

Immuntechnikák alkalmazása élelmiszerek vizsgálatára

HALÁSZ ANNA

Központi Élelmiszeripari Kutatóintézet

Érkezett: 1987. július 21.

A korszerű gyártmányfejlesztés nélkülözhetetlen eszköze a korszerű, nagyhatékonyságú és érzékenységu élelmiszeranalitika. Az orvostudomány gyorsléptékü fejlődése révén egyre több előírásban rögzített követelménynek kell megfelelnie az élelmiszeripari készítményeknek, mind a nyersanyagból bekerülu szennyező anyagok, mind az élelmiszeripari gyártási technológiához alkalmazott segédés adalékanyagok, illetve a technológiai folyamat során képzödu anyagok vonatkozásában.

A különböző metabolizmus betegségekben szenvedök élelmezését szolgáló speciális diétás készítmény családok – pl. gluténmentes tésztaárúk, laktózmentes tejkészítmények, diabetikus termékek – fokozott követelményeknek támasztanak az élelmiszer – minőségellenörzéssel szemben, mind az alkalmazott módszerek érzékenységét, mind pedig annak specifitását illetően.

A gyártási eljárásban felhasznált nyersanyag minőségének utólagos ellenörzése: pl. eredeti mikrobiológiai szennyezettség, idegen fehérje adagolása, a hústérmelés, illetve tejtermelés során alkalmazott antibiotikum vagy hormonkezelésből származó hatóanyag-maradványok kimutatása, és ennek alapján a termék minőségi osztályba sorolása a fizetöképes élelmiszer-piacokon egyre szélesebb körben terjed el, így a minőségi kifogásolások elkerülésére a gyártóhelyek vizsgálati módszerei is fokozottabb figyelmet igényelnek.

A jelenleg ismert analitikai módszerek közül legnagyobb specifikussággal az immun-biokémiai módszerek rendelkeznek. Poliakrilamid gélelektroforézissel kombinálva fehérjefrakciók specifikus kimutatására, illetve azonosítására nyílik lehetőség.

Enzimtechnikával egyesített immunbiokémiai módszerek mint az Enzyme Immuno-Assay (EIA), Enzyme-Linked-Immuno-Absorption (ELISA), az avidin-biotin kölcsönhatást hasznosító technikák minden eddigig felülmülu érzékenységuék a nagy specifitásuk mellett.

A különböző immuntechnikai módszerek a gerincesek szöveteinek antitest termelő képességén alapulnak. Az antitest-antigén reakció rendkívül specifikus. A specifitás a determináns csoportra vonatkozik, így fiziko – kémiai szempontból eltérö molekulák – ha determináns csoportjuk megegyező – is reagálhatnak azonos antigénnel. Másrészt az antitest fehérje többféle determinánsra is rendelkezhet receptorral, azaz multifunkciós is lehet. Multifunkciós antitestet „telítéssel” tehetünk a kérdésére antigeൻre specifikussá.

Az immuntechnikai módszerek érzékenysége „jelzett” (enzimek, radioaktív elemek stb.) antitest alkalmazásával többszöröseére növelhető és meghaladja az enzimanalitikai eljárásokat.

Az immuntechnikák elsöként a klinikai vizsgálatokban nyertek alkalmazást, de ma már az élelmiszervizsgálati laboratóriumokban is felhasználást nyernek rutin technikaként is.

Az immuntechnikák a következőkre alkalmasak:

- a készítmény tisztaságának ellenörzése,

- szennyező anyagok (mikrobiológiai szennyeződéseket is beleértve) kimutatása,
- ismeretlen anyag azonosítása,
- idegen fehérje kimutatása, mennyiségi meghatározása,
- enzimanalitika érzékenységének fokozása,
- törzsnemesítés, metabolizmus vizsgálata.

Az immuntechnikák az elmúlt 30 évben megsokszorozódtak az egyszerű szerológiai vizsgálattól (agglutináció, precipitáció) az immundiffúzió, elektroimmundiffúzió, immunelektroforézisen át az enzimimmuntesztekig, ELISA technikáig. Mindezekhez az alkalmas műszerek és eszközök is kifejlődtek.

Az immuntechnikákban bekövetkezett fejlődést, illetve az élelmiszeranalitikai alkalmazás arányát az összes vizsgálatokhoz viszonyítva (publikációk arányában kifejezve) (CLIFFORD (1)) nyomán az alábbi 1. táblázat szemlélteti.

