

## Fehérjeérték meghatározása mikrobiológiai módszerrel

HEGEDŰS MIHÁLY

Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest

Érkezett: 1971. március 19.

A fehérjék biológiai értékének meghatározása a fehérjék komplex élettani szerepe miatt nehéz probléma. Ezzel magyarázható, hogy az élelmiszerfehérjék biológiai értékét a legkülönbözőbb módszerekkel vizsgálják (1). A fehérjék aminosav-analíziséből történő értékszámítások fejlődése következtében a kémiai módszerek eredményei a legtöbb esetben jó korrelációban vannak az élettani megfigyelésekével, azonban számos jel arra utal, hogy a fehérjék szerkezetbeli hasznosulása nem csupán azok aminosav-összetételétől függ.

Az állatkísérleteken és emberi megfigyeléseken alapuló biológiai és biokémiai módszerek eredményei a nagy individuális különbségek ellenére a legmegbízhatóbbak, azonban időigényesek és drágák. Sorozatvizsgálatokra gyakorlatilag nem alkalmasak.

Kompromisszumként a fehérjeértéknek olyan mikrobiológiai módszerrel történő vizsgálata kínálkozik, amellyel az állatkísérletekhez hasonló eredmények nyerhetők. E célból próbálkoztunk meg a *Tetrahymena pyriformis* W protozoon törzset használó módszer adaptálásával.

### A módszer elméleti alapjai

A mikrobiológiai fehérjeérték meghatározások elvi alapja az, hogy egyes mikroorganizmusok aminosavszükséglete hasonló a magasabbrendű állatokéhoz és fehérjeforrásként egyedül a vizsgálandó anyagot tartalmazó, megfelelő összetételű tápközegben növekedésük arányos a fehérje biológiai értékével.

A fehérjeérték meghatározására alkalmazható organizmusok között különleges helyet foglal el rendszerint a holotrich ciliátokhoz tartozó *Tetrahymena pyriformis* protozoon törzs, amely extracelluláris proteázokat termel és proteolites aktivitását hidrolizálatlan fehérjék esetében is kifejti (2). A *Tetrahymena pyriformis* tápanyag szükségletéről *Kidder* és *Dewey* (3) közöl átfogó tanulmányt, amelyből kiderül, hogy hasonló esszenciális aminosavszükséglete van, mint a növekvő patkányoknak (lizin, triptofán, hisztidin, leucin, izoleucin, fenilalanin, metionin, valin, treonin, arginin). A *Tetrahymena pyriformis* természetes környezetben baktériumevő, de képes axenikus, tehát kísérő organizmust nem tartalmazó, kémiaiailag definiált táptalajon is növekedni.

Az optimális táptalaj *Stott* (4) szerint az alábbi komponenseket tartalmazza; hét féle B-vitamint, több szervesetlen sót, ezenkívül nukleotidokat, valamint kolint és liponsavat. Bár az inozit, kolin és paraaminobenzoésav nem feltétlenül szükségesek, *Kidder* és *Dewey* (5) megtartották a táptalajban, hogy az inkubálás során kialakuló magas csíraszám növekedéscsökkentő, gátló hatását ellensúlyozzák. Az aminosavak energia- és szénforrásként történő elsődleges felhasználás-

nálását elkerülendő a tápoldatot glükózzal egészítették ki, amely egyben csökkenti a vizsgálati mintákban leggyakrabban előforduló szénhidrátok hatását is. A 4%-nál magasabb glükózszint azonban már gátolja a protozoon növekedését.

A *Tetrahymena pyriformis* fehérjék biológiai értékének vizsgálatára először *Rockland* és *Dunn* (6) javasolták. Ők a „H” törzssel végeztek kísérleteket és a 41 napos inkubáció után anyagcsereterméként keletkezett sav mennyiségét mérték. A savképzés azonban nem áll közvetlen kapcsolatban a fehérje-szintézissel, ezenkívül az értékelés megbízhatóságát zavarja a nitrogén-anyagcsere végtermékeként képződő ammónia.

