

Amilázok meghatározása „CONTIFLO” automatikus elemzőben*

SALGÓ ANDRÁS, ÖRSI FERENC és SÜMEGHY ZOLTÁN

Budapesti Műszaki Egyetem – Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

Érkezett: 1978. szeptember 19.

Az élelmiszeriparban felhasznált gabonák fontos technológiai jellemzője az enzim állapot vagyis a bennük található aktív enzimek mennyisége.

A gabonákban mennyiségileg jelentős és a felhasználás szempontjából fontosak az amilázok. Az amilázok mennyisége meghatározza a gabonák és belőlük készült féltermékek további feldolgozhatóságának irányát, befolyásolja – egyéb tényezők mellett – a termék technológiai értékét. Csírázásnál az amilázok mennyisége rendszerint nő.

Az amiláz aktivitásmérési technikák alapelveket tekintve három nagy csoportba sorolhatók.

Az *első* csoportba olyan módszerek tartoznak, amelyeknél a keményítő vagy keményítőszármazék szubsztrátum bontása során a szubsztrátumból felszabadított termékeket határozzuk meg az idő függvényében és mennyiségük időbeli változásából következtünk az enzim aktivitására. Ilyenek pl. a dinitroszalícilsavas (1, 2), káliumferricianidos (3, 4) stb. redukáló végcsoport meghatározások, színes szubsztrátumból felszabaduló színezék mérésén alapuló módszer stb. (5, 6, 7, 8).

A *második* csoportba azokat a módszereket soroljuk, amelyeknél az enzimhatás után még megmaradó szubsztrát, rendszerint az amilóz mennyiségét határozzák meg rendszerint a jód megkötés mérése révén (9, 10, 11).

Széles körben alkalmazott aktivitásmérési eljárás az, amely a szubsztrát oldat reológiai jellemzőinek változása alapján következtet az amiláz aktivitására. Ezen elven alapul a Hagberg módszer, amelynek során relatív viszkozitás mérést végeznek (12, 13, 14, 15, 16).

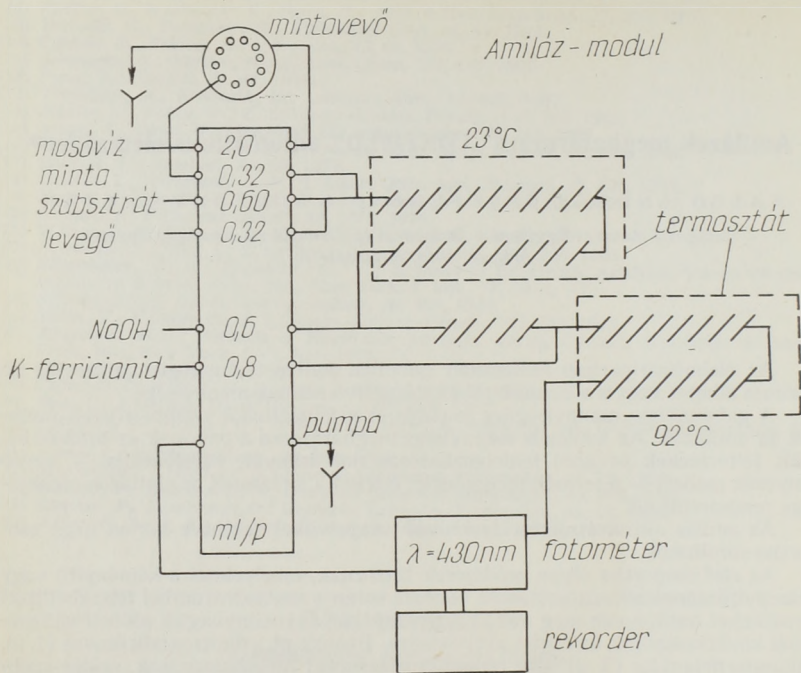
Vizsgálatainkhoz, amelyeknek célja gabonafélék amiláz aktivitásának meghatározása volt, a keményítő enzim hidrolízisének felszabaduló redukáló végcsoportok meghatározását választottuk, amelyet a lúgos káliumferricianidos eljárással végeztünk. Az eljárást „CONTIFLO” automatikus analizátorra adaptáltuk. Az alkalmazott módszer megbízhatóságát és néhány gabonaféle amilázaktivitását vizsgáltuk.