1/a táblázat

Immuntechnika fejlődéstörténete (CLIFFORD, 1985. nyomán)

Év	Szerző	Anyag	Technika	Konc
1959.	YELLOW – BERSON	Inzulin	RIA	10 – 40 pg/cm ³
1970.	PORATH	Élelmi fehérje	RIA	1 pg/cm ³
1971.	ENGVALL + PERLMAN, VAN WEEMAN & SCHUURS		EIA	
1974.	ENGVALL et al.	Parazita sertésben	EIA	
1978.	VOLLER et al.	Rutin klinikai teszt	EIA	

1/b táblázat

Élelmiszer-analitikai publikációk az összes immuntechnika-analitika százalékában

Fázis	Éves szám	%
1970 – 74.	2	25
1974 – 78.	17	22
1978 –		33 – 40
1983. év		45 – 56

1. Rövid áttekintés az immunanalitikában használt fontosabb fogalmakról

Ab = antitest, antibody, antiszérum, Immunoglobulin, az immunrendszer által szintetizált, az immunogént kötő fehérje immun vizsgálatokban alkalmazott frakciója az IgG.

2. Élelmiszeranalitikai célra alkalmazott immunbiokémiai módszerek

2.1. Gél-immundiffúzió (ID)

Az analitikai célú immuntechnikák közül időrendben elsőként terjedt el a gél-immundiffúzió (ID). Mivel ez a technika ma sem nélkülözhető antiszérum előállítás-

nál specifitás, illetve cross-reaktivitás ellenőrzésére, valamint szérumtiter meghatározásnál, ezért ennek a technikának ismerete és biztonságos kezelése nélkülözhetetlen olyan laboratóriumokban, amelyek immunanalitikai módszerek kifejlesztésével és (vagy) antitest (immunszérum) előállítással foglalkoznak. Az ID-hez különböző géleképző anyagokat alkalmaznak: pektin, alginát, cellulóz-acetát, agar, agarose.

Az ID-ben képződő precipitátum vonalak (gyűrűk) kiértékelése történhet denzitometrállással közvetlenül vagy fényképezés után a filmről.

A precipitátum vonal szélessége függ a reagens töménységtől és a diffúziós időtől. A vonal denzitása egyenes arányban van az antitest koncentrációval és fordított arányban az antigénnel.

A Feinberg által kidolgozott cross ID – amelynél az Ag-t preinkubációval túlfuttatják az Ag felviteli zónán, az egyszerűs precipitációs vonal helyett gyűrűképződésre kerül sor. A mennyiségi meghatározás érzékenyítését lehet elérni Ag gradiens lemeztechnikával, itt már 10%-os koncentráció különbség is detektálható.

A kvalitatív és kvantitatív analízisen túlmenően is kaphatnak információt ID-vel a komparatív precipitációs mintázat alapján, hogy az összehasonlított két anyag közös determinánsú-e, vagy nemcsak közös determinánsa van.

2.1.1. Szójafehérje kimutatására húskészítményekből rutin vizsgálati módszerként alkalmazható az ID. A módszer megbízhatóbb, mint a poliakrilamid gélelektroforézis, ahol a 74 pozitív eset közül csak 3-nál jelentkezett a szójaspecifikus protein mintázat (Brehmer (2)).

2.1.2. Gabonafélék tartalékfehérjéinek rokon jellegét jól demonstrálja az ID módszer, Feinstein et al. (3) vizsgálata szerint árpa hordenin és rozs, valamint búza prolaminok az immundiffúziós teszt alapján közös antigén determinánsokkal rendelkeznek, míg a kukorica, gyöngyköles prolaminok nem reagálnak a hordenin antitesttel. A búza siker antitest gyengébben reagál hordeninre kifejlesztett antiszérummal és egyes búzafajták antigén ereje is eltérő. A kísérleti eredmények arra mutatnak, hogy az antigén jellegét a fehérje térszerkezete fokozottabban determinálja, mint a primér szerkezet. Erre utal a karbamidos kezelés hatására fellépő antigén jelleg csökkenése is.

2.1.3. Cereáliák antigén szerkezete és coeliakias toxicitása közötti összefüggés meghatározása

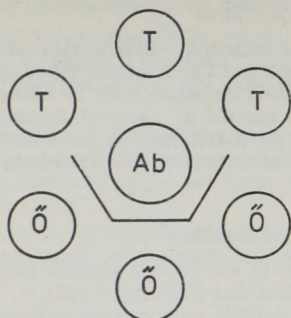
Búza gliadint, rozs szekalint, árpa hordenint, zab avenint és kukorica zeint összehasonlítva *Ciclitira et al. (4)* immunológiai szempontból, közös antigén determináns mutatót ki a gliadin szubfrakciók között, szekalin és hordenin, valamint α , β és γ gliadin között. Avenin és zein nem mutat antigenetikus rokonságot a gliadinokkal, ez utóbbiak coeliakiás betegek esetén is eltérően viselkednek, nem okoznak toxikus hatást.

