

Szója- és tejfehérje készítmények proteintartalmának meghatározása automatizált enzimimmun-analitikai eljárással hőkezelt húskészítményekben

KEREKES LÁSZLÓ

Somogy megyei Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás,
Kaposvár

Érkezett: 1993. október 18.

A szójafehérje és kazein alapú adalékokat elterjedten alkalmazzák egyes hőkezelt élelmiszerek, különösen húskészítmények és konzervek gyártásánál komponensként, mivel igen kedvező technofunkciós (víz-megkötő zsíremulgeáló) és előnyös táplálkozás-élettani tulajdonságokkal is rendelkeznek [1].

Ugyanakkor túlzott mértékű felhasználásuk nem kívánatos, mert nem húseredetű, idegen fehérje tartalmuk folytán érzékeny egyéneknél élelmiszerallergiát válthatnak ki, és esetenként heveny, súlyos megbetegedést is okozhatnak [2, 10].

Az idegen fehérjék kimutatása elsősorban fehérje alapon valósítható meg. A hagyományos módszerek közül leginkább a poliakrilamid gélelektroforézist [3], a peptid analízist [4] használják. Ezek a technikák pl. az SDS-PAGE nem eléggé specifikusak és érzékenyek. Az elektroforetikus módszerek hatékonyságát a hőkezelés rontja, a peptidanalízis eredménye pedig a fehérjehidrolízis minőségétől függ.

Az újabban alkalmazott, specifikus antigén-ellenanyag kapcsolódáson alapuló, immunanalitikai módszerek bizonyultak a legmegbízhatóbbnak az érzékenység és reprodukálhatóság szempontjából. Az immun-elektroforetikus módszerek azonban nem alkalmasak mennyiségi meghatározásra. A korszerűbb jelzéses technikák (RIA, EIA) közül az enzimmel kötött ellenanyagot felhasználó eljárás az ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) a leginkább megbízható [5, 6, 7]. Az immunkomplex jelzésére általában az első ellenanyag elleni, enzimmel kovalensen kapcsolt anti-immunglobulin aktivitású második ellenanyagot használnak.

Anyagok és módszerek

Vizsgálataink során hőkezelt húsipari termékek (vörösáruk, felvágottak, főtt kolbászfélék) és húsos konzervek készítéséhez felhasznált szója- és tejfehérje készítmények szója-protein és kazein

tartalmának mérését végeztük indirekt, kompetitív ELISA-módszerrel. A vizsgálatokhoz a CORTECS DIAGNOSTICS (UK) cég (forgalmazó: NOACK Magyarország Kft., Budapest) biokitjeit használtuk. Az eljárás során az eredetileg készülék modulokra (dispenser, shaker, washer, plate reader) leírt módszereket adaptáltuk az Auto-EIA automatikus, enzimimmun-analitikai mérőrendszerre (LABSYSTEMS) megfelelő számítógépes programok kidolgozásával. Így kiküszöböltük a standardok, a minta- és reagens oldatok kézi pipettázásából, a mosási műveletek elégtelenségéből származó hibákat. Az egyes lépéseket gondosan szinkronizáltuk.

A mintaelőkészítés során a hőkezelt húskészítmények meghatározott mennyiségét a szójaprotein-tartalom meghatározásnál $0,05 \text{ mol/dm}^3$ Tris-HCl pufferben (pH=8,6) homogenizáltuk, majd ditiotreit tartalmú forró ureaoldatban extraháltuk. Így a hőkezelt termékben többé-kevésbé denaturálódott szójafehérje antigén oldhatóvá lesz. A ditiotreit a SH-csoportok védelmét biztosítja.

A minták renaturálását L-cisztin tartalmú oldatban való hígítással végeztük. A kazein mennyiségi meghatározásához a mintát 0,9 %-os konyhasóoldatban szobahőmérsékleten extraháltuk.