Kézenfekvő az elképzelés, hogy a különböző fehérjék hatásosságát a *Tetrahymena pyriformis* esetében is a szövetfehérje szintézis alapján kellene mérni, vagyis az adott inkubációs periódus után a sejteket elválasztani és nitrogéntartalmukat meghatározni. Az említett protozoon fehérjeszuszpenziókból való elkülönítése azonban majdnem lehetetlen. Viszont, ha feltételezzük, hogy az organizmus összetétele, szárazanyag súlyának átlaga nem változik a szaporodást elősegítő fehérje hatására, akkor a szintetizált fehérjeszövet mennyisége arányos lesz az élőlények számával. Ez azt jelenti, hogy a protozoon a felvett fehérjét nem átlagos testméretének növelésére használja fel, hanem azt megtartva szaporodik.

A sejtszám mérése szintén problémákat vet fel. A szokásos turbidimetriás mérések a jelenlevő fehérjeszuszpenzió miatt a populáció pontos sűrűségét nem adják meg.

*Anderson* és *Williams* (7), akik tesztorganizmusként már a W törzset vették be, a csíraszámot kolorimetriás módszerrel mérik, amely a 2,3,5-trifeniltetrazoliumklorid vörös színű vízdíszíthatlan trifenilformazánná történő enzimikus redukcióján alapul. A TTC-s mérés tehát a *Tetrahymena pyriformis* dehidrogenáz enzimaktivitásán alapul, amely csak megközelítőleg arányos a sejtszámmal (8). Másfelől *Jámbor* (9) a tetrazoliumsók redukciójának mechanizmusáról szóló tanulmányaiban kifejti, hogy a redukció foka növekedik bizonyos kolloidok jelenlétében, beleértve a zselatint is.

A fent említett problémák miatt az organizmus szaporodása mérésének legmegbízhatóbb módja a mikroszkópos számlálási technika (10). Jelenleg úgy tűnik, nincs alkalmasabb kiértékelési lehetőség, amit élelmiszerek vizsgálatánál alkalmazni lehetne, és szorosabb kapcsolatot mutatna a fehérjeszintézissel.

A *Tetrahymena pyriformis* meghatározott fehérjeérték numerikus jellemzésére *Stott* (4) javaslata alapján a 4 nap inkubálás után kapott csíraszámot vehetjük alapul. Az egyes fehérjéknél kapott sejtszámot a teljes tojáshoz viszonyítva a relatív fehérjeértékeket kapjuk meg. *Stott* vizsgálatai azt mutatták, hogy a protozoon növekedése a tápközegben jelenlevő fehérje mennyiségével is arányos és 0,1–0,4 mgN/ml koncentráció tartományban ez az összefüggés lineáris. Összehasonlítható eredmények nyérése érdekében így minden kísérletet adott mg N/ml értéknél – *Stott* után 0,3 mg N/ml-nél – kell végezni.

Az élelmi anyagok közvetlen vizsgálata felveti a fehérjék mellett levő egyéb komponensek, ásványi sók, vitaminok, purinok, szénhidrátok szerepének problémáját. A *Tetrahymena pyriformis*nak a fehérjeminőség-vizsgálatában való alkalmazhatóságához olyan körülményeket kell teremteni, amelyek során a növekedést elsődlegesen az aminosavak utilizációja irányítja. A nem fehérje anyagok specifikus stimulációját ki kell szűrni. Ezt kazein teszt-fehérje használata mellett *Rosen* és *Fernell* (11) a tápoldat komponensek mennyiségének és arányának helyes megválasztásával érte el. Megjegyzendő, hogy a nem megfelelő oxigénellátás, a vitaminok, purinok, pirimidinek, szénhidrátok túl nagy koncentrációja gátolhatja a tesztorganizmus proteolitikus aktivitását.