2.1.4. Sörárpa minősítése ID technikával

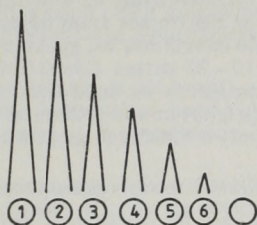
Deichl (5) ID módszerrel 30%-os etanolos extraktokat alkalmazva biztonságos különbözőtett meg tavaszi és őszi árpát. A megfelelő maláta készítményekre kifejlesztett immunsavók módot adnak a maláta készítéshez felhasznált árpagehatározásra is (1. ábra).

2.1.5. Izomfehérje fajta azonosítás ID-vel

Doberstein és Grevel (6), illetve *Manz (7)*, (8) izomfehérje azonosításhoz vérszérumra kifejlesztett antitestet alkalmazott. *Manz (7)* rámutatott arra, hogy a marha és juh szérum albumin két komponenst tartalmaz, amely közül az egyik a homolog állatfajra jellemző, míg a másik olyan közös antigén, amely más rokon állatfajok-

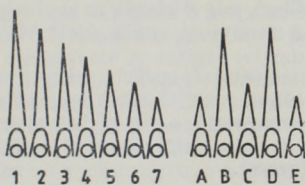


Ö, T, 30% -os alk. árpakivonat
ID vizsgálata



Őszi árpa rocket immunelfo
kimutatása (kalibráció)
1 = 100%, 2 = 80%, 3 = 60%
4 = 40%, 5 = 20%, 6 = 5%
r = 0,99

(DEICHL , 1985)



Őszi árpa arány meghat.
rocket immunelfo - val

minta jele	immun %	valódi %
A	5	6
B	90	90
C	25	25
D	100	100
E	9	10
F	4	5
G	19	20
H	59	60
J	14	12

Őszi és tavaszi árpa megkülönböztetése immuntechnikával

ban is előfordul. Az izomzatból nyert albuminjellegű extraktok megegyező antigén jelleget mutattak a vérszérum albuminokkal.

2.1.6. Idegen fehérjék és vérfehérje kimutatása

Brehmer (2), (9) szója, illetve baromfi, illetve baromfi, valamint vér Brehmer (2) kimutatására húskészítményekből ír le ID-módszert.

2.2. Elektroimmunodiffúziós technikák

Elektroimmunodiffúzió (EID) technika közvetett és közvetlen EID-re osztható. A közvetett EID-nél egydimenziós vagy kétdimenziós gélelektroforézissel végzett antigén szeparáció után immunspezifikus ID-t végeznek egy második gélben.

A közvetlen EID-nél ugyanabban a gélben történik az elektroforézis, majd ezt követően az ID. Az Ab-t a gélből kimetszett csatornába töltik elektroforézis után.

2.2.1. Elektroszinerézis vagy counter immunelfo eljárás

Elektroszinerézisnél az elektroforézis és immunprecipitáció szimultán folyik. Ab és Ag az elektromos áram hatására egymásfelé vándorolnak, tehát egy gyorsított diffúzió következik be, gyakran alkalmazott megoldás, hogy az Ab-t elővádoroltatják 10–20 perces előelektroforézissel mielőtt az antigént felviszi a géltre. Mivel az antigének az anód felé vándorolnak, a szérumot az anód felé eső lyuk sorba viszik fel. A minőségi kimutatásra alkalmas módszer jól használható ID-módszerrel kapott eredmények megerősítésére.

2.2.2. Az elektroszinerézis élelmiszeranalitikai alkalmazása

A módszer jól bevált tej-, szója-, tojás és savófehérje kimutatására (Bauer (10, 11). Texturált szójafehérje (TVP) vizsgálatához (Kaltwasser (12), 80 °C-on hőkezelt szójafehérjére termelt antitestre van szükség vagy normál szójaantiszérum esetén az extraháló oldatba redukálószerrel kell adagolni).

2.2.3. Rocket immunelfo

Az immunelektroforetikus módszerek közül kvantitatív technika a rocket-immunelfo. A legtöbb antigén az anód felé vándorol és így a lemez katódhoz közelebbi végén kell felvinni. Az antigén-antitest a gélben mindaddig oldható immunkomplexet képez, amíg az egyik komponens feleslegben van. A komplex kisebb vándorlási sebességgel halad tovább az Ab tartalmú gélben, míg elérkezik az ekvivalencia tartományban (ekvivalens mennyiség az az Ag mennyiség, amely adott Ab-vel maximális precipitátumot ad.)

A gélben kirajzolódó precipitációs csúcsok (rocket) területe arányos az antigén koncentrációval, standardizált viszonyok mellett. A kiértékelés szempontjából 1–5 cm magasságú csúcsok optimálisak. A csúcsmagasság – Ag görbék meredekségét befolyásolja a gél Ab koncentrációja, ezért új teszt kialakítása esetén többféle Ab tartalmú gélben kell felvenni kalibrációs egyenest.