Felhasznált anyagok és előkészítésük

A vizsgált gabonamintákat a Gabonatermesztési Kutató Intézet bocsátotta rendelkezésünkre, a söripari nyersanyagokat a Kőbányai Sörgyárból szereztük be.

Beosztója 4 fajtaazonos, 1977-es termésű búzából, Seeger típusú háromszekrényes mikromalátázóba 1–1 kg vízzel leöblített és szennyezésről megtisztított

* Az „Enzim analízis és enzimdiagnosztika kollokvium”-on 1978. május 4–6-án Mátrafüreden elhangzott előadás.



1. ábra. Amiláz-modul

gabonát helyeztünk, és a 40 l térfogatú áztatószekrényben az áztatóvizet 8 óránként cserélve 48 órán át áztattuk a szemeket. Az áztatott gabonákat a csíráztató szekrénybe helyezve 17 °C-on 1–6 napig csíráztattuk, miközben a mintákat 12 óránként átforgattuk.

A csíráztatóról a gabonaminták az aszalóra kerültek. 8 óra alatt érték el a 30 °C-os aszalási hőmérsékletet, majd újabb 8 óra alatt az 50 °C-ot. Az aszalóról lekerült szemeket csírátlanitottuk, majd őrlés előtt kondicionáltuk (nedv.: 14–16%).

Az őrlést QC-109 – (LABOR MIM) laboratóriumi malomban végeztük. A 280 nm-es szita használatával két frakciót, lisztet és korpát kaptunk. Az átlagos kiírlési fok 65–66% volt.

Amiláz kinyerése

A búzaminták 4 frakciójából (liszt, korpa, teljes őrlemény, csira) 10%-os NaCl oldattal extraháltuk ki az amilázokat. 1 g mintához 10 cm³ extrahálószert töltve centrifugacsőben 1 órán át tartott az extrakció.

Az extraktumok tisztítását 1000-es fordulatszám mellett 15 perces centrifugálással végeztük.

A vizsgálatok során szükséges hígításokat pH = 4,8-as 0,1 M-es acetát pufferrel végeztük.

Amiláz aktivitásmérési módszer

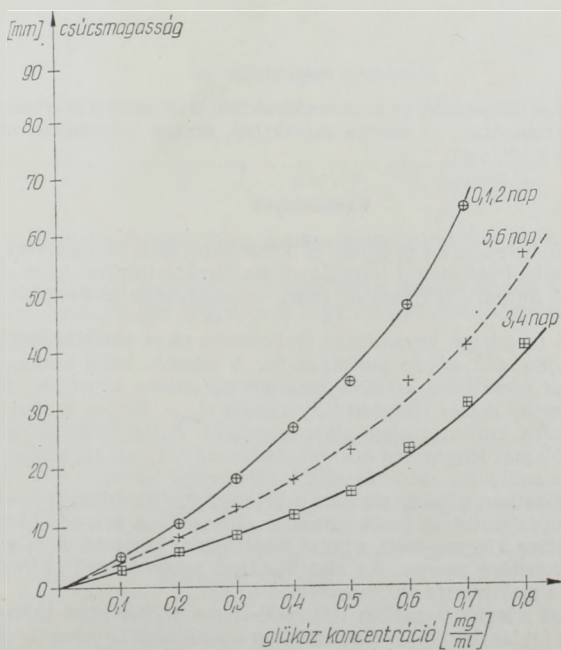
A kidolgozott módszer KRUGER és mtsai (4) eljárásán alapszik, amelynek során az oldható keményítő szubsztrátot az enzimmoldattal reagáltatjuk, és a felszabaduló redukáló végcsoportokat a lúgos káliumferricianidos módszerrel határozzuk meg.

Az eljárást LABOR MIM gyártmányú „Contiflo” automatikus analizátorra adaptáltuk. A vizsgálatokhoz az OL-702 típusszámú LABOR MIM gyártmányú redukáló cukor meghatározására szolgáló modult alakítottuk át az 1. ábrán bemutatott modulrajznak megfelelően. A mintaváltóból (lásd 1. ábra) szívott mintát 0,5%-os 4,8 pH-jú oldható keményítő oldathoz kevertük és 23 °C-hőmérsékletű termosztátban elhelyezett üvegspirálon vezettük át. Az áthaladási idő 5 perc volt. Ezután a reakció leállítására 0,5 mólos nátriumhidroxid oldatot keverünk az elegyhez.