## A módszer leírása

### Törzsfenntartás

A *Tetrahymena pyriformis* W törzset, amely *Glaucoma pyriformis* és *Tetrahymena geleii* néven is ismert, pepton alapú folyékony táptalajon kémcsövekben, steril körülmények között, 25 °C-on tenyésztjük. Az organizmus megvilágítást nem igényel.

A törzsfenntartó táptalaj összetétele:

Pepton (Difco) .....	20 g/l
Élesztőkivonat (Difco) .....	1 g/l
Glükóz .....	5 g/l
NaCl .....	1 g/l
pH .....	7,1

Átoltás hetenként történik, Pasteur-pipettával, steril körülmények közötti.

### Teszt-táptalaj

A teszt-táptalaj pontos összetételét az 1. táblázat tartalmazza. A táptalaj összeállításánál *Stott* és *Baum* (12) adatait vettük alapul, a munkamenetet úgy megválasztva, hogy a hősterilizálás során esetleg létrejövő vitamin-fehérje, illetve szénhidrát-fehérje reakciókat elkerüljük. Így külön sterilizáltuk a vitaminok keverékét, külön az ásványi sók, nukleotidok és fehérjeszuszpenziók keverékét és külön a glükózt.

#### A minta előkészítése, a meghatározás technikája

A légszáraz mintákat elektromos örlő berendezésben történő aprítás után zsírmentesítés céljából 8 órán át Soxhlet-készülékben petroléterrel extraháltuk. A tovább aprított mintákat 200  $\mu$  lyukbőségű szitán átszittaltuk. A kapott lisztszerű anyagból annyit mértünk a teszt-táptalajhoz, hogy az ml-enként 0,3 mg N-t tartalmazzon. A zsírtalanított és szitált minták nitrogéntartalmát Kjeldahl módszere szerint határoztuk meg.

A kísérleteket 100 ml-es Erlenmeyer lombikokban végeztük, 10 ml végtérfogatban. A minta és a táptalaj steril elegyét háromnapos *Tetrahymena* tenyészet 0,2 ml-ével oltottuk be, amely átlagosan 10<sup>3</sup>

1. táblázat

**Teszt-táptalaj a *Tetrahymena pyriformis* W módszerhez (10-szeres erősségű)**

	µg/ml
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O .....	1 400,00
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O .....	625,00
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O .....	12,50
ZnCl <sub>2</sub> .....	1,25
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O .....	300,00
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O .....	30,00
FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O .....	7,50
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1 750,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1 750,00
Uracil .....	500,00
Adenosin 2'-(3')-foszforsav ....	1 000,00
Guanosin 2'-(3')-foszforsav ....	1 500,00
Citidilsav .....	1 250,00
Glükóz .....	150 000,00
Ca pantotenát .....	6,25
Nikotinsavamid .....	6,25
Piridoxin · HCl .....	62,50
Piridoxal · HCl .....	6,25
Piridoxamin · HCl .....	6,25
Riboflavin · HCl .....	6,25
Thiamin · HCl .....	62,50
Inozit .....	6,25
Paraaminobenzoészav .....	6,25
Kólin .....	62,500
Fólsav .....	0,625
Biotin .....	0,625
DL- $\alpha$ -liponsav .....	0,200

sejt/ml kiindulási sejtszámot jelentett. A 4 napig tartó 25 C°-on történő inkubálás után a mintákat izoozmotikus formaldehiddel a számláláshoz megfelelő mértékben hígítottuk.

A számlálást Fuchs-Rosenthal típusú kamrában végeztük, mikrofotó technikával kombinálva. Ez az eljárás nagyszámú minta gyors kiértékelését teszi lehetővé, tekintve, hogy a felvételek utólag tetszőleges időben értékelhetők. Minden anyagból három párhuzamos mérést végeztünk és minden párhuzamos mintát négyszer értékeltünk ki. Így minden anyag eredménye 12 felvétel kiértékeléséből származott.