2.2.4. Rocket immunelfo technika alkalmazása

Brehmer és Gerdej (13) szerint feltárt tejjeférje kimutatása húskészítményekből jó eredménnyel végezhető rocket eljárással. A minta kioldását 7M karbamiddal végzik, a tejjeférje kimutathatósági határ 0,05% tejjeférje koncentráció a készítményben.

Vérplazma kimutatás húskészítményekből mind sertés, mind marhavér-plazma esetén koncentráció arányos csúcsokat ad rocket EID-vel (Brehmer (14)).

Kevert plazma is kimutatható fajtaspecifikusan, fajtaspecifikus antitestek alkalmazásával.

2.2.5. Cross immunelektroforézis

Cross immunelektroforézisnél az elfotechnikával szeparált antigén tartalmú gél csík mellé öntjük az Ab tartalmú gél, amelyben újabb elektroforézist alkalmazunk az első futtatásra merőleges irányban. Ennél a technikánál a gélképző anyag és a pufferrendszer pH-jának megválasztásánál figyelemmel kell lennünk az elektroendozmosis jelenségre. Ha 1%-os agarose gél alkalmazunk pH 8,6-on, akkor az antitest anódos elektroforetikus migrációja és az elektroendozmosis hatására fellépő ellenáramú vándorlás kiegyenlítődik és a legtöbb gammaglobulin esetén egyenletes eloszlást kapunk a gélben. Agar-gél esetén túl nagy az elektroendozmosis, ezért immunelektroforézishez nem alkalmas gélképző. Standardizált feltételek mellett az eljárás kvantitatívva tehető.

2.2.6. Cross immunoelektroforézis alkalmazása

Élesztő törzsek azonosítása, illetve jellemzése enzimspektrumuk alapján cross immunelfo technikával kombinálva módot nyújt a fajon belüli azonosságok és különbségek pontosítására és így a taxonómiai szignifikancia megállapítására (Bru-neav (15)).

Gombafélék csíra-izoenzim spektrumának jellemzésére is jól bevált a technika izoenzimek megkülönböztetésére, illetve annak igazolására, hogy külön-külön képződő enzimekről van-e szó vagy részleges proteolízis termékei-e (Akayama és Yamamoto (16)).

Hugenholz et al. (17) *Streptococcus cremoris* proteázok, Szakács et al. (18) penész-eredetű cellulózok jellemzésére, illetve azonosítására alkalmazta eredménnyel a módszert.

2.3. ELISA technika

Az ELISA technika jelenleg a legérzékenyebb analitikai módszer, amely nagyfokú specifikussága mellett 10^{-10} g – 10^{-12} g anyag meghatározására alkalmas. A fajlagosságot a specifikus Ab biztosítja, a kis kimutathatósági határ pedig Ab-enzim konjugátum alkalmazásával válik lehetővé. Az ELISA technikához lapos vagy gömbölyű aljú micro-titer lemezeket alkalmaznak 96 mintahellyel. A micro-titer lemez lehet gyárilag fehérje adszorpcióra érzékenyített, vagy vizsgálat előtt történik a szenzibilizálás. A nem specifikus fehérje megkötés megelőzhető nem ionos detergenssel való rétegzéssel, vagy semleges fehérje rétegzéssel. A titer-lemezeket felhasználás előtt kondicionálni kell nedves kamrában. A meghatározásnál első rétegnek megköthető az antigén (standard sorozat és minta több hígításban) vagy az antitest egyaránt. Előbbi esetben a reagáltatást követő mosások után antiszérumot viszünk fel. *Direkt ELISA-nál* enzimkonjugált antiszérumot (ismert titerű) és utolsó lépésként enzim-szubsztrátumot. A reakciót leállítva speciális fotométerrel meghatározható az OD, amely megfelelő kalibrációs egyenes segítségével felvilágosítást ad a minta antigén koncentrációjára.

Indirekt ELISA-nál az első antiszérum nem konjugált, hanem az anti-anti-szérum Ig enzim konjugált.

Az ELISA technikánál a mikrotiter lemez az a szilárd hordozó, amely a fehérjét adszorpcióval megköti. A megkötött fehérje mennyiség függ a fehérje előzetes hőkezelésétől. Kísérletileg igazolt, (Husby et al. (19)), hogy IgG-t 30'-ig 56 °C-ra illetve 65°C-ra melegítve, ötszöröse megnőtt a nonspecifikus fehérje megkötés. HPLC vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy ebben fehérje polimerizáció játszik szerepet. A fenti tapasztalat híg antiszérum vagy antigén minták esetén hasznosítható.

