

Az enzimes analízis helye és perspektívái a korszerű élelmiszeralitikában*

II. Állati eredetű élelmiszerek analitikája

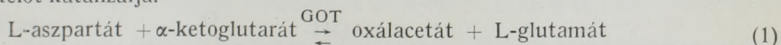
VÁMOSNÉ VIGYÁZÓ LILLY** és TÖRLEY DEZSŐ***

Az enzimes analízis elméleti alapjait közleménysorozatunk I. részében ismertettük (1). A II. részben az állati eredetű élelmiszerek analitikájában alkalmazott fontosabb enzimes módszereket ismertetjük, a következő felosztásban: az élelmi anyagokban a saját enzimek aktivitásának vizsgálata; a feldolgozásban alkalmazott enzimek aktivitásának ellenőrzése; az élelmiszerek összetevőinek, adalékanyagainak meghatározása.

I. Hús és hústermékek

1.1. Saját enzimek

A húsok szöveti enzimei közül a glutamát-oxalacetát-transzamináz (GOT) izoenzimek kimutatása a friss és fagyasztott sertés- vagy marhahús, ill. -máj megkülönböztetésére alkalmazható (2, 3, 4, 5): a mitokondriumokban található GOT_M izoenzim a fagyasztáskor megszűlő membránokból átkerül a szarkoplazmába, s az ott található GOT_S aktivitását növeli, ill. a hús levéből cellulóz-acetát elektroforézissel vagy ioncserélő kromatográfiával kimutatható. Az enzim a következő reakciót katalizálja:



A tartósított húsok és húskészítmények kellő hőkezelttségének ellenőrzésére az izom-foszfataz (6), ill. újabban a karboxilészteráz-enzim inaktiválódásának mértékét alkalmazzák (7, 8, 9, 10). Az utóbbi enzim szubsztrátumaként α -naftil-acetátot vagy indoxil-acetátot alkalmaznak. A módszer viszonylag gyors, üzemellenőrzésre alkalmas változatát is kidolgozták, azonban nem minden termék esetében ad megbízható eredményeket (9).

1.2. A feldolgozásban alkalmazott enzimek készítmények

A húsok porhanyósítására, csontoktól való elválasztására stb. alkalmazott növényi vagy baktérium-eredetű proteáz készítmények aktivitásának ellenőrzésére legegyszerűbb a valamely – viszonylag jól definiált – fehérjéből (pl. Bacto-hemoglobin) meghatározott körülmények között az enzimek készítmény adott mennyi-

* Elhangzott a MKE Biokémiai Szakosztálya, a MÉTE és a Magyar Klinikai Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság „Enzimes analízis és enzimdiagnosztika” kollokviumán. Mátrafüred, 1978. máj. 4–6.

** Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet, Budapest.

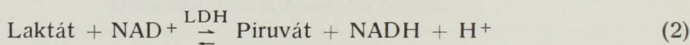
*** Budapesti Műszaki Egyetem – Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék.

sége által az időegységben felszabadított tirozin mennyiségének mérése UV-spektrofotometriával, 280 nm-en, tirozinnal felvett kalibrációs görbe alapján.

Proteázok – és egyéb, makromolekulákat bontó enzimek – esetében is a legcélszerűbb a készítmény szükséges adagját a technológiai adottságokat lehetőleg minél jobban megközelítő körülmények között kikísérletezni. Az aktivitásmérő módszereket tisztított vagy szintetikus szubsztrátumokon az enzimműködés egyes gyártásszériáinak összehasonlítására vagy a tárolás során esetleg fellépő aktivitásvesztésének ellenőrzésére ajánlatos alkalmazni.

1.3. Hús-összetevők, adalékok

Az izmokban lejátszódó anaerob glikolízis végterméke, a tejsav, enzimes úton egyszerűen meghatározható, a következő reakció alapján:



LDH = laktát-dehidrogenáz

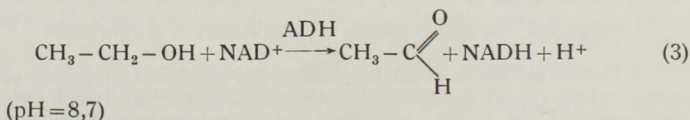
NAD⁺ = oxidált nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADH = redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid

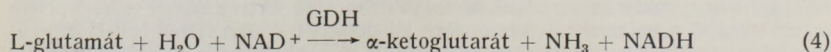
Az egyensúlyi reakció lúgos pH alkalmazásával és a piroszőlősav reakciótermék megkötésével (hidrazinnal) a felső nyíl irányában tolható el, úgyhogy a tejsav átalakulása kvantitatív és arányos a NAD átalakulásával. Ez a reakcióelegy 340 nm-en mért extinkciójának változásával követhető (11).

