

CSAPÓ JÁNOS
CSAPÓNÉ KISS ZSUZSANNA
ALBERT CSILLA
ÉLELMISZER-FEHÉRJÉK
MINŐSÍTÉSE



SAPIENTIA ERDÉLYI MAGYAR TUDOMÁNYEGYETEM
MŰSZAKI ÉS TÁRSADALOMTUDOMÁNYI KAR
ÉLEMISZER-TUDOMÁNYI TANSZÉK

A kiadvány megjelenését a Sapiientia Alapítvány támogatta.

CSAPÓ JÁNOS
CSAPÓNÉ KISS ZSUZSANNA
ALBERT CSILLA

***ÉLELMISZER-FEHÉRJÉK
MINŐSÍTÉSE***

| Scientia Kiadó |
| Kolozsvár · 2007 |

Lektor:

Kiss Szendille (Debrecen)

Sorozatborító:

Miklósi Dénes



Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României

CSAPÓ JÁNOS, CSAPÓNÉ KISS ZSUZSANNA, ALBERT CSILLA

Élelmiszer-fehérjék minősítése / Csapó János, Csapóné Kiss Zsuzsanna,
Albert Csilla. – Cluj-Napoca: Scientia, 2007.

Bibliogr.

ISBN 978-973-7953-75-9

TARTALOM

1. Bevezetés	15
2. Az aminosavak, fehérjék felfedezése és a fehérjék minősítésével kapcsolatos fontosabb események	18
3. Az élőlények fehérjeszüksége	23
3.1. A létfenntartás fehérjeszüksége	23
3.2. A növekedés fehérjeszüksége	24
3.3. Az ember fehérjeszüksége	24
4. A fehérjék és felépítésük	29
4.1. Az aminosavak	29
4.1.1. Az aminosavak csoportosítása	31
4.1.2. Az aminosavak fizikai tulajdonságai	36
4.1.3. Az aminosavak kémiai tulajdonságai	40
4.2. A peptidok	45
4.3. A fehérjék	50
4.3.1. Általános tulajdonságok (szerkezet, molekulatömeg, oldhatóság)	50
4.3.2. A fehérjék kémiai reakciói, kapcsolódásai	65
4.3.3. A fehérjék denaturálódása	67
4.3.4. A fehérjék funkcionális tulajdonságai	68
4.3.5. A fehérjék csoportosítása	71
4.3.6. Fontosabb természetes fehérjék	75
4.3.7. Új fehérjeforrások	80
4.3.8. Élelmiszer-fehérjék átalakulása a feldolgozás és tárolás során	81

5. Az élelmiszerek nitrogéntartalmú anyagainak meghatározása	84
5.1. A fehérjék kivonása, kicsapása	85
5.2. A fehérjetartalom mérése a nitrogéntartalom alapján	88
5.2.1. A nitrogéntartalom mérése <i>Dumas</i> -módszerrel	90
5.2.2. A nitrogéntartalom mérése <i>Kjeldahl</i> szerint	94
5.2.2.1. A <i>Kjeldahl</i> -féle roncsolás mechanizmusa	94
5.2.2.2. A roncsolásban képződött ammónia meghatározása	100
5.2.2.3. Nyersfehérje-tartalom meghatározás automata készülékekkel	112
5.3. A fehérjetartalom meghatározása spektrofotometriás módszerekkel	116
5.3.1. Ultrabolya spektrofotometriás módszerek	116
5.3.2. Spektrofotometriás módszerek a látható fény tartományban	117
5.3.2.1. <i>Biuret</i> -módszer	118
5.3.2.2. <i>Lowry</i> -módszer	120
5.3.3. A fehérjetartalom meghatározása festékkötéssel	123
5.3.3.1. <i>Bradford</i> -módszer	124
5.3.4. Egyéb módszerek a fehérjetartalom meghatározására	127
5.4. Élelmiszer-fehérjék vizsgálata elektroforézissel és izoelektromos fókuszálással	129
5.4.1. Az elektroforézis és analitikai alkalmazása	129
5.4.2. A poliakrilamid-gél elektroforézis (PAGE)	130
5.4.2.1. A fehérjeminták előkészítése, géltre vitele és az elektroforézis folyamata	132
5.4.2.2. Speciális alkalmazások az élelmiszer-fehérje kutatásban	133
5.4.3. Különféle fehérjék szétválasztása és meghatározása izoelektromos fókuszálással	134
5.5. A fehérjék oszlopkromatográfiája	136
5.5.1. A fehérjék vizsgálata adszorpciós oszlopkromatográfiával	137

5.5.2. A fehérjék vizsgálata megoszlásos oszlopkromatográfiával	137
5.5.3. A fehérjék vizsgálata ioncserés oszlopkromatográfiával	137
5.5.3.1. Elválasztás ioncserélő műgyantákon	138
5.5.3.2. Elválasztás cellulózalapú ioncserélőkkel	139
5.5.3.3. Elválasztások ioncserélő géekkel	140
5.5.4. A fehérjék vizsgálata egyéb kromatográfias módszerekkel	140
5.6. A fehérjék géلكromatográfiája	141
5.6.1. A géلكromatográfia alapjai	141
5.7. A fehérjék rétegekromatográfiája	142
5.7.1. A rétegekromatográfia alapjai	142
5.7.2. A rétegekromatográfia alkalmazása élelmiszer-fehérjék vizsgálatára	143
5.8. Roncsolás nélküli fehérjemeghatározás	144
5.9. Élelmiszerek aminosav-tartalmának, valamint a fehérje aminosav-összetételének meghatározása	147
5.9.1. A vizsgálati anyag előkészítése a meghatározás előtt	147
5.9.2. Az aminosavak meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával	158
5.9.3. A triptofántartalom meghatározása	181
5.9.4. A kéntartalmú aminosavak meghatározása	191
5.9.5. Az aminosavak meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával	201
5.9.6. A D- és L-aminosavak meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával	206
5.9.7. Az aminosavak meghatározása gázkromatográfiával	230
5.9.8. A D- és az L-aminosavak meghatározása gázkromatográfiával	235
5.9.9. Az aminosavak rétegekromatográfiája	240

6. Az élelmiszer-fehérjék hasznosulása	244
6.1. Az aminosavak lebontása és szintézise	244
6.1.1. Az aminosavak lebontása	244
6.1.1.1. Az aminosavak szerepe és jelentősége	244
6.1.1.2. A fehérjék emésztése	246
6.1.1.3. Az aminosavak lebontásának közös reakciói	248
6.1.1.4. Az aminosavak szénláncának lebomlása a trikarbonsav ciklusban	251
6.1.1.5. A nitrogén eltávolítása a szervezetből	259
6.1.1.6. Az aminosav-lebontás és a nitrogénürítés sémája	262
6.2. Az aminosavak szintézise	262
6.2.1. A nitrogénfixálás mechanizmusa	263
6.2.2. A nem esszenciális aminosavak bioszintézise	266
6.2.2.1. A glutamát, a glutamin, a prolin és a hidroxiprolin bioszintézise	266
6.2.2.2. Az aszpartát, az aszparagin és az alanin bioszintézise	267
6.2.2.3. A tirozin bioszintézise	267
6.2.2.4. A szerin, a glicin és a cisztein bioszintézise	268
6.2.3. Az esszenciális aminosavak bioszintézise	270
6.2.3.1. A metionin és a treonin bioszintézise	270
6.2.3.2. A lizin bioszintézise	271
6.2.3.3. A leucin, az izoleucin és a valin bioszintézise	271
6.2.3.4. Az arginin (ornitin) bioszintézise	271
6.2.3.5. A hisztidin bioszintézise	272
6.2.3.6. A fenilalanin és a triptofán bioszintézise	272
6.2.4. Az aminosavak bioszintézisének szabályozása	274
6.3. Az ember fehérjeemésztése	275
6.4. A fehérjék intermedier anyagforgalma	279
6.4.1. Az aminosavak hasznosítása energiaforrásként	279
6.4.2. Fehérjeszintézis	279

6.4.3. A nitrogénforgalom	280
6.4.4. A takarmányfehérjék hasznosulása	281
6.4.4.1. Fehérjefelvétel, fehérjeemésztés, nitrogénürítés, emészthetőség, nitrogénretenció	282
6.4.4.2. Az emészthetőség mutatói	283
6.4.4.3. Endogénnitrogén-ürítés a vizeletben	285
6.4.4.4. Endogénnitrogén-ürítés a bélsárban	285
6.4.4.5. A fehérje emészthetőségét befolyásoló tényezők	285
6.5. Az állatok fehérjeminőség iránti igénye	286
7. Az élelmiszer-fehérjék minősítésére alkalmas vizsgálatok	288
7.1. Általános alapfogalmak, a fehérjék minősítésére alkalmas vizsgálatok rövid áttekintése	288
7.1.1. A fehérje biológiai potenciálját mérő módszerek	289
7.1.2. A fehérjehasznosulás hatásfokát mérő módszerek	293
7.1.3. A komplettáló hatás meghatározása az esszenciális aminosavak hasznosítható mennyiségének mérésével	294
7.1.4. Az aminosavak emészthetőségének meghatározása	296
7.1.5. A fehérje értékének meghatározása termelő állományokkal	296
7.1.6. Összefüggések a különböző indexek között	297
7.2. Kémiai módszerek	298
7.2.1. A táplálóérték meghatározása szabványos kémiai módszerekkel	299
7.2.2. A fehérjék oldhatóságának vizsgálata	299
7.2.2.1. A nitrogénoldhatósági index meghatározása	300
7.2.2.2. A fehérjeoldhatósági index meghatározása	301
7.2.3. A hasznosítható lizintartalom meghatározása	302

7.2.3.1.	A hasznosítható lizintartalom meghatározása 2,4-dinitro-1-fluor-benzollal történő származékképzés után aminosav-analízátorral	302
7.2.3.2.	A hasznosítható lizintartalom meghatározása festékkötés alapján	304
7.2.4.	A hasznosítható metionintartalom meghatározása	308
7.2.5.	A bakteriális eredetű fehérje mennyiségének meghatározása	309
7.2.5.1.	A ribonukleinsavak felhasználása	310
7.2.5.2.	Az adenzin-trifoszfát felhasználása	311
7.2.5.3.	A ³⁵ S-izotóp beépülésének felhasználása	311
7.2.5.4.	A ¹⁵ N-izotóp beépülésének felhasználása	312
7.2.5.5.	A jelzett foszfor beépülésének felhasználása	312
7.2.5.6.	Az aminosav-összetétel felhasználása	313
7.2.5.7.	A diamino-pimelinsav és az aminoetil-foszfonsav felhasználása	314
7.2.5.8.	A D-aminosavak felhasználása	316
7.2.5.9.	A D-aszparaginsav és D-glutaminsav felhasználása	317
7.2.5.10.	Melyik az igazán jó marker?	319
7.2.6.	A valódi fehérje meghatározása	320
7.3.	Enzimes módszerek	322
7.3.1.	Az emészthetőnyersfehérje-tartalom meghatározása in vitro <i>pepszines</i> hidrolízissel	322
7.3.2.	Az emészthetőnyersfehérje-tartalom meghatározása in vitro <i>pepszin-tripszin</i> -hidrolízissel	323
7.3.3.	Multienzimes módszer a fehérje in vitro emészthetőségének megállapítására	324
7.3.4.	A fehérje in vitro emészthetőségének meghatározása <i>pankreatinos</i> hidrolízissel és aminosav-analízissel	325