2.3.1. *ELIS A technika alkalmazása búza gliadin kimutatására Fritschy et al. (20)* búza α -gliadinra, illetve öszsgliadinra fejlesztett ki immunsavót és ezzel végzett vizsgálatokat. Noha az egyes búzafajták α -gliadintartalma eltérő, ami az antitest meghatározáson alapul, búzaliszt mennyiségben) alul- vagy felülbecslést eredményez, de az erre kifejlesztett savó titerre sokkal nagyobb. A Codex Alimentarius ajánlás szerint gluténmentes élelmiszerek maradék nirogéntartalma 0,05%, ez kb. 2,3% búzalisztnek, illetve 50 – 120 mg/kg α -gliadinnak felel meg. Élelmiszerekből készített extrakt nem specifikus aktivitása borjú szérum albumin adagolással visszazsírozható. A búza α -gliadinra kifejlesztett antitest nem reagál a toxikológiai szempontból hasonló veszélyt jelentő árpa, rizs és zab fehérjével, így ezekre külön vizsgálatot kell végezni. 80 °C feletti hőkezelés esetén az antigén elveszti reaktivitását. A rendszer érzékenysége folytán malmi vagy egyéb technológia során bekövetkező síker szennyeződés kimutatására alkalmas.

2.3.2. Nyers húsfajta azonosítása ELISA módszerrel

A kicsontozott, fagyasztott hús kereskedelmi forgalmazása óta vált a húsfajta azonosítás jelentős kérdéssé *Kangeth et al. (21)*; *Patterson et al. (22)*, illetve *Jones és Patterson (23)*.

Antigénként a megfelelő szérumban albumin is alkalmazható. A marha szérumban albumin és ló szérumban albumin mind aminosav-összetétel, mind peptid-mapa alapján nagy hasonlóságot mutat, így monospecifikus antigén kifejlesztése szokásos immunitással nem érhető el.

Acetonport alkalmazva húskészítményekben jelenlevő izomfehérje 1%-os koncentrációban kimutatható, *Jones és Patterson (23)* nem tisztított antiszérumot alkalmazott húsfajta-azonosításhoz. A keresztreakció megelőzésére hatékony kezelési módszert fejlesztettek ki és a rutin vizsgálat gyorsítására a standardizált antitest és referencia húsminták kivonatára stabilizálási eljárást dolgoztak ki.

Az antiszérumot 20 μ l-ét szűrőpapír korongra cseppentve liofilezett állapotban tárolják és felhasználás előtt puffer oldattal nedvesítik. A keresztreakció elnyomására a kérdéses antigénnel telítik a szűrőpapíron.

2.3.3. Hődenaturált izomfehérje kimutatása

Manz (24, 25) rutin meghatározásra is alkalmas módszert dolgozott ki hődenaturált izomfehérje (kenguru, marha, illetve sertés) kimutatására. Immunizáláshoz és meghatározáshoz egyaránt karbamidos fehérjekivonatot alkalmazott. Megállapította, hogy a specifikus antigén az α_2 globulin tartományban van. Az ELISA módszerrel olyan kis mennyiségek is kimutathatók, amelyek ID-ban nem adnak látható precipitációt. 115 °C-on végzett hőkezelés és idegen fehérje jelenlétében is mintegy 50%-a megmarad az antigén aktivitásnak.

2.3.4. Húsipari fehérje adalékok kimutatása

Griffiths és Bullington (26) vérszérumban, *Olsman et al. (27)*, illetve *Ravenstein és Driendok (28)* szója nyers és sterilizált húskészítményből való kimutatására írt le a módszert. Megállapították, hogy eltérő szójafajták, illetve készítmények esetén is alkalmazható az eljárás: a kvantitatív kimutathatósági határ 0,5%, de kvalitatív érzékelés ennél kisebb koncentrációknál is lehetséges. Érdekes megfigyelést írtak le a hőkezelési hőmérséklet antigén aktivitásra gyakorolt hatásról, a 90 °C-os pasztörözési hőfok mind a nyers, mind a sterilizált húskészítményhez képest alacsonyabb értékeket eredményez. Ezért ismeretlen előéletű minta esetén 120 °C-os hőkezelés beiktatását javasolják.

2.3.5. Bioaktív anyagok, mikroorganizmusok és mikotoxin szennyeződés kimutatása

Yasuhara és Kleeder-Ruppert (29) rutin vizsgálatra alkalmas ELISA-tesztet alkalmazott tej progeszteron tartalmának kimutatására. A módszer nagy előnye a klasszikus analitikai eljárásokkal szemben, hogy nem igényel többlépcsős minta-előkészítést, tisztítást.

Hellenás (30) burgonya glükokaloid (szolanin és dakonin) tartalmát mérték ELISA módszerrel.

Mattinsky és Gehle (31) valamint *Emswiler-Rose et al. (32)* salmonella szennyezés kimutatására alkalmas EIA (enzimimmún assay) illetve ELISA módszerrel számolt be. Az EIA technikával az antitestet gyöngyfelületre viszik és ezzel reagáltatják a mintából készített kivonatot, majd enzimkonjugált antitesttel és enzimszubsztrátummal inkubálás után spektrofotometriásan értékelhető a meghatározás.