Húskészítmények etanoltartalmát – az etanol szelektív vízgőzdesztillációval végzett elkülönítése után – alkoholdehidrogenáz (ADH) enzimmel acetaldehidá alakítják. A reakcióban felszabaduló hidrogén a NAD-ot redukálja, hasonlóan, mint az előző reakcióban. Így az átalakulás – amely az acetaldehid szemikarbazidos megkötésével tehető kvantitatívá – ugyancsak extinkcióméréssel követhető, 340 nm-en (12).

A reakcióegyenlet a következő:

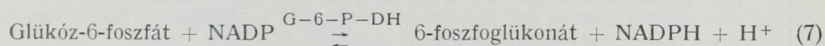
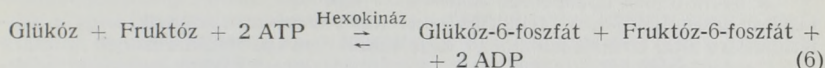
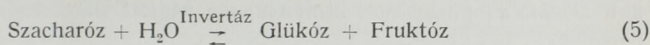


A húsrúkhhoz ízesítőként adagolt mononátrium-glutamát meghatározására kétféle enzimes eljárás is alkalmazható: az egyikben a glutaminsavból növényi vagy mikroba-eredetű glutaminsav-dekarboxilázal CO₂-ot szabadítanak fel, amelynek mennyiségét manometriásan, Warburg-készülékben határozzák meg (13). A másik módszerben glutaminsav-dehidrogenáz (GDH) enzimet alkalmaznak, a következő reakcióegyenlet szerint:



A glutamát kvantitatív átalakulását a NAD főlegben való adagolása, a lúgos pH és az α-ketoglutarásv megkötése hidrazinnal, biztosítja. Ismét a keletkező NADH UV-abszorpciójának mérésével követik az átalakulást. A reakció erősen specifikus, egyéb aminosavak nem zavarják (14).

A töltelékes arukhoz adagolt *szacharóz* specifikusan meghatározható a következő enzimreakciók segítségével (15):



ATP = adenzin-trifoszfát

ADP = adenzin-difoszfát

G-6-P-DH = glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz

A meghatározáshoz tehát 3 enzim szükséges, az invertáz, a hexokináz és a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz, továbbá foszfát-donorként ATP és hidrogén-akceptorként NADP. A (6) és a (7) egyenlettel leírt reakciók komponensei egyidejűleg adhatók az (5) reakció termékeihez. A (7) reakció termékei közül a NADPH mennyiségét határozzák meg extinkcióméréssel 340 nm-en; a szacharózkoncentráció a 0–110 mg cm⁻³ tartományban arányos az extinkcióval.

Keményítőszörp-adalékot rézredukációs módszerrel határoznak meg maltóz alakjában, α - és β -amilázzal végzett hidrolízis után (16). Elképzelhető azonban más enzimek alkalmazásával a keményítő hidrolízise glükózzá és ennek meghatározása pl. az említett hexokinázos módszerrel.

A sovány *tejpor*-adalék a *laktóz*-tartalom alapján határozható meg. A laktózt β -galaktozidázzal glükózzá és galaktózzá hidrolizálják s a glükóztartalmat az ismertetett hexokinázos módszerrel mérik (17). Keményítőszörpöt és tejpört együttesen tartalmazó hűskészítményekben a szacharózt élesztő-fermentációval, az egyéb cukrokat maltázzal és glükózoxidázzal távolítják el a laktóz meghatározása előtt (18).

Na-kazeinát specifikus kimutatására nyers és hőkezelt hústermékekben agar-gél precipitációs módszert dolgoztak ki (19). Ez azon alapszik, hogy egyes proteázok, pl. α -kimotripszin hatására a Na-kazeinát kicsapódik, egyéb, a hűskészítményekben adalékanyagként alkalmazott fehérjék, pl. sovány tejpor- v. szójafehérje viszont nem.

Szervetlen difoszfát-adalék specifikusan meghatározható húsarukban élesztőből előállított pirofoszfátázzal. A reakcióban a szervetlen pirofoszfát Mg-aktívátor jelenlétében 2 molekula o-foszfáttá alakul (pH 6.8-on). Az o-foszfát megfelelő körülmények között színreakció alapján spektrofotometriásan meghatározható (20).