7.3.5. A <i>pepszin-emészthetőségi</i> index meghatározása	325
7.3.6. A <i>pepszin-pankreatin-emészthetőségi</i> index meghatározása	327
7.4. Mikrobiológiai módszerek	328
7.4.1. A relatív táplálkozási érték meghatározása <i>Tetrahymena pyriformis</i> W tesztorganizmussal	328
7.4.2. A fehérje hasznosíthatólizin- és hasznosíthatómetionin-tartalmának meghatározása <i>Tetrahymena pyriformis</i> W tesztorganizmussal	330
7.4.3. A hasznosíthatómetionin-tartalom meghatározása <i>Streptococcus zymogenes</i> tesztorganizmussal	332
7.5. Biológiai módszerek	335
7.5.1. A fehérjehatékonysági arány meghatározása	335
7.5.1.1. A fehérjehatékonysági arány meghatározása növendék patkányokon	336
7.5.1.2. A fehérjehatékonysági arány meghatározása malacokkal	339
7.5.2. A nettó fehérjehasznosítás meghatározása növendék patkányokkal, a test nitrogéntartalmának közvetlen mérésével	341
7.5.3. A nettó fehérjearány meghatározása növendék patkányokkal	343
7.5.4. A nettó fehérjeérték meghatározása csirkékkel a test nitrogéntartalmának mérése alapján	345
7.5.5. A produktív fehérjeérték meghatározása növendék patkányokkal	346
7.5.6. A bruttó fehérjeérték meghatározása csirkékkel	348
7.5.7. A relatív növekedési index meghatározása növendék patkányokkal	350
7.5.8. A relatív nitrogénhasznosítás meghatározása növendék patkányokkal	351
7.5.9. A biológiai érték meghatározása	353
7.5.9.1. A fehérjék minősítése a kémiai indexek alapján	353

7.5.9.2. A nitrogénmérleg meghatározása patkányokkal	360
7.5.9.3. A nitrogénmérleg meghatározása sertésekkel	366
7.5.10. A fehérje hasznosíthatólizin-tartalmának meghatározása patkánynövekedési teszttel	367
7.5.11. A fehérjék hasznosíthatólizin-tartalmának meghatározása csirkenövekedési teszttel	369
7.5.12. A fehérjék hasznosíthatómetionin-tartalmának meghatározása csirkenövekedési teszttel	371
7.5.13. A fehérje hasznosíthatótriptofán-tartalmának meghatározása patkánynövekedési teszttel	372
8. Az élelmiszer-fehérjék károsodása	374
8.1. A víztartalom hatása a fehérjék károsodására	374
8.2. Az oxidáció hatása a fehérjék károsodására	377
8.3. A hő hatása a fehérjék károsodására	377
8.3.1. A hőkezelés mechanizmusa	378
8.3.2. Az aminosavak oldalláncában és a fehérjemolekulák között lejátszódó reakciók	378
8.3.2.1. Oxidatív átalakulások	379
8.3.2.2. Deszulfurizáció és izomerizáció	381
8.3.2.3. A fehérjék közötti kölcsönhatások	382
8.3.3. Fehérjék kapcsolódása más komponensekkel	385
8.3.3.1. A fehérjék és a szénhidrátok közti reakciók, a <i>Maillard</i> -reakció és táplálkozási hatása	385
8.3.3.2. A fehérjék és a lipidek kapcsolódása	390
8.3.3.3. A fehérjék és a polifenolok kapcsolódása	391
8.3.3.4. A fehérjék és a fitinsav kapcsolódása	392
8.4. A fehérjék hőkárosodásának kimutatása	393
8.5. A fehérjemínőséget befolyásoló technológiák	394
8.5.1. A fehérjelisztek gyártása	395
8.5.2. A szemes termények szárítása	396

8.5.3. Forrólevegős zöldtakarmány-szárítás	397
8.5.4. A fehérjék lúgos kezelésének hatása	397
8.5.5. A D-aminosavak kialakulása és hatása a fehérje minőségére	397
9. A fehérjehasználást befolyásoló antinutritív és mérgező anyagok	413
9.1. Antinutritív anyagok	413
9.2. Mérgező anyagok	420
10. Az élelmiszer- és takarmányfehérjék komplex minősítése	431
Rövidítések	438
Szakirodalom	445
A jegyzet szerzői	476

BEVEZETÉS

Az aminosavak, a peptidek és a fehérjék felfedezése lassan két évszázados múltra tekinthet vissza, hisz 1806-ban *Vauquelin* és *Robiquet* a spárga levéből már izolálták az aszparagint. A fehérjeépítő aminosavakkal kapcsolatos felfedezések ideje 1935-ben lejárt, hisz ekkor *Rose* és *mtsai*. fibrinből előállították a legutolsó aminosavat, a treonint. A tudományos kutatások azonban még napjainkban is folynak, és most már ott tartunk, hogy a 20 fehérjeépítő aminosavon kívül mintegy 500 különféle aminosavat fedeztek fel, melyeknek kisebb-nagyobb jelentősége van a természetben.

Az aminosavak és fehérjék felfedezésével párhuzamosan törekedtek arra, hogy minél többet tudjanak meg a fehérje minőségéről és szerepéről az ember táplálkozásában. Felismerték azt, hogy a nitrogéntartalmú anyagok nélkülözhetetlenek a táplálkozásban, és azt is, hogy különböző fehérjék tápláléértéke eltérő. Rájöttek arra, hogy a fehérje összetételének, minőségének ismerete nélkül nem beszélhetünk az emberek optimális táplálkozásáról, és fehérje- (aminosav-) szükségletének maximális kielégítéséről. A természettudományok múlt században tapasztalt rohamos fejlődésével párhuzamosan fejlődött a fehérjekémia és a fehérjeanalitika is, és ma már elmondhatjuk, hogy korszerű táplálkozás nehezen képzelhető el az élelmiszer-fehérjék minősítése nélkül.

Magyarországon és Romániában is sokfelé folynak fehérjeanalitikai kutatások, és kiterjedt laboratóriumi háttér áll rendelkezésére azoknak, akik fehérjeminősítést szeretnének végeztetni. A korszerű minősítés feltételezi a jól felszerelt kémiai, analitikai, élettani és állatkísérleti laboratóriumok összehangolt működését, hisz kémiai, esetleg élettani laboratóriumban végzett minősítés csak jelzi a fehérje várható minőségét, de a végső szót majd az állat (ember) mondja ki. Ezek a vizsgálatok évről évre változnak, új módszerek nyernek teret a régiek rovására, egyesek elavulnak, de vannak olyanok is, melyek – jelenleg úgy tűnik – hosszú ideig a gyakorlatban maradnak. A jegyzet ezekkel a nagyobb jelentőséggel bíró vizsgálatokkal foglalkozik, nem feledkezve meg azok kialakulásáról,

az előzményekről, a több évtizedes módszerfejlesztésekről. A módszerek ismertetése során egyrészt arra törekedtünk, hogy a tisztelt Olvasó megismerje az eljárás elvi alapjait, és amennyiben ennél is többet kíván, ismerhesse meg a gyakorlati kivitelezést is. Próbáltunk ügyelni arra is, hogy a közölt módszerek egy átlagosan felszerelt laboratóriumban is alkalmazhatók legyenek, illetve a nagyműszeres analízis mellett többször is ismertetünk olyan módszereket, melyeket – igaz több munkával – drága analizátorok nélkül is végre lehet hajtani. Csak említjük azokat az eljárásokat, amelyek már kimentek a divatból, amelyeknél már van jobb és korszerűbb (papírkromatográfia, vékonyréteg-kromatográfia, papírelektroforézis).

Jegyzetünkben remélhetőleg kitűnik, hogy a fehérjék minősítése rendkívül sokoldalú, nehéz és jó szervezést igénylő munka, mely megköveteli a vegyészek, fiziológusok, orvosok és takarmányozás-tudománnyal foglalkozó szakemberek szoros együttműködését. Ajánljuk ezt a jegyzetet a gyakorlatban dolgozó vegyészeknek és fiziológusoknak, orvosoknak, takarmányos szakembereknek, akik szeretnének közelebbi információval rendelkezni a fehérje minősítéséről, de ajánljuk főiskolai, illetve egyetemi hallgatóknak is, akik bizonyára hasznos ismereteket szerezhetnek tanulmányaikhoz a jegyzet olvasása során. A jegyzet megírásához a korábban a Kaposvári Egyetem Állattudományi Karán írt *Élelmiszer-kémia, Élelmiszer- és takarmány-analitikai gyakorlatok* és az *Amino acids in animal nutrition* jegyzetek anyagát is felhasználtuk. Reményeink szerint e jegyzetet az agrártudományi egyetemeken tanulók, a leendő agrárfeldolgozó-ipari technológus és a táplálkozástudományi mérnök szak hallgatói is használni fogják.

A jegyzet megírásakor figyelemmel voltunk arra, hogy a tárgyalt anyag tartalmi és didaktikai szempontból is illeszkedjen a Karon a korábbi szemeszterekben tanult biokémiához, élelmiszer-kémiához és élettanhoz. A jegyzet egy rövid történeti áttekintést követően az ember nitrogénszükségletével, majd az aminosavak, peptidek és fehérjék felépítésével foglalkozik. E fejezeteket követi a nitrogéntartalmú anyagok meghatározása, beleértve a klasszikus és az automatizált fehérjemeghatározási módszereket, az elektroforézist, az izoelektromos fókuszálást, az oszlop- és gélkromatográfiát, a rétegekromatográfiát és a roncsolás nélküli fehérjemeghatározásokat. Ezt követően a fehérjék hasznosulása és a fehérjék minősítésére alkalmas kémiai, enzimes, mikrobiológiai és biológiai módszerek következnek. Tárgyaljuk a fehérjék károsodását, az antinutritív anyagokat, majd ismertetjük az élelmiszer-fehérjék

komplex minősítését. A jegyzet végén felsoroljuk a megírás során áttanulmányozott szakirodalmat és közöljük a rövidítések jegyzékét is.

A módszerek leírásakor nem mindig törekedtünk teljességre, hanem csak az elvet, a módszer által elérhető pontosságot és az eredmények gyakorlatban való felhasználhatóságát tartottuk szem előtt. Az egyes eljárásokat próbáltuk úgy csoportosítani, hogy az Olvasó az egyszerűbb vizsgálatoktól folyamatosan jusson el a bonyolultabbakig, megismerve az élelmiszerek kémiai analízisének fontosabb lépéseit. A fejezeteket próbáltuk egymásra építeni, ezért javasoljuk a tisztelt Hallgatónak (Olvasónak), hogy a későbbi fejezetek tanulmányozásának csak akkor kezdjen neki, ha az első részben lévő anyaggal tökéletesen tisztában van, mert e nélkül nem fogja megérteni a fehérjék minősítését.