Salmonella törzsek 10^5 sejt/ml esetén biztonságosan kimutathatók, egyesek már 10^3 sejt/ml esetén is.

Az ELISA-módszer a hagyományos mikrobiológiai meghatározással meg-
egyező eredményeket biztosít, de a vizsgálati idő szükséglete csupán 1/2–1/3-a
a klasszikus módszereknek.

Kuniyuki *et al.* (32) *Brettanomyces* sejteket mutatott ki borból ELISA-eljárás-
sal. A módszerrel 34 sejt/ml már kimutatható volt. Ha a sejteket ultrahanggal ke-
zelik, reaktívabb antigént nyernek.

T-1 toxin meghatározásra Fan *et al.* (34) dolgozott ki ELISA-módszert.
A haptén típusú antigénből toxin-hemiszukcinát-BSA konjugátumot képezve nyer-
hető immunogén. Az így nyert antisavó a sima haptén felismerésére alkalmas.

Fram *et al.* (35) Aflatoxin B₁-re írt le ELISA-módszert, amelyek 7 µg/kg
toxinkoncentráció már meghatározható. A savó kifejlesztéshez a toxin-BSA kon-
jugátumot alkalmazta. A toxin meghatározáshoz a nyers extraktok közvetlenül al-
kalmazhatók.

Aflatoxin M₁ pikogramnyi mennyiségben határozható meg tejjől és tejter-
mékekből ELISA-módszerrel (Hu *et al.* (36), Fremi és Chu (37)).

A nyersanyag enzimés kezelése a késztermékből ugyancsak kimutatható ELI-
SA-módszerrel. Partanen *et al.* (38) papain, Vaag (39) amiloglükozidáz sörből való
kimutatására dolgozott ki módszert.

3. Az immuntechnika élelmiszer-analitikai alkalmazásának hazai eredményei

Az immuntechnikai módszerek élelmiszer-analitikai alkalmazása rövid múltra
tekint vissza Magyarországon. A technika meghonosításában kezdeményező szerep-
et vállalt a Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet, ahol penészeredetű cellulá-
zok immunológiai jellemzésére és azonosítására került sor első eredményként.

A módszer élelmiszer-minőségellenőrzésben történő meghonosítására kutatási
munkák kezdődtek meg az IHKI és HUMIL megbízásából, illetve közreműködésé-
vel, húsipari adalék anyagok kimutatására. A kutatási téma részét képezi az
OKKFT G/8 programnak.

3.1. Penészeredetű cellulázok immunanalitikai jellemzése

Szakács-Dobozi és Halász (43) *Gliocladium sp.* nyers celluláz készítményre fej-
lesztették ki immunsavót és ezzel jellemezték az izoelektromos fókuszolással szét-
választott fehérjefrakciókat. A 28 eltérő izoelektromos pontú frakció közül 19 mu-
tatott immunreaktivitást a kifejlesztett antitesttel. Az enzimkomplex antigén ak-
tivitást mutató komponenseinek többsége glükoproteinek bizonyult.

A *Gliocladium sp.*-re kifejlesztett immunsavó nem adott reakciót *Aspergillus* és
Penicillium eredetű cellulázokkal, de legalább két antigén aktivitású frakciót lehe-
tett kimutatni *Trichoderma reesei* OM 9414 cellulázból crossed immunoelektroforézi-
se során. A reaktív frakciók itt is glükoproteinek.

Szerzők vizsgálatai azt mutatták, hogy a lúgos denaturációval inaktívált en-
zim immunreaktivitása megmarad, ez módot ad enzimés kezelés utólagos kimutatá-
sára.

3.2. ELISA-technika kidolgozása szója adalék anyag kvantitatív kimutatására hús- készítményből

A KÉKI Biokémiai és Biológiai Osztálya közös kutatási munka során nagy
titerű immunsavót fejlesztett ki szója antigénre Szakács-Dobozi és mtsai (44)
szója conglitinin és glicinin frakciókra történő immunizálással.

Mindkét savó alkalmas szójafehérje húsipari termékből történő kimutatására
10⁻⁹ g nagyságrendben.

A kidolgozott ELISA-módszer PURINA, BEC texturátum és szójaliszt típusú adalék anyag vizsgálatára egyaránt alkalmazható, mindhárom esetben a koncentráció-optikai denzitás összefüggés lineáris.