A redukáló végcsoportokat kálium ferricianid oldattal 92 °C-os termosztátban reagáltatjuk, és a ferricianid koncentrációt a fotométerben 430 nm-en inverz fotometriával regisztráljuk.

A módszer standardizálása

A felszabadított redukáló végcsoportok mennyiségének standardjaként glükózoldatot használtunk és az enzimaktivitás mértékeként a keményítéből felszabaduló redukáló végcsoportokkal azonos nagyságú csúcspot adó glükózoldat kon-



2. ábra. Glükóz kalibrációs görbék

Minta	Amiláz aktivitás
	glükóz c/mg (cm ³)
Bécsi maláta	24,5
Pilseni maláta	40,5
Giberellinsav kezelt	39,0
E1 + II. o. árpa	13,5
V típ. árpa	21,5
Maláta csíra	11,0

centrációját adtuk meg. A minta redukáló csoportjainak mennyiségét, illetve a minta keményítőtartalmából felszabaduló végcsoportok mennyiségét külön kísérletben határoztuk meg úgy, hogy az oldható keményítőt 0,1 n 4,8 pH-jú acétat-pufferre cseréltük.

A 2. ábrán három különböző időpontban felvett kalibrációs görbét mutatunk be különböző koncentrációjú glükózoldatokkal felvéve, amely szerint 0,6 mg/cm³ glükózkoncentrációig linearitás áll fenn. Amennyiben az amilázhatásra több redukáló végcsoport szabadul fel, a mintát hígítani kell, hogy fenti tartományba essen az aktivitás.

A módszer megbízhatósága

A különböző időpontokban azonos extraktból mért aktivitás értékek 3–5%-os relatív szórást mutattak, az azonos extraktból, azonos időpontban mért értékek relatív szórása 1,5% volt.

Eredmények

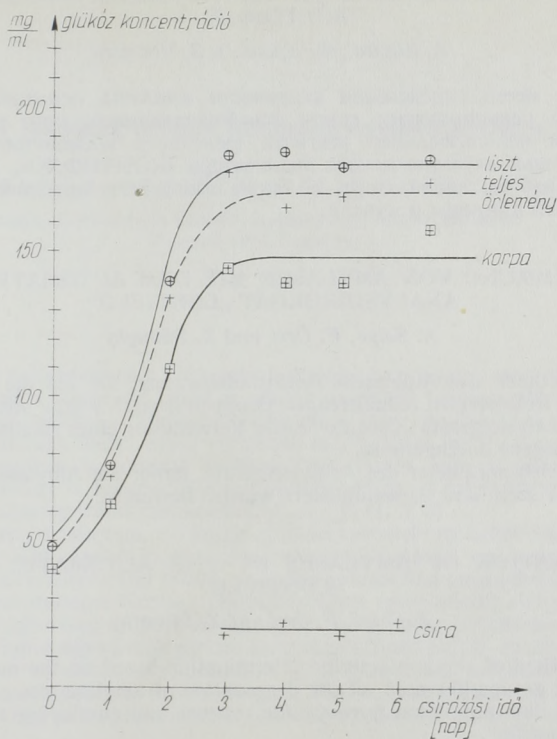
Az elemző berendezést nyugvó, és különböző ideig csíráztatott Bezosztája búza minták különböző malmi frakcióinak amilázaktivitás mérésére alkalmaztuk, illetve néhány söripari nyersanyag teljes őrlményének aktivitását határoztuk meg.

A nyugvó és csírázó búzainták frakcióiban mért aktivitásokat a csírázási idő függvényében, a 3. ábrán mutatjuk be. A csírázás korai szakaszában kb. 3 napig az idővel közelítőleg arányos mennyiségű amiláz képződik, amelynek ~ 75%-a az őrlmény lisztes részében helyezkedik el, ~ 25%-a a korpafrakcióban található. A csíra enzimentartalma elhanyagolható. A negyedik naptól kezdve az aktivitás tovább már lényegesen nem nő. Ebben az időszakban a teljes őrlmény a nyugvó gabona amilolites aktivitásának 4–5-szörösét éri el.

