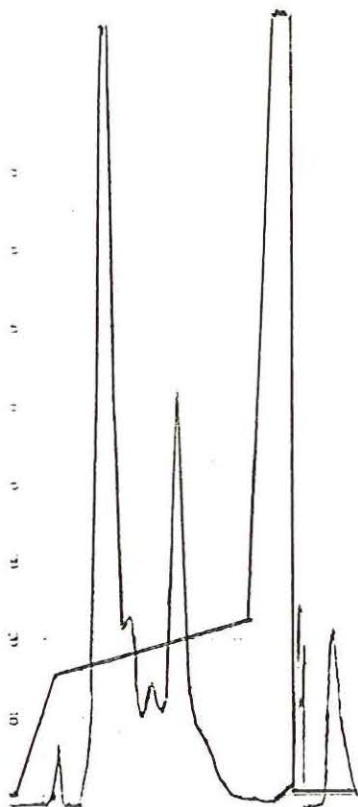
Eluens: A 0,02 mol Tris buffer pH 8.

AUFS: 0,1.

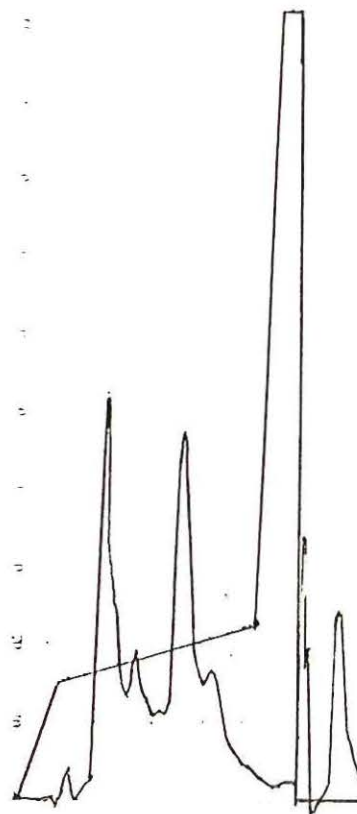
B 0,02 mol Tris buffer + 1 mol NaCl pH 8.

Flow : 2 ml/min.

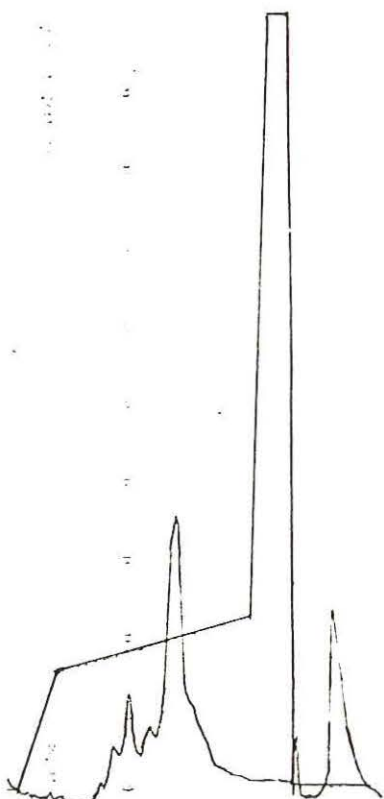
Speed : 0,5 cm/ml



a. extract van vers ei



b. extract van 18 daags bebroed ei



c. standaardoplossing van  
ovalbumine 0,1 mg/ml  
injectievolume 100 ul.