2. Halkészítmények

Tengeri halak (pl. községes és foltos tőkehal) *fagyasztott filé*-termékei *LDH-izoenzimiek* elektroforézises mozgékonyaságai, ill. inaktiválódási hőmérsékletei alapján megkülönböztethetők. Az izoenzimiek eltérő volta immunreakciókkal még egyértelműbben kimutatható (21).

3. Tej és tejtermékek

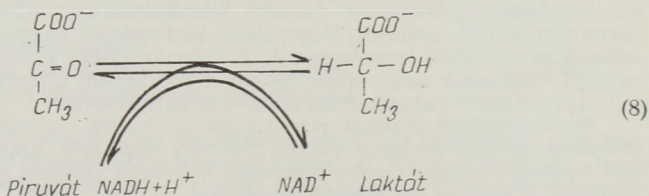
3.1. A tej saját enzimeit

A nyers tejben számos enzim van (22, 23). Ezek egy része, pl. az *amiláz*, a *lipáz*, a *foszfatáz*, a *peroxidáz*, a *xantin-oxidáz*, a β -*glukuronidáz*, a tej normális alkotói, mások, pl. a *kataláz*, baktériumtevékenység, anyagsere-zavarok stb. következté-

ben fordulnak elő. A gyakorlatban az alkálikus foszfatáz inaktíválódását tejben és tejtermékekben a pasztörözöttség mértékéül tekintik. A hőtűrőbb peroxidáz inaktíválódása a tej magasabb hőmérsékleten végzett hőkezelésének kimutatására alkalmas.

A nyers tejben elszaporodó *baktériumok* kimutatására ún. „*reduktáz*”-aktivitásokat használják fel. A „*reduktáz*”-aktivitás mérése azon alapszik, hogy a baktériumflóra által termelt különböző, közelebről nem specifikált enzimek hatására a tej redox-potenciálja megváltozik. A változás kimutatására különféle redox-indikátorok alkalmazhatók (pl. metilén-kék vagy TTC). Újabban a baktériumok savképző hatását mutatják ki az érzékeny resazurin-próbával.

A tej baktériumflórájának természetes szénhidrát-tápanyaga a laktóz, amelyet tejsavvá bontanak. A *tejsav* és a belőle laktátdehidrogenáz (LDH) enzim hatására képződő *piroszőlősav* meghatározására automata enzimes módszert dolgoztak ki a következő reakció alapján:



Az egyensúly a reakciókörülmények megfelelő változtatásával a kívánt irányba eltolható (24). Az automata módszerrel naponta többszáz mérés végezhető. A megfelelő sztereospecifikus LDH-készítmények alkalmazása lehetővé teszi a (L+) – és a D(–) – tejsav külön-külön meghatározását savanyú tejtermékekben, pl. yoghurtban.

A tejsav oxidációját piroszőlősavvá a metilénkék redukációjával (elszintelenedésével) indikálva, egyszerű laboratóriumi gyors módszert is kidolgoztak a két tejsav-izomér mennyiségi meghatározására (25). A módszerrel nemcsak tejtermékekben, hanem pl. rozskenyérben, húsárukban, savanyított zöldségek levében is meghatározták a tejsavat.

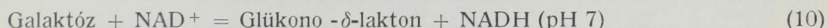
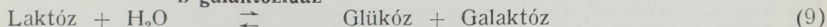
3.2. A feldolgozásban alkalmazott enzimek készítmények

A tejfeldolgozásban számos enzimek készítményt alkalmaznak jelenleg is, és távlatilag további alkalmazása várható. *Kataláz*t használnak a H₂O₂-dal csíraszegényített tejben a peroxid-főlőleg elbontásához, *borjúgyomorból*, újabban mikroorganizmusokból nyert tejlóttó-enzimek készítményt a sajtgyártásban, *lipáz*t, valamint különféle proteáz készítményeket a sajtok pikánsabb ízének kialakítására, ill. érlelésük gyorsítására, *β-galaktózidáz*t a tej laktóztartalmának elbontására diétetikai célokra, *fehérjebontó készítményeket* könnyen emészthető tejfehérje-koncentrátumok előállítására. E – rendszerint töltőanyagokat, stabilizátorokat is tartalmazó – készítmények enzim-aktivitásának ellenőrzésére többé-kevésbé bevált mérőmódszereket alkalmaznak, amelyekre itt nem térünk ki. A legtöbb felsorolt enzim aktivitásának meghatározására részletes leírás található BERGMAYER (26) négykötetes munkájában. Felhívniink azonban a figyelmet arra, hogy az áttérés újabb technológiákra, vagy enzimek készítményekre, esetleg a szokványos készítmények alkalmazása rögzített formában mindenképpen az aktivitásmérő módszerek változtatását vagy kiegészítését teszi szükségessé.