Az 1. táblázatban néhány söripari nyersanyag teljes őrlményének aktivitásmérési eredményét mutatjuk be. A normál és giberellines kezeléssel készült pilseni maláták aktivitása a legnagyobb, a bécsi maláta és az áztatott, de még nem csíráztatott árpa aktivitása azonos. Az első osztályú nyugvó árpa aktivitása azonos nagyságrendű a malátacsíra aktivitásával.

A mintákat a legtöbb esetben 100–500-szoros hígítás után tudtuk mérni, és ezt a hígítást a táblázatokban és diagramokon számítással figyelembe vettük.

Mérési adatainkat összehasonlítottuk ugyanezen mintákra elvégzett Phadebas klinikai gyors amilázteszt eredményeivel, amely keményítő mátrixban kötött



3. ábra. Az amiláz aktivitások változásai a csírázási idő függvényében

színezék felszabadulásán alapszik. Az eredmények menete azonos volt, de a Con-tiflo analízátor érzékenysége nagyobb és a gyorseszt hibája egy nagyságrenddel nagyobbak bizonyult.

I R O D A L O M

- (1) Bernfeld, P.: Adv. in Enz. 12, 379, 1951.
- (2) Bernfeld, P.: Methods in Enz. I. 1949. Acad. Press. NY., 1955.
- (3) Am. Soc. Brew-Chemists 6 th. ed. 162, 1958.
- (4) Kruger, J. - Marchylo, B.: C. C. 49, 453, 1972.
- (5) Carrol, B. - Van Dyk, J. W.: Science 116, 168, 1952.
- (6) Regula, E. - Kohn, M. - Wassermann, L.: Lebensmittel Wiss. 67, 57, 1974.
- (7) Brooks, F. P.: New England J. Med. 286, 300, 1970.
- (8) Zollinger, R. M.: Postgrad. Med. 9, 91, 1971.
- (9) Winkler, S. - Luckow, Co.: Z.L.U.F. 141, 49, 1969.
- (10) Winkler, S. - Luckow, Co.: Stärke 19, 159, 1967.
- (11) Briggs, D. E.: J. Inst. Brew. 73, 361 1968.
- (12) Perten, H.: C. C. 41, 127, 1964.
- (13) Hagberg, S.: C. C. 37, 218, 1960.
- (14) Hagberg, S.: C. C. 38, 202, 1961.
- (15) Corr, F. - Spillane, M.: J. Sci. Food Agric. 20, 639, 1969.
- (16) Rohrtich, M. - Winkler, S. - Hiltz, B.: Stärke 91, 166, 1967.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИЛАЗОВ АВТОМАТИЧЕСКИМ АНАЛИЗАТОРОМ «КОНТИФЛО»

А. Шалго., Ф. Ерши., и Э. Шюмеги

Авторы метод определения активности амилазы, основывающийся на определении редуцирующих групп освобождающихся при расщеплении, осуществили использованием реагента щелочного железистосинеродистого калия, помощью автоматического анализатора «КОНТИФЛО». Исследовали параметры работы анализатора, а также амилазную активность образцов прорастающей пшеницы и ячменя.

BESTIMMUNG VON AMYLASEN MIT DEM AUTOMATISCHEN ANALYSIERGERÄT „CONTIFLO“

A. Salgó, F. Örsi und Z. Sümeghy

Jene Methode der Amylaseaktivitätsbestimmung, die auf die Messung der beim Abbau freigesetzten reduzierenden Gruppen beruht, wurde mittels des automatischen Analysiergeräts „Contiflo“ unter Verwendung eines alkalischen Kaliumferricyanidreagens durchgeführt.

Die Betriebsparameter des Analysiergeräts, ferner die Amylaseaktivität von keimenden Weizen- und Gerstenmustern wurden bestimmt.

DETERMINATION OF AMYLASES BY THE AUTOMATIC ANALYZER “CONTIFLO”

A. Salgó, F. Örsi and Z. Sümeghy

The method of amylase-activity determination based on the measurement of the reducing groups liberated on the degradation of amylase was carried out by using an alkaline potassium ferrocyanide reagent and employing the automatic analyzer “Contiflo”.

The parameters of the operation of the analyzer and the amylase activities of germinating wheat and barley were investigated.