Végül hálás köszönetünket szeretnénk kifejezni lektorainknak, *Schmidt János* akadémikusnak és *Babinszky László* professzornak, a kézirat átnézéséért, értékes tanácsaikért, *Stanics Juditnak* a lelkiismeretes gépeléséért és a jegyzetben lévő képletek szerkesztéséért, *Vargáné Cseresnyés Eszternek* és *Bukovics Ildikónak* a kézirat megírásában nyújtott segítségéért. A jegyzetben maradt hibák kizárólag a szerzők „érdemei”. Kérjük a tisztelt Olvasókat, szíveskedjenek ezekre a figyelmünket felhívni.

Csíksszereda, 2005. szeptember 1.

A szerzők

AZ AMINOSAVAK, FEHÉRJÉK FELFEDEZÉSE ÉS A FEHÉRJÉK MINŐSÍTÉSÉVEL KAPCSOLATOS FONTOSABB ESEMÉNYEK

A nitrogént a levegőből 1772-ben *Scheele* és *Rutherford* különítette el. Az aminosavakkal kapcsolatos felfedezések közül elsőként említést érdemel az aszparagin felfedezése, amelyet a spárga levéből 1806-ban *Vauquelin* és *Robiquet* különített el először. Fehérjékből csak 1932-ben mutatta ki *Damodaran*, aki megállapította, hogy glikoproteinekben a szénhidrátkomponens N-glikozidos kötéssel kapcsolódik a fehérjéhez az aszparagin amidcsoportján keresztül. *Magendie* már 1816-ban felismerte, hogy a nitrogéntartalmú anyagok a táplálkozás nélkülözhetetlen komponensei.

A leucint 1818-ban *Proust* sajtból, majd 1820-ban *Braconnot* gyapjú- és izomszövetből izolálta. Ugyanabban az évben *Braconnot* zselatinból előállította a glicint és megállapította, hogy az annak mintegy 25–30%-át teszi ki.

1831-ben *Dumas* publikálta a szerves anyagok összes nitrogéntartalmának meghatározására szolgáló módszerét, mely módszert egészen 1883-ig – amikor *Kjeldahl* közzétette a róla elnevezett *Kjeldahl*-féle nitrogénmeghatározást – csaknem kizárólagosan alkalmaztak.

A tirozint 1846-ban *Liebig*, majd 1849-ben *Bopp* állította elő kazeinből. 1850-ben *Stecker* különítette el a történelem folyamán az első aminosavat, az alanint kémiai szintézissel acetaldehidből.

1846-ban *Liebig* a fehérjéket az egyéb tápanyagoktól már megkülönbözteti, azonban ő még azt hiszi, hogy csak egyfajta, azonos tápértékű fehérje létezik, ezért a fehérje értékelésére elegendőnek tartotta csupán a nitrogéntartalom mérését. Ez az úgynevezett mennyiségi szemlélet a XIX. század második felében uralkodó volt, a század vége felé azonban a különféle táplálkozási kísérletek felhívták a figyelmet arra, hogy az ember és az állatok szervezetében a különböző eredetű fehérjék eltérő módon értékesülnek.

1865-ben *Cramer* izolálta elsőként a selyem hidrolizátumából, 1866-ban pedig *Ritthausen* a glutaminsavat a búza gluténjéből. 1868-ban *Ritthausen* előállítja az aszparaginsavat a bab fehérjéjéből, 1875-ben *Schützenberger* és *Bourgeois* a selyem alanintartalmát fedezik fel. 1872-ben *Voit* a zselatin táplálkozásban való felhasználását kutatva rájött arra, hogy az enyv a kutyák táplálkozásában nem azonos értékű a húsfehérjével.

1876-ban *Escher* definiálja az esszenciális aminosavakat. 1877-ben *Schulze* izolálja a glutamint a cukorrépából, majd 1881-ben *Barbierivel* együtt a fenil-alanint a farkasbabból. 1883-ban *Erlenmeyer* és *Lipp* elsőként állítják elő szintetikusán a fenil-alanint, és ugyancsak 1883-ban *Kjeldahl* publikálta módszerét élelmiszerek nitrogéntartalmának meghatározására. Az eredeti módszer ugyan számos módosításon esett át, ennek ellenére a legelterjedtebb nitrogénmeghatározás maradt, mely óriási hatással volt az élelmiszeralitika fejlődésére.

1886-ban *Schulze* és *Steiger* előállítja az arginint babból, 1889-ben pedig *Drechsel* a lizint kazeinből. 1895-ben *Hedin* kivonja az arginint a szarv szaruanyagából, 1896-ban ugyancsak ő és *Kossel* – egymástól függetlenül – előállítják a hisztidint a halban előforduló protaminokból. *Rubner* 1897-ben megállapította, hogy a különböző minőségű fehérjék nem képesek egymást tökéletesen helyettesíteni, amelyből levonta azt a következtetést, hogy minden fehérje egyedi biológiai értékkel rendelkezik. 1899-ben *Moerner* előállítja a ciszteint a szarv szaruanyagából, de elképzelhető, hogy már *Wolaston* is felfedezte a ciszteint 1810-ben. 1900-ban *Siven* kísérletekben meghatározza az ember minimális fehérjeszükségletét, melyre napi 25–31 g-ot állapít meg.

A prolint és a valint 1901-ben *Fischer* állította elő kazeinből, és ugyancsak ő nyerte ki először 1902-ben a hidroxiprolint zselatinból. 1902-ben *Hopkins* és *Cole* izolálja a hasnyálmirigyenzimekkel hidrolizált kazeinből a triptofánt, majd 1904-ben *Ehrlich* fibrinből az izoleucint. 1902-ben *Fischer* tisztázza, hogy a fehérjék mintegy 20–22 aminosavból épülnek fel, és hogy a fehérjékben az aminosavak savamidkötésekkel, peptidkötésekkel kapcsolódnak egymáshoz. Kutatásait Nobel-díjjal ismerték el.

1905-ben *Folin* vizsgálatai szerint a fehérjék metabolizmusa két, egymástól független szakaszban játszódik le: egy állandó endogén fázisban, amely a szövetek lebomlásának felel meg, és egy változó exogén fázisban, a táplálékkal elfogyasztott fehérje metabolizmusából adódóan.

1909-ben *Thomas* a humán fehérjeszükséglet meghatározására a szervezet nitrogénegyensúlyának mérésén alapuló módszert dolgozott ki. A klasszikusnak számító munkájában a fehérje biológiai értékét a felszívódott nitrogén százalékban kifejezett hasznosuló részeként definiálta.

Az 1910-es években *Mitchell* egyrészt népszerűsítette, másrészt továbbfejlesztette *Thomas* módszerét. 1924-ben publikálta a *Thomas–Mitchell*-féle biológiai érték meghatározási módszert, amely ma is alapul szolgál a fehérje biológiai értékének meghatározására. Ugyanebben az időben többen megállapítják, hogy az egyes táplálékfehérjék biológiai értéke eltérő, és rájönnek arra is, hogy az állati eredetű fehérjék értékei sebbek a növényi eredetűeknél.

1908-ban *Ikeda* felismeri a nátrium-glutamát jelentőségét az élelmiszerek ízének kialakításában. 1909-ben *Ruhemann* felfedezi az aminosavak és a ninhidrin reakcióját, melyet 1948-ban *Moore* és *Stein* fejleszt kvantitatív módszerré, és használja azt aminosavak mennyiségi meghatározására. 1911-ben *Van Slyke* és *Cullen* határozza meg elsőként az aminosavakat ninhidrinnel. 1912-ben *Folin* és *Denis* megállapítják, hogy az emésztőrendszerben a fehérjék aminosavakká bomlanak le, melyek aztán felszívódva a véráramba kerülnek. 1914-ben *Osborne* és *Mendel* felismerték, hogy a fehérje biológiai értéke függ az aminosavösszetételtől és az aminosavak egymáshoz viszonyított arányától. 1914-ben *Mc Collum* növekvő sertéseken meghatározta az elfogyasztott fehérje emészthetőségét.

Az 1910-es és 1920-as években *Osborne* és *Mendel* a fehérjék minőségét vizsgálva azokat komplett és nem komplett csoportokba sorolták. A patkányok tömeggyarapodásán alapuló módszert dolgoztak ki, melynek során a tömeggyarapodást az elfogyasztott fehérje 1 grammjára vonatkoztatták, és egy mérőszámmal jellemezték a fehérje növekedést elősegítő hatékonyságát. 1919-ben *Osborne*, *Mendel* és *Ferry* publikálták a fehérjehatékonysági arány (PER) meghatározási módszerét. Az 1920-as, 30-as és 40-es években többen vizsgálták a fehérjék, illetve fehérjefrakciók különböző szövetek regenerálódását elősegítő hatását, és lényeges különbségeket állapítottak meg az egyes fehérjék között.

1923-ban *Müller* a kazeinből előállítja a metionint, majd a fehérjeépítő aminosavak felfedezése a treonin publikálásával ér véget. 1934-ben *Abderhalden* egy akrilsavszármazékból szintetikusán előállítja a treonint, majd a következő évben *Rose* izolálja fibrinből az utolsóként felfedezett esszenciális aminosavat. 1937-ben *Elman* kazein hidrolizátummal

végez kísérleteket kutyákon, 1942-ben pedig *Rose* kezdi meg kísérleteit az ember aminosav-szükségletének megállapítására. 1948-ban elsőként a metionint állítják elő nagyobb mennyiségben gyakorlati célokra. 1951-ben *Moore* és *Stein* közölték az aminosavak ioncserés oszlopkromatografálásának módszerét, 1958-ban pedig *Spackmannal* együtt publikálták az automatikus aminosav-analizátor leírását és működési elvét, melyért 1972-ben Nobel-díjat kaptak.

1952-ben *Almquist* metioninnal kiegészített baromfitápot állít elő, 1953-ban *Wretling* aminosavakat tartalmazó infúzióval táplálja a betegeket. 1960-ban nagyobb mennyiségű lizint állítanak elő gyakorlati felhasználásra.

Az 1940-es és 50-es években kezdték vizsgálni a szöveti enzimek aktivitása és a táplálékfehérjék minősége közötti összefüggéseket. Többek között megállapították, hogy esszenciális aminosavak hiányában, vagy rossz minőségű fehérje fogyasztásakor a máj *xantinoxidáz* enzimje a xantint csökkent aktivitással tudja húgysavvá oxidálni.

Az 1950-es években vált ismertté, hogy a fehérjék felépítésében részt vevő 20-féle aminosavból 8–10 esszenciális, melyeket a szervezet nem tudja szintetizálni. Megállapították azt is, hogy szoros összefüggés van a fehérjék biológiai értéke és az esszenciális aminosav-tartalma között, s ennek alapján a fehérjeszükségletet próbálták meghatározni. Már ekkor megkezdődött a takarmányok aminosav-összetételének az optimális szükséglethez történő igazítása, valamint a gazdasági állatfajok optimális aminosav-ellátásának tervezése.

Az 1950-es és 60-as években szinte minden élelmiszer-alapanyag aminosav-összetételét meghatározták. 1946-ban *Block* és *Mitchell* publikálták a limitáló esszenciális aminosavakra vonatkozó elképzelésüket, mely szerint a fehérje szervezetben történő hasznosulását a legkisebb mennyiségben előforduló esszenciális aminosav határozza meg.