A vizsgálat kivitelezésére szobahőmérsékleten, tisztított szójaprotein, ill. kazein preparátummal előzetesen bevont műanyag mikroküvetében (mikrotiterlemez) került sor. A kezdő kompetitív reakció során $50 \mu\text{l}$ hígított mintakivonatot juttattunk a mikroküvetébe, együtt $50 \mu\text{l}$ nyúl antiszója protein, ill. birka anti-kazein oldattal. A mintával megnövekedett szójaprotein, ill. kazein koncentráció következtében a mikroküvetében rögzített szójaproteinhez, ill. kazeinhez kötődő ellenanyag mennyisége csökkent. A reakció lefutása után a nem kötődött anyagokat (szabad fázis) szivatással és többszöri mosással eltávolítottuk. A mikrotiterlemez alapos mosása céljából ún. "soak" (áztató) mosási műveletet alkalmaztunk, tekintettel az eljárás kritikus voltára (hamis immunválasz elkerülése).

A mikroküvetében rögzült nyúl anti-szója protein, ill. birka anti-kazein mennyiségét $100 \mu\text{l}$ peroxidázzal konjugált sertés anti-nyúl, ill. nyúl anti-birka immunglobulinnal történt reakció alapján határoztuk meg. Az inkubációs idő letelte után a felesleges konjugátumot ismételt mosással eltávolítottuk, és a kötött peroxidáz enzim aktivitását érzékeny 2,2'-azino-di-3-etil-benzotiazolin-6-szulfonát (ABTS) szubsztrát hozzáadását követő, a peroxidáz jelenlétére utaló zöld színeződés alapján állapítottuk meg. A színeképződés fordítottan arányos az eredeti szójaprotein, ill. kazein koncentrációjával a hígított extraktban. A zöld szín kifejlődését a inkubációs periódus végén a "maximum binding"

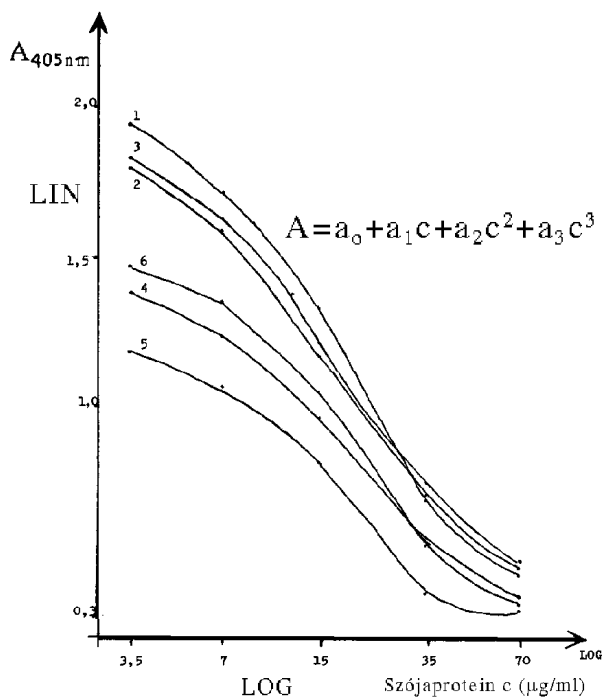
abszorbancia programozott ismételt mérésével (Feltétel: $A_{405\text{nm}} > 1,4$) számítógépes ellenőrzéssel optimalizáltuk.

Az enzimes reakciót 50 μl 1,5 % (m/v)-os nátrium-fluorid oldat hozzáadásával állítottuk le. A vizsgált antigén koncentrációját hőkezelt húskészítményekben 3,5-70,0 $\mu\text{g/ml}$ szójabrotein, ill. 0,5-10,0 $\mu\text{g/ml}$ kazein koncentrációjú standardokkal egyidejűleg felvett kalibrációs görbe segítségével 405 nm hullámhosszon végzett fotometrálassal, számítógépes kiértékeléssel határoztuk meg: az automata műszer a mikroküvetében lévő azonos térfogatú (150 μl) oldatok abszorbanciáját szubsztrát vakkal szemben mérte.