I R O D A L O M

- (1) Clifford, M. (1985): The history of immunoassays in food analysis. in *Immunoassays in food analysis*. Ed. Morris, B. & Clifford, M. Elsevier London and New York.
- (2) Brehmer, H. (1983): Soja-positive Befunde bei Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtsch.* 63. 1770.
- (3) Festenstein, G., Hay, F., Mifflin, B. & Shewry, W. (1985): Specificity of an antibody subunit of HMW storage protein from wheat seed and its reaction with other cereal storage proteins (prolamins). *Planta*, 164. 135–41.
- (4) Ciclitira, P. J. & Ellis, H. J. (1985): Relation of antigenic structure of cereal proteins to their toxicity in coeliac patients. *British J. Nut.* 53. 39–45.
- (5) Deichl, A., Donhauser, S. (1985): Die immunchemische Bestimmung der Sortenreinheit und des Vermischungsgrades von Braugerste und Braumalz, T. U. München.
- (6) Doberstein, K. & Greuel, E. (1982): Herstellung spezifischer Antiseren zur Identifizierung des Fleisches afrikanischer Antilopenstern im Agargelpräzipitationstest. *Fleischwirtsch.* 62. 1–3.
- (7) Manz, J. (1979): Vergleichende serologische Untersuchungen an Serumalbuminen und Extrakten aus Muskulatur von Wiederkäuern. *Berl. Münch. Tierärzte. Wochenschr.*, 92. 6–7.
- (8) Manz, J. (1980): Serologischer Nachweis tierartspezifischer Antigene. *Fleischwirtsch.* 60. 763–65.
- (9) Brehmer, H. (1984): Nachweis von Sojaweiß und Geflügelfleisch in Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtsch.* 64. 1280.
- (10) Bauer, F. - Stachelberger, H. (1984): Nachweis von Blutplasma in erhitzten Fleischwaren mittels Ultradünnschichtisoelektrische Focussierung. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 778. 86–89.
- (11) Bauer, F. (1984): Zur immunoelektrophoretischer Analyse von Fremdeiweiß in Pleschwaren. *Chem. Mikrobiol. Technol. Zehensm.*, 8. 171–174.
- (12) Kaltwasser, E., Baudner, S., Günther H. O. (1984): Immunchemischer Nachweis von texturiertem Sojaprotein (TVP). Ergebnisse eines Ringversuches. *Fleischwirtsch.* 64. (6) 722–723.
- (13) Brehmer, H. & Gerdes, H. (1980): Quantitative Bestimmungen von aufgeschlossenen Milcheiweiß mit Hilfe eines Elektrodifusionsverfahrens und der Thalacker-Methode in Modellwurstzeugnissen und Wurstzeugnissen aus dem Handel. *Fleischwirtsch.* 60. (7) 1374–1378.
- (14) Brehmer, H. (1983): Orientierende Blutplasmauntersuchungen an niedrig erhitzten Brühwurst-Modell-erzeugnissen mit Hilfe der Elektrodifusion. *Fleischwirtsch.* 63. 1–3.
- (15) Bruneau, S., Guinet, R. Sabbagh, J. (1985): Identification and antigenic comparison of enzymes in the genus *Candida* by means of quantitative immunoelectrophoretic methods: taxonomic significance. *System. Appl. Microbiol.* 6. 210–220.
- (16) Akiyama, T. & Yamamoto, S. (1986): Immunochemical differences in acid phosphatase isoenzymes from wheat germs. *Agr. Biol. Chem.*, 50. 437–440.
- (17) Hugenholz, J., Exterkate, F. & Konings, W. (1984): The proteolytic systems of *Streptococcus cremoris*: an immunological analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 48. 1105–1110.
- (18) Szakács-Dobozi, M. & Halász, A. (1986): Immunoelectrophoretic characterization of cellulolytic enzymes of fungal origin. *J. Chromatogr.* 365. 51–55.
- (19) Husby, S., Holmskov-Nielsen, U., Jensenius, J. C. & Erb, K. (1985): Increased non-specific binding of heat-treated proteins to plastic surfaces analyzed by ELISA and HPLC-fractionation. *J. Immunoassay*, 6. (1 & 2), 95–110.
- (20) Fritschy, F., Windemann, H. & Baumgartner, E. (1985): Bestimmung von Weizengliadinen in Lebensmitteln mittels ELISA. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 181. 379–81.
- (21) Kangethe, E., Jones, S. & Patterson, R. (1982): Identification of the species origin of fresh meat using ELISA procedure. *Meat Science*, 7. 229–240.
- (22) Patterson, M., Whitaker, R. & Spencer, I. (1984): Improved species identification of raw meat by double sandwich ELISA. *J. Sci. Food Agric.*, 35. 1018–1023.
- (23) Jones, S. & Patterson, R. (1986): A modified indirect ELISA procedure for raw meat specification using antispecies antisera and stabilized immunoreagents. *J. Sci. Food Agric.* 37. 767–775.
- (24) Manz, J. (1983): Nachweis hitzedenaturierter Muskel-proteine mittels ELISA. *Fleischwirtsch.*, 63. 1767–69.
- (25) Manz, J. (1985): Nachweis hitzedenaturierter Muskelproteins mittels ELISA. Bestimmung von Muskelproteinen von Rind und Schwein. *Fleischwirtsch.*, 65. 1–3.
- (26) Griffiths, N. & Billington, M. (1984): Evaluation of an ELISA for beef blood serum to determine indirectly the apparent beef contents of beef joints and model mixtures. *J. Sci. Food Agric.*, 35. 909–914.
- (27) Olman, W. J., Dobbelaere, S. & Hitchcock, C. H. S. (1985): The Performance of an SDS-PAGE and an ELISA Method for the Quantitative Analysis of Soya Protein in Meat Products: An International Collaborative Study *J. Sci. Food Agric.*, 36. 499–507.