1961-ben *Kofrányi* és *mtsai* megállapítják, hogy az esszenciális aminosavak mellett a fehérjék hasznosulását a nem esszenciális aminosavak is befolyásolják, valamint azt, hogy a nem esszenciális aminosavak megfelelő mennyisége csökkenti az esszenciális aminosav-szükségletet. Az ezt követően végzett humán kísérleteik alapján 1970-ben a limitáló esszenciális aminosav elmélet tagadása mellett foglaltak állást, annak ellenére, hogy egyes fehérjék biológiai értéke a limitáló esszenciális aminosavakkal történő kiegészítés hatására legtöbbször jelentős mértékben növekszik.

Az 1950-es és 60-as években a világ rosszul táplált népessége fehérjeszükségletének kielégítésére rendkívül intenzív kutatómunka folyt, melynek során új fehérjehordozókat állítottak elő, új módszereket dolgoztak ki a fehérje minőségének meghatározására, felmérték a gyártás és a tárolás során bekövetkező minőségromlást, valamint különféle in vitro enzimes eljárásokat fejlesztettek ki a fehérje minőségének meghatározására. Ebben az időszakban vált egyre égetőbb szükségsszerűvé a gyors, rutinszerű vizsgálatokat lehetővé tevő módszerek és az ahhoz szükséges eszközök fejlesztése.

Magyarországon a fehérjék minősítésével kapcsolatos kutatások az 1960-as évek elejére nyúlnak vissza, melynek során *Lindner* elsősorban táplálkozástudományi jellegű kutatómunkát végzett, ezt követően pedig megindultak gazdasági állataink fehérje-anyagcseréjének megismerését célzó kísérletek, melyek a takarmányfehérjék optimális felhasználására irányultak.

AZ ÉLŐLÉNYEK FEHÉRJESZÜKSÉGLETE

A fehérjében lévő nitrogén az élőlények számára esszenciális, mert az élővilág minden fejlődési fokán a biológiai funkciókat a sejtfehérjék hordozzák. Ebben a fejezetben igen röviden az ember fehérje-, illetve aminosav-szükségletéről írunk, rávilágítva arra, hogy az élőlények fehérje- (aminosav-) szükségletének optimális kielégítése meglehetősen nehéz feladat.

3.1. A létfenntartás fehérjeszükséglete

A létfenntartás során a szervezet fehérjekészlete folyamatosan kicserélődik. Az emésztőszerveket borító hám kopási vesztesége mellett a kiválasztott fehérjetermészetű enzimek egy része ugyancsak elvész a bélsárral, és a fehérjeigényt növeli még a bőrrel és a bőrképletekkel való veszteség is. A fehérjekopásból származó nitrogéntartalmú anyagcsere-termékek (pl. karbamid, húgysav) a vizelettel ürülnek. Koplaló állatok esetében az urinális endogén nitrogén mennyisége meghaladja a tényleges fehérjekopást, mert a koplaló állat a fehérjét is mobilizálja az energia-termelésre, ezért megbízhatóbb adatokhoz jutunk a fehérjementes étrenden tartott állatok nitrogénmérlegének vizsgálatával. Ebben az esetben az urinális endogén nitrogén mellett a bélsárral ürített endogén eredetű fekális nitrogén mennyisége is megállapítható. Normális takarmányozás esetében a takarmányból származó, meg nem emésztett fekális nitrogén meghatározása nem egyszerű feladat. A kifejlett felnőtt állatok nem tudnak fehérjét tárolni vagy visszatartani, ezért az anyagcsere-veszteséget meghaladó nitrogén mint exogén urinális nitrogén jelenik meg a vizeletben.

3.2. A növekedés fehérjeszüksége

Az optimális fehérjeellátás kulcskérdése a növekedésben lévő szervezet táplálásának, mert ez kihat egyrészt a napi tömeggyarapodásra, másrészt a testállomány összetételére és az élelmiszer hasznosítására. Kielégítésénél tekintettel kell lenni arra, hogy *a fehérje az élelmiszer egyik legdrágább összetevője*, ezért az ésszerű hasznosítás kapcsán kompromisszumot kell kötni a biológiai és gazdasági optimum között.

Fehérjeszükséglet és aminosav-ellátás. Az elmúlt évtizedek kutatásainak eredményeként ma már nem általában fehérjeszükségletről, hanem *a nélkülözhetetlen aminosavak meghatározott mennyiségi igényéről* beszélünk. Rájöttünk arra is, hogy nemcsak a limitáló aminosavak hiányát kell pótolni, hanem törekedni kell az esszenciális aminosavak harmonikus arányára is, sőt figyelni kell arra, hogy *az esszenciális és nem esszenciális aminosavak is optimális arányban forduljanak elő a táplálékban*. Az aminosavak iparszerű termelésének beindulása után lehetőség van a limitáló aminosavak pótlására, melynek során a növekedés eléri az optimálishoz közeli értéket, de ezzel együtt nő a fogyasztás, egyes esetekben fokozódik az elzsírosodás és romlik az értékesítés. Ezért újabban az aminosav-szükségleti adatok mellett az optimális és minimális fehérjeszinteket is megadják. Elegendő fehérje birtokában *az energiátöbblet elősegíti az energiaigényes fehérjeszintézist*, növeli a tömeggyarapodást és javítja az értékesítést, valamint a fehérjehasznosítást. Napjainkban az emészthető aminosav-tartalom alapján történő táplálás került előtérbe, figyelemmel arra, hogy különbségek lehetnek az aminosavak és a fehérje emészthetőségében. Ma már tudjuk, hogy az aminosavak emészthetősége nagymértékben függ a technológiai behatásoktól, elsősorban a hőkezeléstől, ezért a nyersfehérje-tartalom alapján *táblázatokból kalkulált aminosav-összetétel bizonytalan az élelmiszer-receptek összeállításánál*.

3.3. Az ember fehérjeszüksége

Az ember fehérjeszükségletének megállapításakor figyelemmel kell lenni arra, hogy a szervezet megfelelő energiabevitel alkalmával fehérjementes étrend esetén is veszít fehérjét. Ez az endogénfehérje-vesztés a vizeletben, a bélsárban és a verejtékben ürül, valamint növeli ennek

mennyiségét a bőr kopása, a növekvő haj és a köröm is. Az endogén-fehérje-vesztés testtömeg-kilogrammonként átlagosan mintegy 0,34 g fehérjének felel meg. A felnőtt fehérjeszükségletét testtömeg-kilogrammonként 0,75 g jó minőségű fehérjével lehet kielégíteni, a csecsemők, a gyermekek, a gyermeket váró és a szoptató anyák esetében a fehérjeszükséglet azonban ennél nagyobb, hisz a fejlődésben lévő szervezet számára biztosítani kell a növekedéshez és a fejlődéshez szükséges fehérje mennyiségét, az utóbbi két esetben pedig a magzat és a tejtermelés fehérjeigényét is ki kell elégíteni. A WHO adatai szerint, az életkor függvényében a biztonságos fehérjebevitelt, tej vagy tojásfehérje fogyasztásakor, a 3.1. táblázat tartalmazza.

3.1. táblázat. *A gyermekkorban javasolt biztonságos fehérjebevitel értékek tej vagy tojásfehérje fogyasztása esetén (g/ttkg*), a WHO ajánlása alapján*

Életkor (év)	Fehérje (g/ttkg)	Életkor (év)	Fehérje (g/ttkg)
Fiúk és lányok együtt		Lányok	
0,25–0,5	1,86	10–11	1,00
0,5–0,75	1,65	11–12	0,98
0,75–1	1,48	12–13	0,96
1–1,5	1,26	13–14	0,94
1,5–2	1,17	14–15	0,90
2–3	1,13		
3–4	1,09	Fiúk	
4–5	1,06	10–11	0,99
5–6	1,02	11–12	0,98
6–7	1,01	12–13	1,00
7–8	1,01	13–14	0,97
8–9	1,01	14–15	0,96
9–10	0,99		

* ttkg = testtömeg-kilogramm

Az ember azonban természetesen nem a fehérjét, hanem a fehérjében lévő aminosavakat hasznosítja. Az ember számára esszenciális a hisztidin (az életkortól függően), az izoleucin, a leucin, a lizin, a metionin, a fenil-alanin, a treonin, a triptofán és a valin. Félig esszenciális a cisztin, amit metioninból, valamint a tirozin, amit fenil-alaninból tud

előállítani a szervezetet. Az egészséges ember bélrendszerében élő mikroorganizmusok a hisztidint szintetizálni tudják, ezért ez az aminosav csak a csecsemő számára számít esszenciálisnak, mert a felnőtt ember szükségleteit a bélrendszerben szintetizálódott mennyiség tökéletesen kielégíti. Ebből is látható, hogy az ember számára az aminosav-szükséglet megállapítása sok bizonytalansággal terhelt, mert például egy betegség is megváltoztathatja a szervezet képességét a különböző aminosavak szintézisére, és így módosulhat a szervezet számára esszenciális aminosavak száma. A csecsemők, a kisgyermek, az iskolás gyermekek és a felnőttek számára becsült aminosav-szükségletet, a WHO ajánlásai szerint, a 3.2. táblázat tartalmazza.

3.2. táblázat. *Az esszenciális aminosavak becsült szükséglete (mg/ttkg/nap) a WHO ajánlása alapján*

Aminosav	Csecsemő (3–4 hónapos)	Kis- gyermek (2 éves)	Iskolás gyermek (10–12 éves)	Felnőtt
Hisztidin	28	–	–	–
Izoleucin	70	31	28–30	10,0
Leucin	161	73	44–45	14,0
Lizin	103	64	44–60	12,0
Metionin+cisztin	58	27	22–27	13,0
Fenil-alanin+tirozin	125	69	22–27	14,0
Treonin	87	37	28–35	7,0
Triptofán	17	12,5	3,3–4,0	3,5
Valin	93	38	25–33	10,0
Összesen	742	352	216–261	84,0

Gazdaságilag fejlett országokban az emberek a szükségesnél jóval több fehérjét fogyasztanak, a fejlődő világ több országában azonban a kis fehérjetartalmú növényi táplálék túlsúlya miatt gyakori fehérjehiánnyal lehet számolni. A fehérjehiány növekedésben való visszamaradáshoz, ödémák képződéséhez, valamint vérszegénységhez vezethet; amennyiben a fehérjehiány energiahiánnyal is párosul, az alutápláltság sok csecsemő és kisgyermek halálát is okozhatja. A fehérje- és energiahiány legkorábbi jele az apátia, megáll a növekedés, az emésztőenzimek nem szintetizálódnak kellő mennyiségben, mely az emésztőrendszer

leállításához vezet. A folyadék a vérrendszeren kívülre szivárog, ödémát okozva felgyülemlik a hasban és a lábban, nem képződnek vérfehérjék és immunanyagok, melynek következtében az éhezõ gyermekek gyorsan megbetegszenek, és az immunrendszer összeomlása végzetes következményekkel járhat.