3.3. Tej-összetevők, adalékok

A tej és a tejsavó laktóztartalmának meghatározására a tejcukrot β -galaktozidázzal glükózzá és galaktózzá hidrolizálják, s a keletkezett monoszacharidok közül vagy a glükóz mennyiségét mérik a hexokinázos módszerrel (27), vagy a galaktózét galaktóz-dehidrogenázzal (28). Az utóbbi eljárás különösen elegáns: a két reakció egyszerre végezhető s a reakcióelegyben a laktózzal ekvivalens, keletkezett NADH értéke spektrofotometriásan leolvasható. A reakcióegyenletek:

β -galaktozidáz



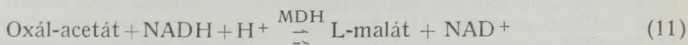
Fagylaltokban a laktózt, a glükózt és a szacharózt két egymás mellett működött automata enzim-analizátorral 10 percnél rövidebb idő alatt lehet meghatározni (29).

A *tejfehérje* táplálkozástani értékének a hőkezeléskor fellépő fehérje – cukor, ill. fehérje – fehérje kölcsönhatások következtében bekövetkező csökkenését pepszines, ill. tripszines emésztéssel lehet megállapítani (30).

Tejtermékek *zsírtartalmának* meghatározására a gravimetriás eljárásnál lényegesen megbízhatóbb enzim módszer dolgoztak ki. Ehhez sósavas feltárás után a zsíradékot szerves fázisba átoldják, az oldószer elpárologtatása után a zsírt elszappanosítják, majd a glicerint enzimesen meghatározzák. Ehhez a glicerint ATP-vel glicerín-kináz jelenlétében L(-) glicerín-1-foszfáttá alakítják. A reakcióban keletkezett ADP-t foszfo-enol-piruvát jelenlétében piruvát-kináz enzimmel ATP-tá alakítják vissza, miközben piruvát keletkezik. Ezt laktát-dehidrogenázzal NADH jelenlétében laktáttá és NAD⁺-vá alakítják s az ismertetett módon meghatározzák (l. 8. reakcióegyenlet) (31).]

4. Tojás és tojástermékek

A tojássárgájában különböző *foszfát*okat (32), közöttük egy alkálikus foszfátot határoztak meg (33). Ez utóbbi szubsztátuma a nátrium-p-nitrofenil-foszfát is. Az enzim hatására keletkező p-nitrofenol-anion lúgos közegben sárga színének intenzitása az aktivitással arányos és annak mértékéül szolgál. Ugyancsak a tojássárgájában GOT-t is meghatároztak (34). Az enzim által katalizált reakcióban keletkező oxál-acetátot (l. az 1. egyenlet) malát-dehidrogenáz (MDH) enzimmel L-maláttá alakítják, miközben a jelenlevő NADH oxidálódik:



A NADH abszorpciójának csökkenése 366, 340 vagy 334 nm-en közvetlen mérészáma a GOT-aktivitásának.

Tojásporok tárolása során a *foszfolipázok* aktivitásának változását is vizsgál-ták (35).

Cikksorozatunk következő, befejező részében a növényi eredetű élelmiszerek enzimes analitikájáról adunk áttekintést.

I R O D A L O M

- (1) Törley, D., Vámosné Vigyázó, L.: ÉVIKE (s.a.)
- (2) Körmeny, L., Gantner, G., Hamm, R.: Naturwissenschaften, 52, 209, 1965; Biochem. Z., 342, 31, 1965.
- (3) Hamm, R., Körmeny, L.: Fleischwirtschaft, 46, 615, 1966.
- (4) Gantner, Gy., Losonczyné Kovács, M., Mihályiné Kengyel, V., Körmeny, L.: Élelmiszertudomány, 2, (1-2), 29, 1968.
- (5) Hamm, R., Masic, D.: Fleischwirtschaft, 55, 242, 1975.