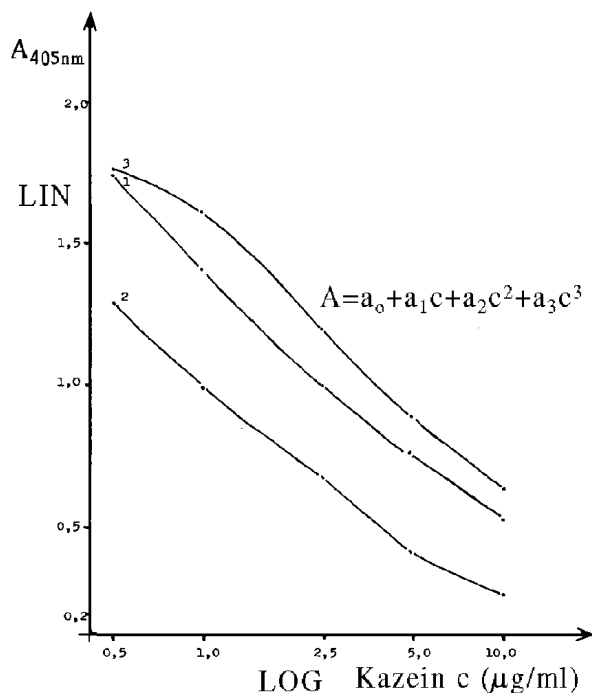
Kontrollként szójabrotein izolátumot (Purina PP500E), ill. savas kazeinport használtunk.

A mérési eredmények értékelése

A kalibrációs görbék mérési pontjait párhuzamosan minden méréssorozat mikrotiterlemezére vonatkozóan felvettük. Az 1. és 2. ábra szerint a különböző időpontokban (összesen hat, ill. három alkalommal) mért abszorbancia-értékek és a szójabrotein, ill. kazein koncentráció között az alkalmazott mérési tartományban nem lineáris az összefüggés.



1. ábra: Különböző időpontokban ic ELISA-módszerrel meghatározott abszorbancia-pontokra illesztett szójabrotein standardgörbék



2. ábra: Különböző időpontokban ic ELISA-módszerrel meghatározott abszorbancia-értékekhez illesztett kazein standardgörbék

Látható, hogy a görbék lefutása nagyon hasonló, de az enzimes színreakció időbeli lefolyásának optimalizálása során kapott standard görbék kisebb abszorbancia értékeket vettek fel. A kiértékeléshez szokásos - kevésbé pontos - kvázilineáris (grafikus) közelítés helyett számítógépes nemlineáris függvény illesztéseket végeztünk. Úgy találtuk, hogy mindkét fehérje komponens vizsgálatánál a harmadfokú polinomiális egyenlet adta a legjobb eredményt mindegyik mérési alkalommal. Ezt igazolja az 1. és a 2. táblázat szerinti variancia táblázat az 1. és 2. ábra egy-egy görbéjének adatpárjaiból az $y=a_0+a_1x+a_2x^2+a_3x^3$ egyenlet illesztésének regresszióanalíziséhez. A teljes korrelációs koefficiens, $R=0,9998$, ill. $0,9996$, tehát a kiszámított köbös összefüggés nagyon szoros és $P=5\%$ szinten szignifikáns, amit a varianciatáblázat regresszió sorának F-próbája mutat. A becslés standard deviációja: $0,0173$, ill. $0,0255$. Összehasonlításképpen a pontsorra egyenest illesztve a korrelációs együttható, $r=-0,9414$, ill. $-0,9926$.

1. táblázat: Varianciatáblázat a harmadfokú polinomiális egyenlet illesztésének regresszióanalíziséhez szója-protein ic ELISA-nál (6. standardgörbe)

Tényező	Négyzet összeg	Szabadsági fok	Négyzet átlag	F
Összes	0,956	4		
Regresszió	0,955	3	0,318	1069*
Maradék (hiba)	$2,98 \cdot 10^{-4}$	1	$2,98 \cdot 10^{-4}$	

*táblázati F érték = 216 (P=5%)

2. táblázat: Varianciatáblázat a harmadfokú polinomiális egyenlet illesztésének regresszióanalíziséhez kazein ic ELISA-nál (3. standardgörbe)

Tényező	Négyzet összeg	Szabadsági fok	Négyzet átlag	F
Összes	0,899	4		
Regresszió	0,899	3	0,300	459*
Maradék (hiba)	$6,52 \cdot 10^{-4}$	1	$6,52 \cdot 10^{-4}$	