A túlzott fehérjefogyasztás káros hatásai kevésbé ismertek, az azonban köztudott, hogy a csecsemõk és a gyermekek nehezen alkalmazkodnak a nagy mennyiségû fehérjét tartalmazó étrendhez. Fehérjekoncentrátumok fogyasztása terhesség alatt is káros, hisz a fehérje szénláncá ilyenkor energiaként hasznosul. Az aminosavak optimális mennyiségét a bevitt fehérjében, összehasonlítva a tojás-, a tehéntej- és a marhahús-fehérjék aminosav-összetételével, a WHO ajánlásai alapján, a 3.3. táblázat

3.3. táblázat. *A csecsemõk, a gyermekek és a felnõttek számára optimális fehérje aminosav-összetétele a tojás-, a tehéntej- és a marhahús-fehérje aminosav-összetételéhez hasonlítva, a WHO javaslata alapján*

Aminosav	Aminosav						
	mg/g fehérje				mg/g nyersfehérje		
	Cse- csemõ átlag*	2–5 éves gyer- mek	10–12 éves gyer- mek	fel- nõtt	tojás	tehen- tej	marha- hús
Hisztidin	26	19	19	16	22	27	34
Izoleucin	46	28	28	13	54	47	48
Leucin	93	66	44	19	86	95	81
Lizin	66	58	44	16	70	78	89
Metionin + cisztin	42	25	22	17	57	33	40
Fenil-alanin + tirozin	72	63	22	19	93	102	80
Treonin	43	34	28	9	47	44	46
Triptofán	17	11	9	5	17	14	12
Valin	55	35	25	13	66	64	50
Összesen							
hisztidinnel	460	339	241	127	512	504	480
hisztidin nélkül	434	320	222	111	490	477	446

* Az anyatej aminosav-összetétele alapján becsült érték.

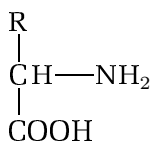
tartalmazza. A táblázatban szereplő adatok azonban személyenként változhatnak az egyén adottságai, egészségi állapota és még sok más egyéb tényező következtében is. Általánosságban elmondható, hogy az átlagos fehérjeszükséglet 0,6 g/testtömeg-kg, a legkisebb fehérjebevitelnek pedig naponta el kell érni a 0,45 g-ot testtömeg-kilogrammonként.

A FEHÉRJÉK ÉS FELÉPÍTÉSÜK

A fehérjék komplex makromolekulák, amelyek mind a növényi, mind az állati sejt citoplazmájában előfordulnak. Az élő sejtek szárazanyagának legalább 50%-át a fehérje teszi ki. A fehérjék nagyrészt szénből, oxigénből, hidrogénből, nitrogénből és kénből felépülő vegyületek. Építőelemeik az α -L-aminosavak, amelyek megszabják a fehérje kémiai, fizikai és biológiai tulajdonságait.

4.1. Az aminosavak

A természetben az aminosavak szabad állapotban viszonylag kis mennyiségben fordulnak elő. Legnagyobb mennyiségük fehérjében kötött, a fehérje felépítésében vesznek részt. Különböféle aktív oligopeptideket is alkothatnak, mint amilyenek például a peptidhormonok és az antibiotikumok, és bioaktív származékok prekursorai is lehetnek. Az anyagcserében energiaszolgáltató szerepük normális életfolyamatokat feltételezve nem jelentős. A fehérjéket húsféle aminosav alkotja, a fehérjék hidrolízisekor azonban csak 19-féle aminosav szabadul fel, mivel a 6 mólos sósavas hidrolízis során a triptofán (indolcsoportjának hasadása révén) tönkremegy. Minden aminosav egy azonos felépítésű és egy eltérő szerkezeti részből áll. A prolin és a hidroxiprolin kivételével az azonos felépítésű rész az α -szénatom a hozzákapcsolódó amino- és karboxilcsoporttal (4.1. ábra).



4.1. ábra. Az aminosavak általános képlete

Az élelmiszer-fehérjékben az alábbi aminosavak fordulnak elő:

A *glicint* 1820-ban, zselatinból izolálták. Nem esszenciális aminosav, sok más vegyület építőköve, fontos szerepet játszik a biokémiai mechanizmusokban. A kollagénben 25–30%-ban található. Az *alanin* nagy mennyiségben fordul elő a selyemfibroinban. A *szerin* 4–8%-ban a különböző fehérjékben, és meghatározó szerepe van a foszfoproteinekben, mivel az ortofoszforsav a szerin szabad hidroxilcsoportjához kapcsolódik észterkötésben. A *cisztein* és a *cisztin*, a két kéntartalmú aminosav, általában 1–2%-ban található a különböző fehérjékben, vannak azonban jellegzetesen nagy kéntartalmú fehérjék is, amelyekben arányuk lényegesen nagyobb. A ciszteinben levő szulfhidrilcsoportok adott körülmények között diszulfidhidak kialakítására alkalmasak mind a különböző polipeptidláncok között, mind egy polipeptidláncon belül. Ezek a diszulfidhidak rendkívüli stabilitást kölcsönöznek a vegyületeknek mind a kémiai, mind az enzimes lebontással szemben.

A *treonin* egyes állati fehérjékben (tej, hús, tojás) 4,5–5%-ban található, gabonafélékben azonban kisebb koncentrációban fordul elő. A treonintartalom a fehérjék biológiai értékét limitáló faktor. A *metionin* esszenciális kéntartalmú aminosav, amely savra és hőre is igen érzékeny, könnyen oxidálódik, amit az élelmiszer-ipari műveletek során figyelembe kell venni, hisz a metionin a fehérje biológiai értékét limitáló egyik aminosav. Állati fehérjékben 2–4%-ban, a növényi fehérjékben 1–2%-ban fordul elő. Az *arginin* 3–6%-os mennyiségben minden fehérjében megtalálható. Az emberi szervezet számára nélkülözhető, a sertés és a baromfi számára esszenciális aminosav. A *valin* viszonylag nagyobb mennyiségben fordul elő mind az állati, mind a növényi fehérjében. A tojás és tejfehérjében 7–8%, az elasztinban 15% mennyiségben van jelen.

A *leucin* a legtöbb fehérjében 7–10% arányban található, a gabonafehérjében mennyisége igen eltérő: a kukoricában több mint 12%, a búzafehérjében 6% körüli. Az *izoleucin* mind a növényi, mind az állati fehérjékben átlagosan 4–7% arányt képvisel. A *lizin* nagy mennyiségben fordul elő a halfehérjékben (10–11%), a hús-, a tojás- és tejfehérjében (7–9%), a gabonafélékben azonban mennyisége ennél lényegesen kisebb (2–4%). Több fehérje biológiai értékének limitáló faktora. Az *aszparaginsav* minden állati fehérjében átlagosan 6–10% mennyiségben található. Az *aszparagin* (az aszparaginsav félamidja) növényi csírák és fiatal növények fehérjéinek jellegzetes komponense. A *glutaminsavat* 1866-ban izolálták búzalisztból. A legtöbb fehérjében nagy mennyiségben fordul elő, amelyek közül kiemelkedő a búzafehérje, több mint 30%-os

glutaminsav-tartalmával. A szója- és kukoricafehérjékben a glutaminsav mintegy 20%-ban található. Félamidja a *glutamin*.

A *fenil-alanin* a fehérjékben átlagosan 4–5%-ban van jelen. A szervezetben *tirozinná* tud átalakulni. A tirozin ugyancsak minden természetes fehérje alkotórésze mintegy 5–6%-os mennyiségben. A *prolin* a zselatinban és a kazeinben mintegy 12%-ban, a búzában kb. 10%-ban található. A *hidroxi-prolin* a kollagén kötőszöveti fehérjében kb. 12%-ban, a *hisztidin* a fehérjékben 2–3%-ban fordul elő, a vérfehérjék azonban ennél többet tartalmaznak. A csecsemők számára esszenciális aminosav. A *triptofán* mindössze 1–2%-ban található meg a fehérjékben.

4.1.1. Az aminosavak csoportosítása

Az aminosavak csoportosítását az alábbi szempontok szerint végezhetjük.

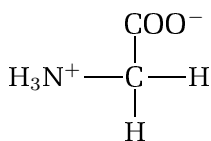
Az aminosavak *oldalláncuk szerint* a következőképpen csoportosíthatók:

- töltés nélküli, nempoláros oldalláncú aminosavak (glicin, alanin, valin, leucin, izoleucin, prolin, fenil-alanin, triptofán, metionin),
- töltéssel nem rendelkező, poláros oldalláncú aminosavak (szerin, treonin, cisztein, tirozin, aszparagin, glutamin),
- aminosavak töltéssel rendelkező oldallánccal (aszparaginsav, glutaminsav, hisztidin, lizin, arginin).

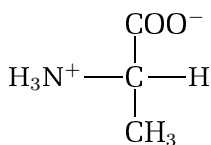
Táplálkozásbiológiai szempontból az aminosavak lehetnek:

- *esszenciális* aminosavak, amelyeket a szervezet nem tud szintetizálni (valin, leucin, izoleucin, fenil-alanin, triptofán, metionin, treonin, lizin),
- *félig esszenciális* aminosavak, amelyeket egy másik esszenciális aminosavból tud előállítani a szervezet (cisztein, tirozin),
- *nem esszenciális* aminosavak, amelyet a szervezet korlátlanul elő tud állítani (arginin, glicin, alanin, prolin, szerin, aszparagin, glutamin, aszparaginsav, glutaminsav, hisztidin).

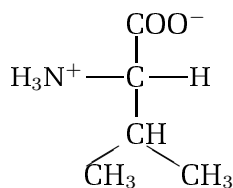
Az aminosavak szerkezetét kémiai tulajdonságaiknak megfelelő csoportosításban, az aminosavak nevével és annak hárombetűs rövidítésével, a 4.2–4.6. ábrák tartalmazzák.



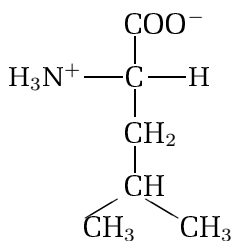
glicin (Gly)



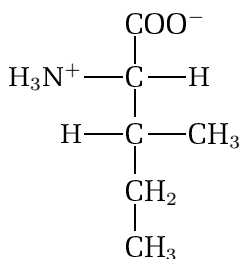
alanin (Ala)



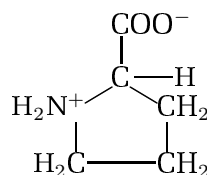
valin (Val)



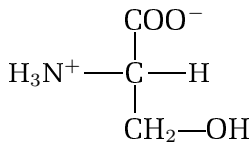
leucin (Leu)



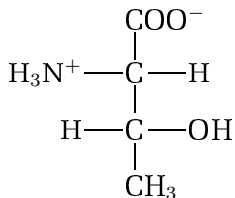
izoleucin (Ile)



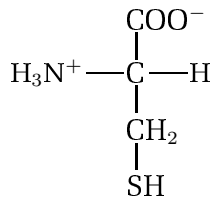
prolin (Pro)

4.2. ábra. Nempoláros, alifás R csoport (apoláros aminosavak)

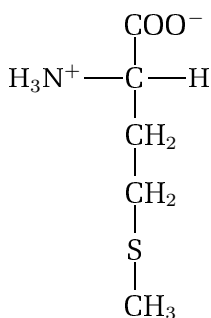
szerin (Ser)



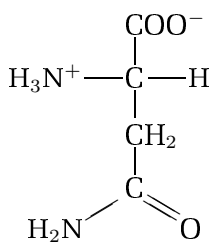
treonin (Thr)



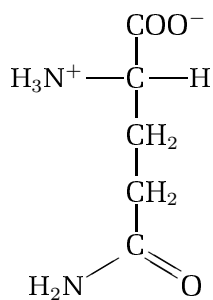
cisztein (Cys)



metionin (Met)