- (28) Ravestein, P. & Driedonks, R. (1986): Quantitative immunoassay for soya protein in raw and sterilized meat products. *J. Food Techn.* 27. 19–32.
- (29) Yasuhara, T. & Kleeberg-Ruppert, S. (1984): Erfahrungen mit dem Enzymimmunoassay zur Progesteronbestimmung, insbesondere in Gesamtmilch ohne Extraktion. *Tierärztliche Umschau.*, 39. 687–692.
- (30) Hellenas, K. E. (1986): Simplified procedure for quantification of potato glycoalkaloids in tuber extracts by HPLC, comparison with ELISA and colorimetric method. *J. Sci. Food Agric.*, 37. 776–782.
- (31) Mattingly, J. & Gehle, W. (1984): An improved enzyme immunoassay for detection of *Salmonella*. *J. Food Science*, 49. 807–809.
- (32) Emswiler-Rose, B. Gehle, W., Johnston, R., Okrend, A., Moran, A. & Beneti, B. (1984): An enzyme immunoassay technique for detection of *Salmobella* in meat and poultry products. *J. Food Science*, 49. 1018–1120.
- (33) Kuniyuki, A. H., Rous, C. & Sanderson, J. L. (1984): Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Detection production. *Am. J. Emol. Vitic.*, 35. (3) 143–145.
- (34) Fan, T., Zhang, G. & Chu, F. (1984): An indirect ELISA for T-2 toxin in biological fluids. *J. Food Protection*, 47. 964–967.
- (35) Pram, B. & Hart, P. (1986): ELISA of Aflatoxin B₁ in naturally contaminated corn and cottonseed. *J. Assoc. off Anal. Chem.*, 69. 904–907.
- (36) Hu, W. Woychik, N. & Chu, F. (1984): ELISA of picogram quantities of Aflatoxin M₁ in wine and milk. *J. Food Protection*, 47. 126–127.
- (37) Fremy, J. & Chu, F. (1984): Direct ELISA for determining Aflatoxin M₁ at picogram levels in daing products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67. 1098–1101.
- (38) Partanen, P., Winnewisser, W., Luben, G. & Günther, H. (1986): Ringversuch zum Nachweis von Papain in Bier mit ELISA. *Monatschrift f. Brauwissen.*, 39. 293–296.
- (39) Vaag, P. (1985): An ELISA for Amyloglucosidase in Beer. In: *Immunoassay in Food Analysis* eds Morris, B. & Clifford, M., Elsevier London.
- (40) Bachas, L. & Meyerhoff, M. (1986): Homogenesis enzyme-linked competitive binding assay for the rapid determination of falcate in Vitamin tablets.
- (41) Guesdon, J. L., Ternynck, t. & Avrames, S. (1979): The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, 27. 1131–1135.
- (42) Fan, T., S. L., Zhang, G. S. & Chu, F. S. (1984): An Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for T-2 Toxin in Biological Fluids. *J. Food Protection*, 47. (12) 964–967.
- (43) Szakács-Dobozi, M. & Halász, A. (1986): Immunoelectrophoretic characterization of cellulytic enzymes of fungal origin. *J. Chromatogr.*, 363. 51–55.
- (44) Szakács-Dobozi, M. Halász, A. & Ferentzi, Cs. (1987): Immunochemical characterization of soybean proteins. 18th FEBS Meeting Abstracts. Mo 13.13, Ljubljana 1987. 06. 28–07. 03.

IMMUNTECHNIKÁK ALKALMAZÁSA ÉLELMISZEREK VIZSGÁLATÁRA

Halász Anna

A jelenleg ismert analitikai módszerek közül a legnagyobb specifikussággal az immunbiokémiai módszerek rendelkeznek. A szerző áttekintést ad az élelmiszeranalitikai célra alkalmazott immunkémiai módszerekről: gél-immundiffúzió, elektroimmundiffúziós és ELISA-technika, Röviden beszámol az immuntechnika élelmiszeranalitikai alkalmazásának néhány hazai eredményéről.

APPLICATION OF IMMUNTECHNIQUES FOR ANALYSIS OF FOODSTUFFS

Halász, A.

The biochemical procedures have the largest specificity among the present time known analytical methods. The author gives a view about the immun-biochemical procedures, which are adopted for food analytics: gel-immundiffusion, electricimmundiffusion and ELISA-technique. The author reports on some domestic results of immuntechnique which is adopted for food analytics.