2. táblázat

	Tenyésztés + hígítás + számláló- kamra töltés (sejtszám/0,2 mm <sup>3</sup> )	Hígítás + számláló- kamra töltés (sejtszám/0,2 mm <sup>3</sup> )	Számlálókamra töltés (sejtszám/0,2 mm <sup>3</sup> )
1	47	49	53
2	62	51	45
3	55	50	48
4	52	44	48
5	67	58	49
6	58	52	46
7	55	52	45
8	68	53	44
Átlag	58	51	47
Százalékos szórás (variációs koefficiens)	14,5%	7,5%	6,2%

#### A módszer szórása 2. táblázat

A módszer szórása magában foglalja a biológiai szórást és a kiértékelés szórását. Az utóbbi a hígításból, valamint a számlálókamra töltéséből származik. Méréseink alapján a módszer bruttó százalékos szórása 14,5%. Egy azonos tenyésztet többszöri kiértékelése 7,5% százalékos szórást eredményezett, míg tisztán a számlálókamra töltéséből származó százalékos szórás 6,2%. Ezek alapján a biológiai százalékos szórás 7,0%, a hígítás százalékos szórása 1,3%.

#### Eredmények

A Tetrahymena pyriformis módszerrel meghatározott relatív fehérjeértéket a 3. táblázat tünteti fel összehasonlítva más fehérjeérték vizsgálati módszerek eredményeivel. Vonatkozási alapként a teljes tojás esetében megállapított sejtszám szolgált. Látható, hogy a Tetrahymena pyriformis módszer határozott különbséget állapít meg a vizsgált minták fehérjeértéke között és a vizsgált anyagok egymáshoz viszonyított értékét általában az általánosan elfogadott sorrendnek megfelelően tükrözi. Így például a tojás, tejpor, szója minták lényegesen értékesebbnek mutatkoznak a lencse, liszt, vagy a kétségtelenül alacsony értékű bőr fehérjéknél.

A különböző fehérjeérték vizsgálati módszerek eredményeivel való összevetésnél megjegyzendő, hogy a számszerű összehasonlítást az egyes szerzők által vizsgált minták különböző eredete és pontosan nem definiált megnevezése zavartathatja.

A liszt esetében megállapított érték túl alacsonynak tűnik. Ez arra vezethető vissza, hogy a liszt nagy szénhidrát-tartalma zavarja a Tetrahymena fehérje anyagcseréjét. Erre utalnak *Stoff* (4) és *Baum* (12) adatai is.

Az alga nagy fehérje-tartalma következtében számos szerző az algaik tömegtermesztésében látja a nagyüzemi fehérjetermelés egyik lehetőségét (16). Az algatörvények biológiai értékét vizsgálva *Fink* és *Herold* (17) fehér patkányai, valamint *Combs* (18) csirkéi elpusztultak az alga rendkívül ellenálló sejt-fala miatt. Szenhidrátból ont enzimekkel együtt etetve vízszot és kazeinhez közel álló eredményeket kaptak. Az algaik sejtfaának cellulózartalmát in vitro cellulázoz kezeléssel is jól degradálható (19). Az algatörvények PER értékeit, mint ahogy azt a 3. táblázat is mutatja, igen eltérőek lehetnek és nagymértékben függnek az előkészítés módjától (szárítás, főzés, mélyhűtés stb. (20)). A Tetrahymena módszerrel kapott fehérje-érték szártított *Scenedesmus obliquus* esetében a PER értékek tartományába esik.