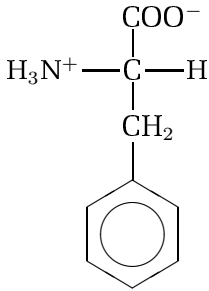


aszparagin (Asn)

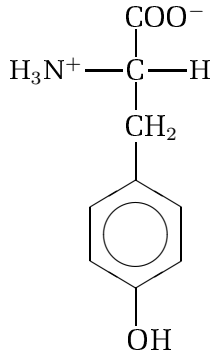


glutamin (Glu)

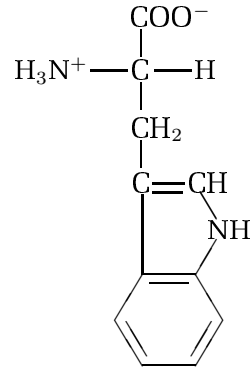
4.3. ábra. Poláros, neutrális R csoport



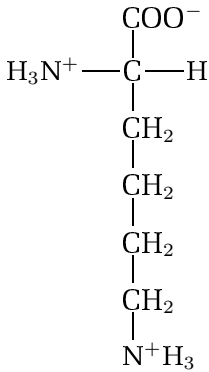
fenil-alanin (Phe)



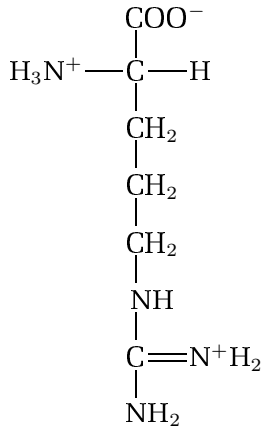
tirozin (Tyr)



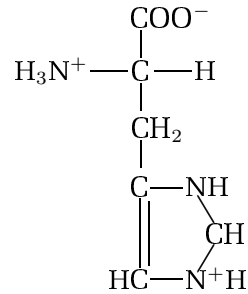
triptofán (Trp)

4.4. ábra. Aromás R csoport

lizin (Lys)

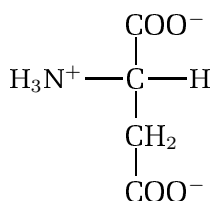


arginin (Arg)

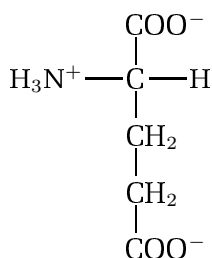


hisztidin (His)

4.5. ábra. Pozitív töltésű R csoport (bázikus aminosavak)



aszparaginsav (Asp)



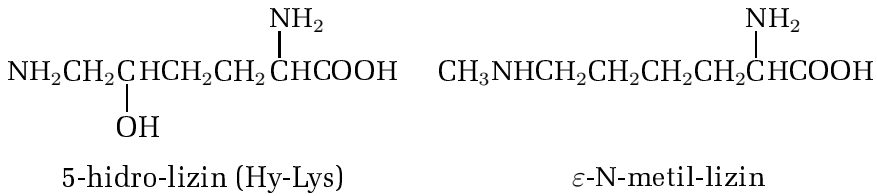
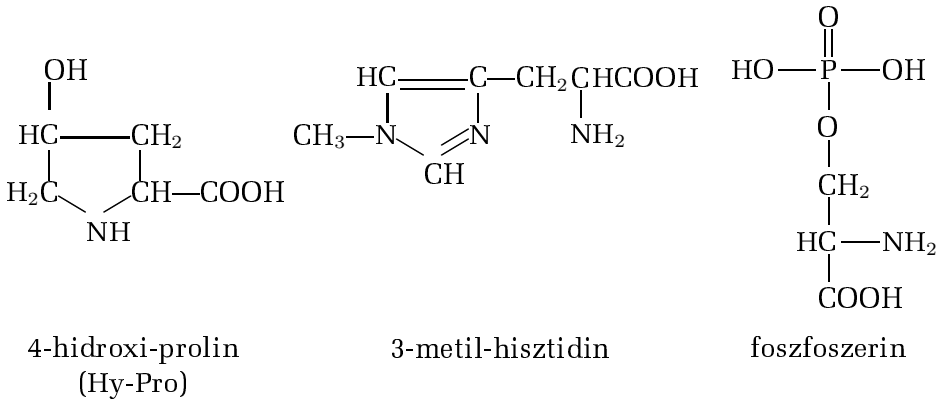
glutaminsav (Glu)

4.6. ábra. Negatív töltésű R csoport (savas aminosavak)

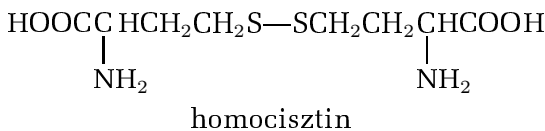
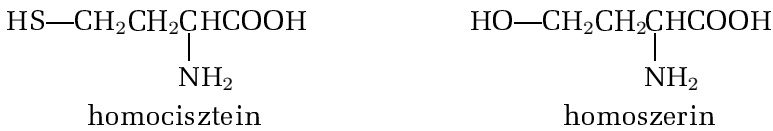
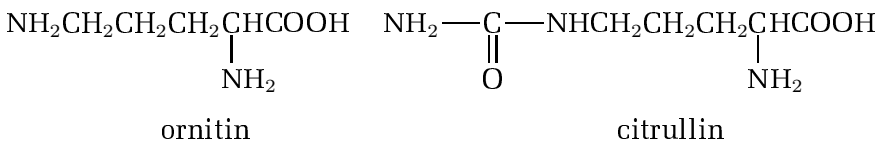
A tárgyalt 20 fehérjealkotó aminosavon kívül több mint 150 természetes aminosav ismert, amelyek csak kis mennyiségben, sokszor csak egyes szervezetekben fordulnak elő. Ezek között található a bakteriális eredetű D-glutaminsav és a D-alanin, a kötőszöveti fehérjékben a prolin és a lizin hidroxilált származéka (hidroxi-prolin, hidroxi-lizin). Ezek az aminosavak szabad állapotban nem fordulnak elő, hidroxilálásuk a polipeptidlánc kialakulása után posztisztetikusan történik. Az izomfehérjékben előfordul a lizin és a hisztidin ϵ -N-metil-lizin és 3-metil-hisztidin származéka. Sokféle fehérjében található foszforilált aminosav, mint amilyen például a foszfoserin (4.7. ábra).

A fehérjealkotó aminosavakon kívül a N-anyagcserében részt vevő intermedierek az *ornitin* és a *citrullin*. Az aminosavak intermedier anyagcseréjének terméke a *homocisztein*, a *homocisztin* és a *homoszerin* (4.8. ábra). Egészséges emlősök szervezetében ez utóbbi három aminosav csak igen kis mennyiségben van jelen.

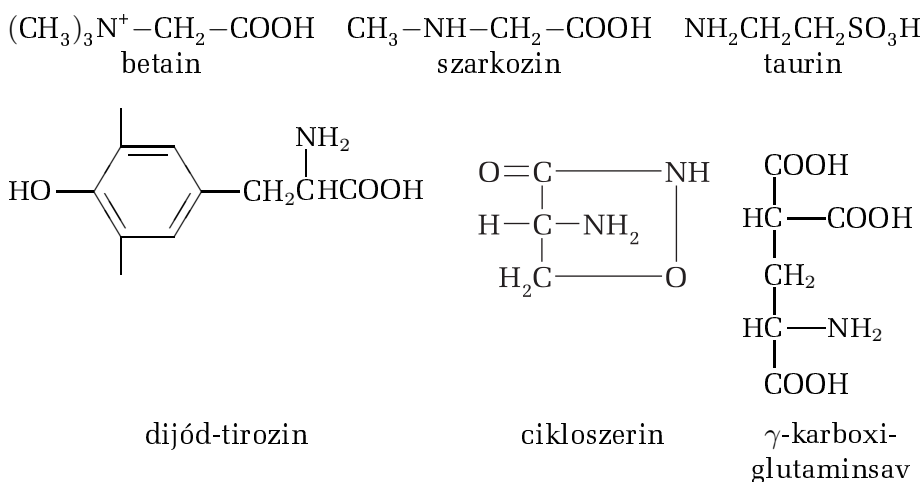
Az aminocsoport β -szénatomhoz kapcsolódik a koenzim-A felépítésében részt vevő β -alaninban, γ -szénatomhoz az idegrendszer működését szabályozó γ -amino-vajsavban és δ -helyzetben a δ -amino-levulinsavban. Az aminosavak néhány származéka bioaktív vegyületek prekursora, mint például a *dijód-tirozin*, amely a pajzsmirigyhormon prekursora. Antibiotikus hatással rendelkezik a *cikloszerin*. A glicin metilálásával keletkezik a *szarkozin* és a *betain*. A cisztein oxidációjának és dekarboxilálásának terméke a *taurin*. A glutaminsav karboxilálása során keletkezik a K-vitamin-függő alvadási faktorokban található γ -karboxi-glutaminsav (4.9. ábra).



4.7. ábra. Néhány fontosabb aminosavszármazék



4.8. ábra. A nitrogén-anyagcserében résztvevő néhány különleges aminosav



4.9. ábra. Néhány bioaktív aminosav-származék

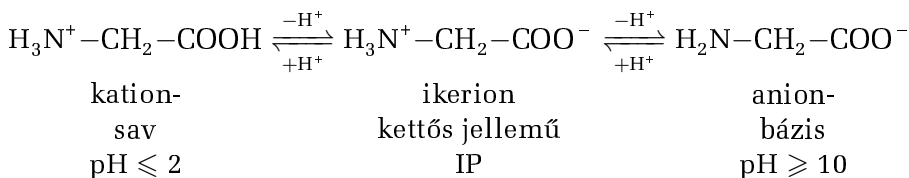
4.1.2. Az aminosavak fizikai tulajdonságai

Oldhatóság szempontjából vizsgálva az aminosavakat megállapítható, hogy a prolin, a hidroxiprolin, a glicin és az alanin vízben jól oldható, míg a többi aminosav vízben rosszabbul oldódik. Vízben a tirozin és cisztin oldódik legrosszabbul. Szerves oldószerekben a poláros karakterű aminosavak rendkívül rosszul oldódnak. Savas vagy lúgos közegben az aminosavak oldhatósága a fellépő sóképződés következtében javul.

Az α -helyzetű szénatom aszimmetriás, tehát az aminosavak optikailag aktívak. A glicin kivételével mindegyik aminosav rendelkezik aszimmetriás szénatommal, tehát a poláros fény síkját elforgatják. Az aminosavak közül kettő, a treonin és az izoleucin, két aszimmetriás szénatomot tartalmaz, ennek megfelelően az optikai izomerek száma e két aminosav esetében négy. A fehérjeépítő aminosavak, eltekintve néhány speciális fehérjétől és a baktériumok sejtfalát alkotó peptidoglikánokban lévő D-aminosavaktól, *L-konfigurációjúak*. A konfiguráció és a forgatás iránya közt semmiféle összefüggés nincs, mindkét konfigurációba tartozó aminosavak forgathatják a poláros fény síkját jobbra is és balra is. A D- és az L-konfiguráció forgatásának mértéke azonos, de iránya ellentétes. A specifikus optikai forgatás mértékét befolyásolhatja a mérés hullámhossza és a hőmérséklet is, ezért a specifikus forgatóképesség

megadásakor az $[\alpha]$ mellé megadjuk a hőmérsékletet, illetve a hullámhosszt is. Az optikai forgatás mértékét a közeg pH-ja is befolyásolja, mert a pH hatással van az aszimmetriás szénatom szubsztituenseinek konfigurációjára. Ha a specifikus optikai forgatás ismert, az optikailag aktív anyagok koncentrációja meghatározható.