- (6) Gantner, G., Körmeny, L.: Fleischwirtschaft, 48, 188, 1968.
- (7) Pfeiffer, G., Kötter, L., Böhm, D., Glatzel, P.: Fleischwirtschaft, 49, 209, 1969.
- (8) Pfeiffer, G., Wellhäuser, R., Gerra, H.: Arch. Lebensmittelhyg., 21, 250, 1970.
- (9) Brehmer, H., Forschner, E.: Fleischwirtschaft, 54, 84, 1974.
- (10) Cantoni, D., Frittoli, A.: Ind. Alim., 13, 80, 1974.
- (11) Schweiger, A., Günther, H.: Z. Anal. Chem. 212, 187, 1965.
- (12) Pyrcz, J.: ÉVIKE, 21, 41, 1975.
- (13) Trübsbach, A., Freimuth, U.: Lebensm.-Ind., 14, 422, 1967.
- (14) Möhler, K., Volley, W.: Z. Lebensm.-Unters.-Forsch., 140, 257, 1969.
- (15) Maggi, E., Dazzi, G., Madarena, G.: Ind. Conserve, 47, 110, 1972.
- (16) Hankin, L., Wickroski, A. F.: J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 47, 903, 1964.
- (17) Bahl, R. K.: Analyst, 96, 88, 1971.
- (18) Hankin, L., Wickroski, A. F.: J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 47, 695, 1964.
- (19) Nordal, J., Rossebo, L.: Z. Lebensm.-Unters.-Forsch., 148, 65, 1972.
- (20) Kraack, J.: Fleischwirtschaft, 54, 1661, 1974.
- (21) Wilson, A. C., Kitto, G. B., Kaplan, N. O.: Science, 157, 82, 1967.
- (22) Kiermeier, F., Güll, J.: Z. Lebensm.-Unters.-Forsch., 137, 238, 1968.
- (23) Schormüller, J.: In: Bergmeyer, H. U.: Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie, Weinheim & Acad. Press. Inc., New York, 1. köt., 72, 1974.
- (24) Stahlhut-Küpp, H.: Milchwissenschaft, 30, 468, 1975.
- (25) Stetter, K., Kandler, O.: Z. Lebensm.-Unters.-Forsch., 152, 257, 1973.
- (26) Bergmeyer, H.U.: Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie, Weinheim & Acad. Press, Inc., New York, 1-4. köt. 1974.
- (27) Bahl, R. K.: Analyst, 97, 559, 1972.
- (28) Coffey, R. G., Reithel, F. J.: Anal. Biochem., 32, 229, 1969.
- (29) Bille, C.: American Dairy Review, 39, (3), 28B, 1977.
- (30) Freimuth, U., Krause, W., Hübner, D., Beier, A., Schwarzer, R., Grimm, D.: Nahrung, 19, 83, 1974.
- (31) Berner, C.: Milchwissensch., 24, 284, 1969.
- (32) Schormüller, J., Hothorn, S.: Deutsche Lebensm.-Rundschau, 55, 29, 1959.
- (33) Günther, F., Burckhardt, O.: Deutsche Lebensm.-Rundschau, 63, 305, 1967.
- (34) Günther, F., Burckhardt, O.: Deutsche Lebensm.-Rundschau, 65, 19, 1969.
- (35) Acker, L., Lück, E.: Deutsche Lebensm.-Rundschau, 55, 242, 1959.

HAZAI LAPSZEMLE

Összeállította: Kacs Kovics Miklós

Pándi F.: A fermentációs ecetgyártás folyamatában résztvevő ecetbaktériumok néhány biológiai sajátossága II. A külső környezet fizikai és kémiai tényezőinek hatása az ecetbaktériumok élettevékenységére III. Szeszipar, 26, 86, 1978.

Beck L., Simor E.: A silóban tárolt gabona rovarfertőzöttségének és hőmérsékletének összefüggései. Szeszipar, 26, 99, 1978.

Varga J., Ragasits I., Rigó M.: A búza minőségi és mennyiségi változása műtrágyázás hatására. Élelmezési Ipar, 32, 284, 1978.

Vidács F.-né, Tódor L., Zelenák F.-né: Műtrágyaadagolás hatása zöldségfélék nitrát- és nitrittartalmára. Élelmezési Ipar, 32, 298, 1978.

Örsi F., Svantek J.-né, Varga J.: Négycsatornás automatikus elemelőrendszer az élelmiszeriparban. Élelmezési Ipar, 32, 302, 1978.

Hertelendi Gy., Ravasz L.: Cukrársz-ipari termékek szabványosításának és ellenőrzésének kérdései. Szabványosítás, 30, 344, 1978.

Örsi F.-né: Komló, komlószármazékok és ezekkel végzett kísérletek. Sör-ipar, 25, 130, 1978.

Tóth M.: Autóanalýzer néhány alkalmazási lehetősége a söripar analitikájában. Söripar, 25, 138, 1978.

Ór T., Papócsi L., Szuróp I., Fehér P.: Kooperáció és húsmínőség. Húsipar, 27, 204, 1978.

Czeglédi - Jankó G.-né: A pácolt húskok nitráttartalmát meghatározó módszerek összehasonlítása. Húsipar, 27, 230, 1978.