Hangsúlyozni kell, hogy valamely fehérje táplálkozási feltételt, illetve biológiai értékét determináló faktorok nem azonosak minden állatfaj esetében. Így a Tetrahymena pyriformis módszerrel kapott eredményeket – a többi fehérje-

3. táblázat

Különböző fehérjeérték meghatározási módszerekkel kapott eredmények összehasonlítása

	Tetrahymena pyriformis módszer			Kémiai fehérjeindex (Chemical score)		Fehérje hatékonysági arány (PER) (patkány)		Nettó fehérje kihasználás (NPU) (patkány)		Biológiai érték (BV) (patkány)
	Saját	Baum (12)	Stott (4)	Block (13)	Lindner (15)	g súlynövekedés/g fehérje (21)	%	Block (13)	Miller (22)	Block (13)
Teljes tojás .....	100	100	100	100	100	3,8	100	93	91	96
Tojásfehérje .....	56	—	—	—	—	2,6	68	83	83	—
Kazein .....	58	73	77	58	72	2,2	58	68	60	69
Tejpor .....	77	77–84	—	—	—	2,9	76	79	75	84
Szója .....	56	78	64	49	74	2,3	61	72	56	75
Lencse .....	40	—	—	—	60	—	—	—	—	—
Búzaliszt .....	20	27	—	28	—	1,5	39	52	37	52
Bőrhulladék .....	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Alga ( <i>Scenedesmus obliquus</i> ) .....	19	—	—	—	—	0,4–1,7(20)	11–45	—	—	—

PER (Protein efficiency ratio) = Fehérje hatékonysági arány. Az elfogyasztott fehérje súlyegysége által előidézett testsúly gyarapodás  
 NPU (Net protein utilization) = Nettó fehérjekihasználás. Az elfogyasztott fehérjének a szervezetben hasznosuló százalékos mennyisége  
 BV (Biological value) = Biológiai érték. A fehérje emészthető részének a szervezetben hasznosuló százalékos mennyisége  
 NPU = BV · D/100, ahol D (digestibility) = Emészthetőség. Az elfogyasztott fehérjének megemésztett mennyisége százalékban kifejezve

értéket vizsgáló módszeréhez hasonlóan – csak kellő óvatossággal lehet magasabbrendű fajokra, illetve emberre vonatkoztatni. Minthogy azonban az egyes fehérjék értékének egymáshoz viszonyított sorrendjét általában helyesen tükrözi és reagál a fehérjeértéket befolyásoló faktorokra, a módszer előnyös lehet technológiai folyamatok, a fehérjeértéket befolyásoló eljárások (hőkezelés, besugárzás, komplementálások stb.) nyomkövetésére. A módszer kifejezett előnye, hogy az állatkísérletekhez viszonyítva gyors és gazdaságos, ezért sorozatvizsgálatokra alkalmas.

## IRODALOM

- (1) Hegedűs M.: ÉVIKE, 15, 252, 1969.
- (2) Elliott A. M.: Annual Review of Microbiology, 13, 79, 1959.
- (3) Kidder G. W., Dewey V. C.: Arch. Biochem., 6, 425, 1945.
- (4) Stott I. A., Smith H.: Brit. J. Nutr., 17, 227, 1963.
- (5) Kidder G. W., Dewey V. C.: Biochemistry and Physiology of Protozoa. Academic Press Inc., New York, Vol. I, p. 323, 1951.
- (6) Rockland L. B., Dunn M. S.: Food Tech., 3, 289, 1949.
- (7) Anderson M. E., Williams H. H.: J. Nutr., 44, 335, 1951.
- (8) Fernell W. R., Rosen G. D.: Brit. J. Nutr. 10, 143, 1956.
- (9) Jámor B.: Nature, 176, 603, 1955.
- (10) Johnson W. H., Baker E. G. S.: Physiol. Zool., 16, 172, 1943.
- (11) Rosen G. D., Fernell W. R.: Brit. J. Nutr., 10, 157, 1956.
- (12) Baum F., Haenel H.: Nahrung, 9, 517, 1965.
- (13) Block R. J., Mitchell H. H.: Nutr. Abstr. Rev. 16, 249, 1946.
- (14) Bender A. E.: J. Sci. Food Agric., 7, 305, 1954.
- (15) Lindner K.: Kandidátusi disszertáció, OÉTI, Budapest, 1955.
- (16) Felföldy L.: Algatermesztés. Témadokumentáció. O. Mg. K. Budapest, 1965.
- (17) Fink H., Herold E.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 13, 311, 1958.
- (18) Combs G. F.: Science, 116, 453, 1952.
- (19) Weiszfeiler Gy. J., Űrmösy M., Hajdú J.: In the Proc. Microbiol. Res. Group Hung. Acad. Sci., Ed.: Gy. J. Weiszfeiler, Acad. Press, Budapest, Vol. II., p. 113, 1968.
- (20) Meffert M. E.: Nutr. Diet., 5, 235, 1963.
- (21) Lang K.: Biochemie der Ernährung. Verlag D. Steinkopff, Darmstadt, s. 61. 1957.
- (22) Miller D. S., Bender A. E.: Brit. J. Nutr., 9, 382, 1955.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ВЕЛИЧИН МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