Az α -helyzetű szénatomhoz kapcsolódó R csoport lehet apoláros, poláros, pozitív, illetve negatív töltésű. Az aminosavak amino- és karboxilcsoportjai neutrális oldatban ionos állapotban vannak, így minden aminosavnak legalább egy negatív ($-\text{COO}^-$) és egy pozitív ($-\text{NH}_3^+$) töltése van. Ezt a szerkezetet hívjuk *ikerionos szerkezetnek*. Savas irányba eltolva a pH-t, a karboxilion disszociációja protonálódás miatt visszaszorul, a lúgos irányú pH-eltolódás pedig az aminocsoport deprotonálódását okozza. Az a pH-érték, ahol az aminosav teljes mértékben ikerion formában van jelen, az az *izoelektromos pont*. A glicin esetében a változások a 4.10. ábra szerint alakulnak:



4.10. ábra. Az aminosavak ikerionos szerkezetének megváltozása a pH hatására

A *Henderson–Hasselbalch*-egyenlet szerint az aktuális protondonor és protonakceptor koncentrációból kiszámíthatjuk az aminosavak karboxil- és aminocsoportjára jellemző disszociációs állandókat.

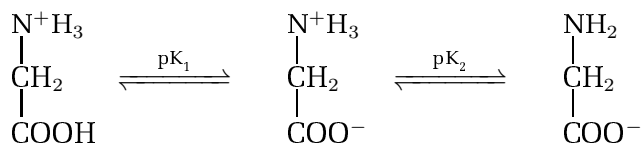
$$\text{pK}_{\text{COOH}} = \text{pH} - \lg \frac{[\text{ikerion}]}{[\text{kation}]}, \text{ illetve}$$

$$\text{pK}_{\text{NH}_2} = \text{pH} - \lg \frac{[\text{anion}]}{[\text{ikerion}]}.$$

Az ikerion amfoter jellemű, mert az oldat H^+ -koncentrációjától függetlenül protonleadásra és protonfelvételre is képes. Az aminosavak izoelektromos pontja a pK_{COOH} -tól és a pK_{NH_2} -től függ akkor, ha az R rész nem tartalmaz disszociálható csoportokat.

$$\text{IP} = \frac{\text{pK}_{\text{COOH}} + \text{pK}_{\text{NH}_2}}{2}.$$

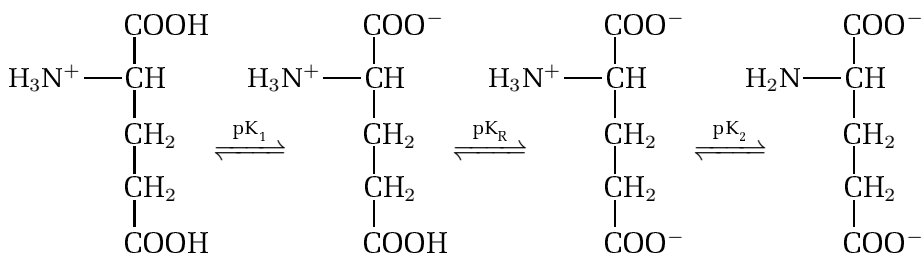
Az aminosavak pK -értékei a disszociáló csoportokra, valamint az izoelektromos pont titrálás után megállapítható. Ha az aminosav több disszociáló csoportot tartalmaz, a görbén több pK -értékre jellemző inflexiós pont észlelhető. Jó példa erre a glutaminsav és a hisztidin, ahol a disszociáció három lépésben megy végbe, és ahol meg lehet határozni az R csoport pK_R -értékét is. A glicin esetében lejátszódó folyamatokat a 4.11. ábra mutatja.



4.11. ábra. A glicin nátrium-hidroxiddal való titrálása során lejátszódó folyamatok

A glicin savas körülmények között egyszeres töltésű, pozitív ion, az izoelektromos ponton semleges molekula, majd a lúgos tartományban egyszeres töltésű negatív ion. Hasonló titrálási görbét ad az összes többi, disszociációra képtelen oldalláncot tartalmazó aminosav is.

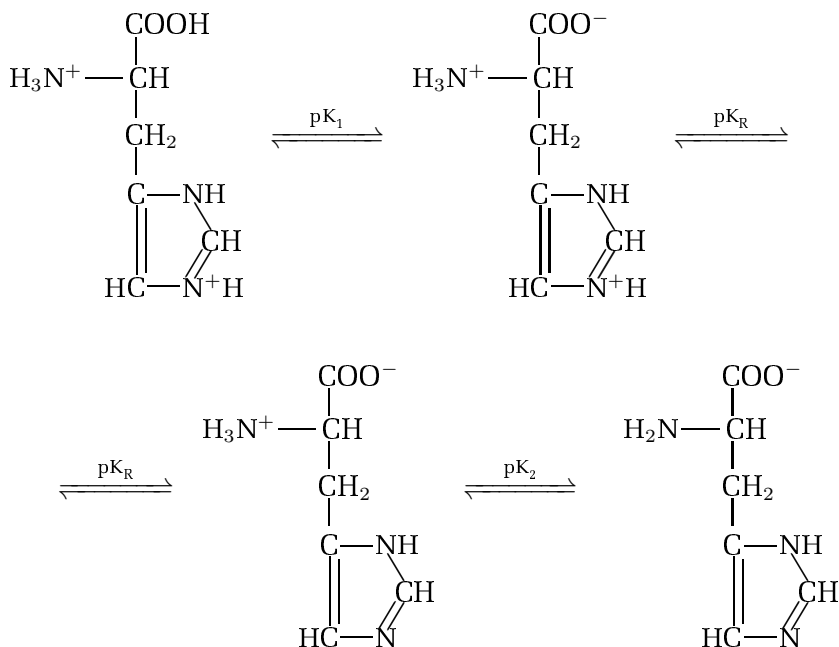
A glutaminsav savas körülmények között egyszeresen pozitív ion; a pH növelésével semleges molekulává, majd a továbbiakban egyszeresen negatív töltésű ionná (egy pozitív és két negatív töltésű csoport), majd legvégül az aminocsoport protonvesztését követően kétszeresen negatív töltésű ionná válik (4.12. ábra).



4.12. ábra. A glutaminsav nátrium-hidroxiddal való titrálása során lejátszódó folyamatok

A hisztidin savas körülmények között kétszeresen pozitív töltésű ion, a karboxilcsoport deprotonálódását követően egyszeresen pozitív

ionná válik, az indolcsoport deprotonálódása nyomán semleges molekulaként viselkedik, majd a pH további növelésével egyszeresen negatív töltésű ion lesz belőle (4.13. ábra).



4.13. ábra. A hisztidin nátrium-hidroxiddal való titrálása során lejátszódó folyamatok

Az aminosavak α_{COOH} csoportjai erősebb savak a megfelelő alifás karbonsavaknál, ami az α -szénatomon lévő aminocsoport elektronszívó hatásával függ össze. Az α -aminocsoportok viszont gyengébb bázisok, mint a megfelelő alifás aminok, a szomszédos karboxilcsoport elektronszívó hatása miatt.

Az aminosavak izoelektromos pontja (amennyiben az R csoport nem tartalmaz disszociáló csoportot, tehát neutrális aminosavról van szó) pH 6 és 7 közé esik. Ha az R csoport disszociáló csoportot tartalmaz, az izoelektromos pont a lúgos vagy a savas tartományba eshet. Ezen utóbbi aminosavak semleges közegben pozitív, illetve negatív töltésűek.

Az aminosavak közül három – a triptofán, a tirozin és a fenil-alanin – olyan aromás kromofor csoportot tartalmaz, amely az ultraibolya fényt

abszorbeálja. Abszorpciós maximumuk 261–290 nm között található. A moláris abszorpciós együttható (1M-os oldat, 1 cm rétegvastagságú küvetében, az abszorpciós maximumon mért fényelnyelés) ismeretében bármely abszorbeáló anyag koncentrációja spektrofotométerrel a *Lambert–Beer-törvény* alapján meghatározható.

$$\lg \frac{I_o}{I} = A = \varepsilon \cdot c \cdot l, \quad \text{amiből } c = \frac{A}{\varepsilon \cdot l},$$

ahol:

I_o és I = a beeső, illetve a kilépő fény intenzitása,

l = a rétegvastagság (cm),

c = a koncentráció (mol/dm³),

ε = a moláris abszorpciós együttható.

Mivel a fehérjék mindig tartalmaznak aromás aminosavakat, koncentrációjuk 280 nm-nél spektrofotometriásan meghatározható. Az aromás aminosavak mennyisége a fehérjékben azonban különböző, ezért meg kell határozni az egyes fehérjék abszorpciós együtthatóját, amire az 1 vagy a 0,1%-os fehérjeoldat szolgál.

4.1.3. Az aminosavak kémiai tulajdonságai

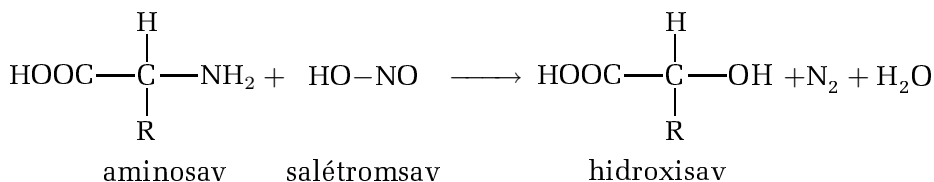
Az aminosavak kémiai jellegét a bázikus jellegű –NH₂ csoport, illetve a savas karakterű –COOH csoport szabja meg. Az aminosavakat a funkciós csoport szerint a következőképpen csoportosíthatjuk:

- *Monoamino-monokarbonsavak* azok az aminosavak, amelyekben a savas és bázikus csoportok száma azonos (glicin, alanin, cisztein, cisztin, szerin, fenil-alanin, tirozin, triptofán, treonin, metionin, valin, leucin, izoleucin, prolin, hidroxiprolin).
- *A diamino-monokarbonsavak* (lizin, ornitin), valamint a hisztidin és az arginin bázikus jellegűek.
- *A monoamino-dikarbonsavak* két karboxilcsoportot tartalmaznak, amelynek hatására savas kémhatásúak (aszparaginsav, glutaminsav).