*táblázati F érték = 216 (P=5%)

A hőkezelt húskészítmények szója-tartalma mennyiségi meghatározásának eredményeit a 3. táblázat tartalmazza. A számított %-os adatok az abszorbancia mérés eredménye alapján, a bemérések ismeretében, szójaizolátum standardra vonatkoztatott értékek. A táblázat szerint a mért

szójafehérje tartalom viszonylag széles tartományban (0-6,4 %) változik. Párizsi, virsli és felvágott termékcsoportban előfordulnak kiugróan magas (5,1 - 6,4 %) a módosított húskészítmények általános előírásai szabvány [9] 4.1. szakaszában előírt 3 %(m/m)-nél nagyobb értékek is, így ezeket a termékeket a felhasznált nem húseredetű fehérjére utaló megnevezéssel (pl. szójas párizsi) lehetne csak forgalomba hozni. A termékcsoportok szerint nézve az átlagos szójatartalom nem haladja meg a kritikus értéket, ugyanakkor nagy szóródást mutat. Az átlagosnál nagyobb mértékű szójakészítmény felhasználás inkább a nagyobb volumenben gyártott vörösáru-féléknél (párizsi, virsli) és egyes felvágottakra jellemző.

3. táblázat: Szójaprotein-tartalom meghatározás (ic ELISA)

Termékcsoport	Minta szám(db)	Terjedelem (%)	Átlag(%)	Szórás	CV%
Vörösáruk	31	0-6,4	2,09	1,64	78,6
Párizsi	12	1,0-5,1	2,54	1,44	56,7
Virsli	9	1,4-6,4	2,84	1,60	56,4
Krinolin	4	0-1,5	0,73	0,84	114,8
Szafaládé	3	0-2,0	0,67	1,15	172,3
Baromfi term.	3	0-3,8	1,27	2,19	172,8
Felvágott, főtt kolbászféle	12	0-6,1	1,98	1,74	88,0
Felvágott	8	0-6,1	2,61	1,81	69,3
Főtt kolbász	4	0-1,3	0,73	0,59	80,9

A húsos konzervek és felvágottak kazein-tartalmának mérési eredményeit a 4. táblázatban foglaltuk össze. A meghatározott értékek savas kazein standardokra vonatkoztatott adatok. Ezek szerint a kazein-tartalom szűk intervallumban változik (0-0,48 %), és az átlagos érték alacsony, 0,1 % körüli, mivel a vizsgált termékek kb. 75 %-a nem tartalmazott kimutatható mennyiségben kazein fehérjét. A kis mértékű kazein felhasználás arra utal, hogy a termékbe vitel célja kizárólag az állományjavító funkció és nem a húsfehérje kiegészítése, ill. pótlása. Ennek ellenére vizsgálata fontos feladat, mivel a tehéntej fehérje gyakori allergén.

4. táblázat: Kazein-tartalom meghatározás (ic ELISA)

Termékcsoport	Minta szám(db)	Terjedelem (%)	Átlag(%)	Szórás	CV%
Húsos konzervek	12	0-0,48	0,11	0,16	145,5
Felvágottak	12	0-0,25	0,02		

A vizsgálatokhoz kontrollként használt tisztított szójabrotein izolátum, ill. savas kazeinpor visszanyerés átlagos értéke: 101,4% (89,7 - 109,6%), ill. 103,5%, (90,4 - 112%). Az eredmény számításánál - szójabrotein izolátum esetében - figyelembe vettük a Kjeldahl-féle nitrogén analízissel meghatározott és a készítményen "protein értéként" megadott fehérjetartalmat (83%).

A vizsgálatok tapasztalatai alapján megállapítható, hogy a kísérleti körülmények gondos betartásával, az automata műszer biztosította lehetőségek kihasználásával hőkezelt húskészítmények szójabrotein és kazein tartalmának meghatározása megbízható eredményt szolgáltat. Ugyanakkor, ha a vizsgált termék gyártásánál felhasznált szójafehérje, ill. kazein készítmény típusa eltér a módszernél leírtaktól (pl. szója texturátum, nátrium-kazeinát), célszerű azt az analízisbe iktatni és együtt futtatni a kontroll mintával. A visszanyerési eredmények ismeretében a megfelelő korrekciós faktor kiszámítható.