М. Хэгедюш

Автор даёт отчёт об микробиологическом определении величин белков. В качестве тесторганизма служил протозоон Тэтрахимена пириформис В. Автор ознакомляет теоретические основы метода, и в подробности даёт информацию о применимой технике. Полученные им результаты сравнивая с данными полученных другими методами установил, что штамм Тэтрахимена пириформис В соответственно отражает общепринятую очередность величин одиночных белков; на основании этого автор считает, что штамм является тесторганизмом подходящим для исследования значений белков.

## BESTIMMUNG DES EIWEISSWERTES VERMITTELS EINER MIKROBIOLOGISCHEN METHODE

*M. Hegedüs*

In der Arbeit wird über die mikrobiologische Bestimmung des Eiweisswertes berichtet. Als Testorganismus diente der Protozoonstamm *Tetrahymena pyriformis* W. Der Verfasser bespricht die theoretischen Grundlagen der Methode und beschreibt die von ihm angewendete Technik ausführlich. Die erhaltenen Resultate werden mit Angaben der mit verschiedenen Methoden erhaltenen Ergebnisse verschiedener Verfasser verglichen und festgestellt, dass der Teststamm *Tetrahymena pyriformis* W die allgemein akzeptierte Reihenfolge des Wertes der einzelnen Eiweissstoffe gut wiedergibt. Aufgrund dessen hält er den Stamm für einen zur Prüfung des Eiweisswertes geeigneten Testorganismus.

## DETERMINATION OF THE PROTEIN VALUE BY A MICROBIOLOGICAL METHOD

*M. Hegedüs*

A method is described for the microbiological determination of the protein value. The strain *Tetrahymena pyriformis* W. of the protozoa served as test organism. The theoretical fundamentals of the method are presented, and the technique applied by the author is described in detail. On comparing the obtained results with the data given by various authors using different methods it was found that the protozoon strain *Tetrahymena pyriformis* W reflects correctly the generally accepted order of the value of the various proteins. Consequently, the investigated strain appears to be suitable for use as a test organism in the investigation of the value of proteins.

## DOSAGE DE LA VALEUR DE PROTÉINE PAR VOIE MICROBIENNE

*M. Hegedüs*

La publication rend compte sur le dosage par voie microbienne de la valeur de protéine. On se servait de la souche protozoaire de *Tetrahymena pyriformis* W en tant qu'organisme modèle. L'auteur décrit les principes théoriques de la méthode et donne une description détaillée de la technique qu'il a employée. En comparant les résultats obtenus avec ceux d'autres auteurs obtenus avec de méthodes diverses, il constate que la souche *Tetrahymena pyriformis* reflète convenablement l'ordre généralement adopté par rapport à la valeur des diverses protéines; par conséquent, il estime que la souche se prête comme organisme modèle à l'examen de la valeur de protéine.