Irodalom

1. Petres J. et al.: Szójakészítmények és ultraszűrt tejfehérje felhasználhatósága hőkezelt húskészítményekben.
Konzerv- és Paprikaipar **3** (1983) 96-99
2. Temesvári E.: Élelmiszerallergia-intolerancia.
Gyógyszereink **43** (1993) 2-9
3. Válas-Gellei A.: Quantitative determination of milk and soya proteins in meat products. Acta Alimentaria **10** (1981) 3, 187-199
4. Bailey, F. J.: A novel approach to the determination of soya proteins in meat products using peptide analysis.
J. Sci. Food Agric. **27** (1976) 827-830
5. Griffiths, N. M. et al.: An assessment of commercially available reagents for an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) of soya protein in meat products. J. Sci. Food Agric. **35** (1984) 1255-1260
6. Rittenburg, J. H. et al.: Improved enzyme-linked immunosorbent assay for determination of soya protein in meat products.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. **70** (1987) 582-587
7. Hall, C. C. et al.: Determination of soya protein in meat products by a commercial enzyme immunoassay procedure collaborative trial.
J. Assoc. Publ. Anal. **25** 1987 1-27
8. Cleland, W. W.: Dithiothreitol, a new protective reagent for SH-groups.
Biochemistry **3** (1964) 4, 480-482
9. MSZ 5870-1990. Húskészítmények általános előírásai (N 11).
Módosítja: Szabványügyi Közlöny **45** (1993) 1, 3
10. Polgár M. et al.: Szójaallergia. Élelmezési Ipar **47** (1993) 204-209

Szója- és tejfehérje készítmények proteintartalmának meghatározása automatizált enzimmun-analitikai eljárással hőkezelt húskészítményekben

Kerekes L.

A szerző húskészítmények szójafehérje és kazein tartalmának meghatározására indirekt, kompetitív ELISA-módszert adaptált automatikus, enzimmun-analitikai mérőrendszerre (Auto-EIA, LABSYSTEMS) megfelelő számítógépes programok kidolgozásával. Így kiküszöbölte a standardok, a minta és a reagens oldatok kézi pipettázásából, a mosási műveletek elégtelenségéből származó hibákat. Megbízható eredményeket kapott a kalibrációs görbe felvételénél - a szokásos kvázilineáris közelítés helyett lényegesen jobb - harmadfokú polinomiális egyenlet számítógépes illesztést végezve.

Determination of Protein Content from Soy-and Milk Protein Preparations in Heat-Treated Meat Products by Automatic Enzyme Immune Analytical Procedure

Kerekes, L.

An indirect, competitive ELISA-method was adapted to an automatic, enzyme immune analytical measuring system (Auto-EIA, LABSYSTEMS) for the determination of soy protein and kazein content of meat products, with the elaboration of relevant computer programs. Thus the errors arising from manual pipetting of standards, sample and reagent solutions as well as the insufficient washing steps were excluded. Reliable results were obtained using a significantly better cubic polinomial equation computer fitting for taking the calibration curve instead of the usual quasilinear approximation.

Bestimmung des Proteingehalts von Soja- und Milcheiweißpreparaten mit einem automatisierten enzimmunanalytischen Verfahren in wärmebehandelten Fleischprodukten

Kerekes, L.

Durch die Ausarbeitung von geeigneten Rechnerprogrammen wurde eine indirekte, kompetitive ELISA-Methode mit dem automatischen, enzimmunanalytischen Meßsystem (AUTO-EIA, LABSYSTEMS) zur Bestimmung des Sojaweiß- und Caseingehaltes von Fleischprodukten anwendbar gemacht. So konnten die Fehlerquellen eliminiert werden, die durch die Standards, durch das Handpipettieren der Probe und der Reagenzlösungen sowie durch die ungenügende Waschoperationen entstehen. Bei der Aufnahme der Kalibrationskurve wurden zuverlässige Resultate durch die rechnergestützte Anpassung der polynomialen Gleichung erhalten, die wesentlich besser waren als durch die übliche quasilineare Näherung geliefert werden können.