A karboxilcsoport reakciói. *Dekarboxileződés* az az átalakulás, amikor a karboxilcsoportból CO₂ hasad le, aminek során a megfelelő amin képződik. A szervezetben az enzimatis dekarboxileződés bír nagy jelentőséggel, amelynek következtében több, élettanilag fontos amin keletkezik. *Észtereződés* jöhet létre pl. etil-alkoholos közegben, sósavkatalízis mellett. Az aminosavészterek bázikus karakterű vegyületek,

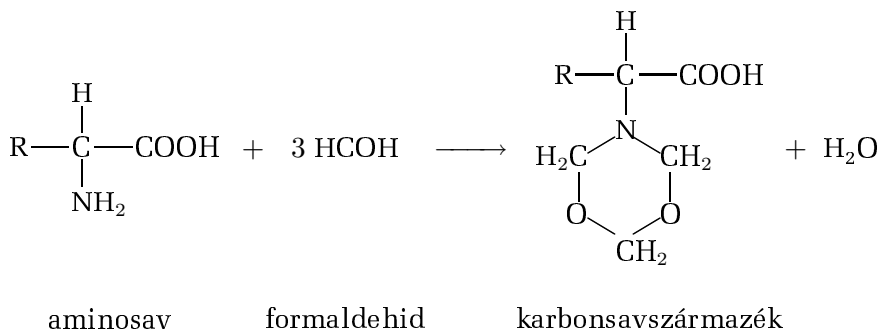
amelyek desztilláció útján szétválaszthatók egymástól, s így lehetséges a fehérjehidrolizátumok aminosav-összetételének meghatározása. Észter formában választjuk szét az aminosavakat a gázkromatográfiás eljárás során.

Az aminocsoport reakciói. *Salétromossavval* az aminosavak *hidroxisavvá* alakulnak át nitrogéngáz keletkezése közben, amelynek térfogatából az aminosavak mennyiségére következtethetünk (4.14. ábra).



4.14. ábra. Az aminosavak reakciója salétromossavval

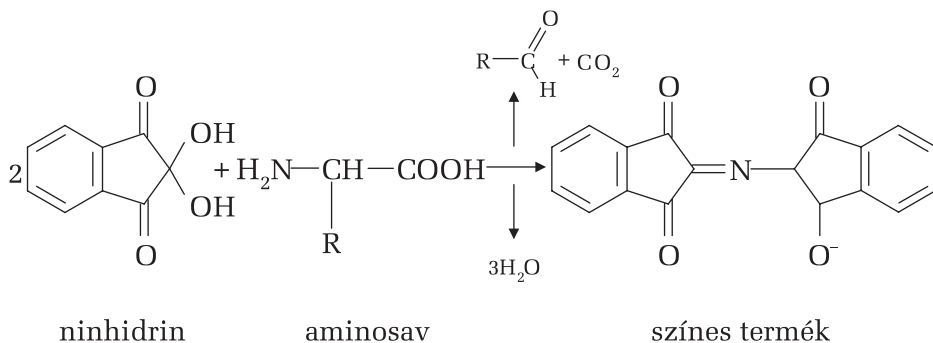
Formaldehiddel az aminocsoport hattagú heterociklusos gyűrűt alakít ki, aminek következtében az aminocsoport elveszíti bázikus karakterét. A megmaradt szabad karboxilcsoport nátrium-hidroxiddal megtitrálható; ez a reakció az alapja a *Sørensen-féle formoltitrálásos* fehérjemeghatározásnak (4.15. ábra).



4.15. ábra. Az aminosavak reakciója formaldehiddel

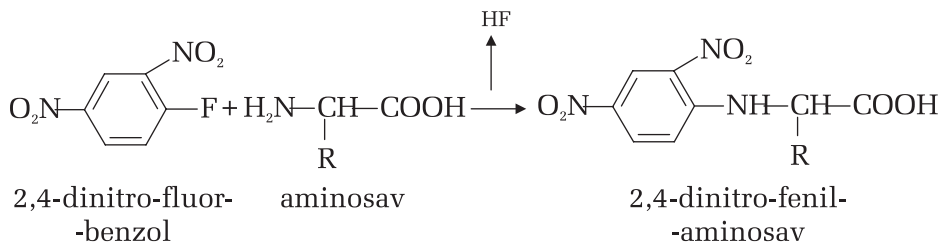
Reakciók más funkciós csoportokkal. Az aminosavak minőségi és mennyiségi meghatározásakor leggyakrabban a *ninhidrinreakciót* alkalmazzuk, mivel az aminosavak ninhidrin jelenlétében melegítve, szabad

NH₂-csoportjuknak köszönhetően, lilás-ibolyás színű reakciót produkálnak (4.16. ábra). A színes vegyület abszorpciós maximuma 570 nm-en található, melynek segítségével az aminosavak mennyiségileg meghatározhatók. A színes vegyületet – rendkívül leegyszerűsítve – az alábbi reakció produkálja:



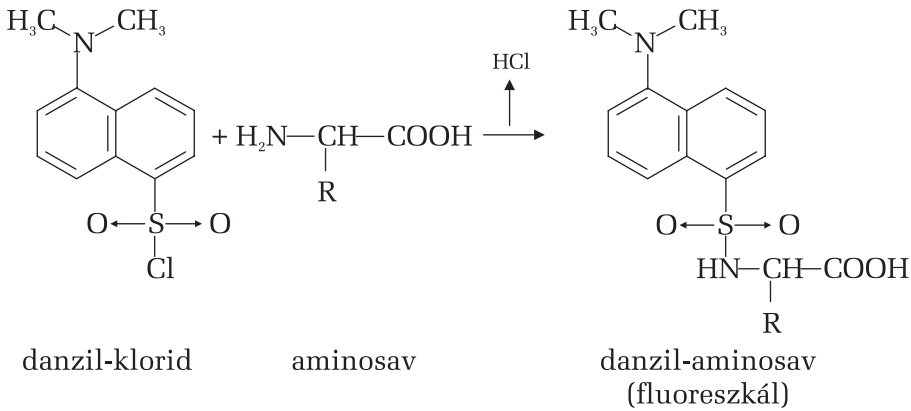
4.16. ábra. Az aminosavak reakciója ninhidrinnel

A *dinitro-fluor-benzol* az aminosavakkal sárga színű dinitro-fenil-származékot képez, amelyet *Sanger* az aminosocsoportok kimutatására, illetve az N terminális aminosav meghatározására használt fel (4.17. ábra).



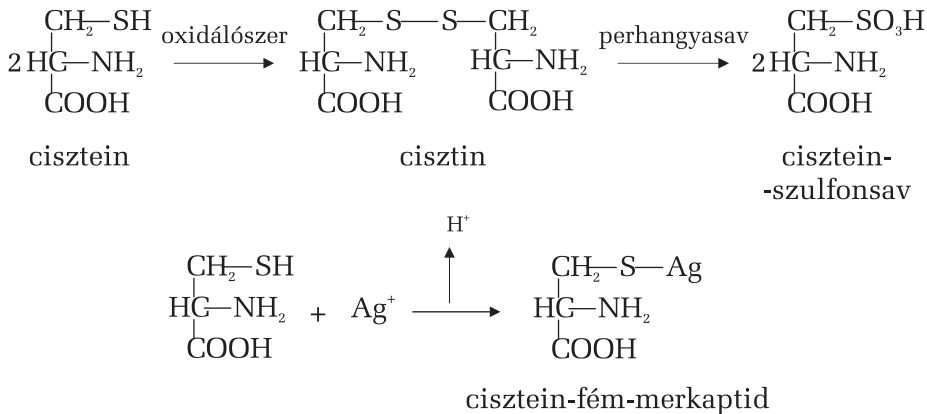
4.17. ábra. Az aminosavak reakciója 2,4-dinitro-fluor-benzollal

A dinitro-fluor-benzolhoz hasonlóan reagál az aminosocsoportokkal a *danzil-klorid* (1-dimetil-aminonaftalin-5-szulfonil-klorid) is. Fluoreszkáló tulajdonsága miatt ez a származék az aminosavak kimutatásának érzékenységét jelentős mértékben megnöveli (4.18. ábra).



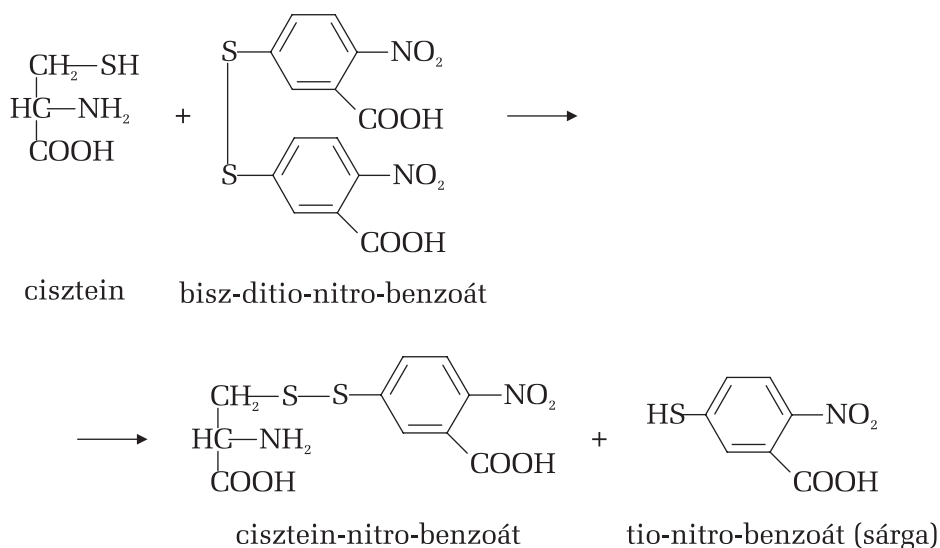
4.18. ábra. Az aminosavak reakciója danzil-kloriddal

Az aminosavak különböző reaktív oldalláncainak kimutatására sok specifikus reakció ismert. A *cisztein* *sulfhidrilcsoportja* pl. *oxidálható* cisztinné, majd *perhangyasav*val tovább *cisztein-szulfonsav*vá. A *cisztein* *sulfhidrilcsoportja* *fémionokkal* is jól reagál *cisztein-fém-merkaptid* keletkezése közben (4.19. ábra).



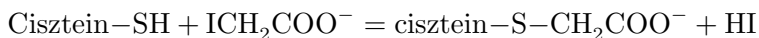
4.19. ábra. A *cisztein* és a *cisztin* reakciói

A *cisztein* az *Ellman-reagenssel* (*bisz-ditio-nitro-benzoát*) sztöchiometriai mennyiségben reagál, miközben sárga színű *tio-nitro-benzoát* vegyület keletkezik, amelynek színintenzitásából a *cisztein* mennyisége meghatározható (4.20. ábra).



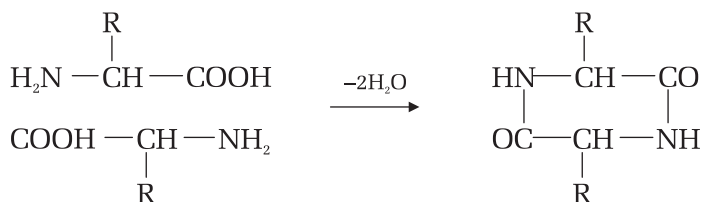
4.20. ábra. A cisztein reakciója bisz-ditio-nitro-benzoáttal

A szulfhidrilcsoport szerves halogénszármazékokkal acilálható. Monojód-acetáttal való reakciója során karboxi-metil-cisztein keletkezik.



Az előzőekben felsorolt reakciók a fehérjékben levő ciszteinil-oldalláncokra is jellemzők. A ciszteinhez hasonlóan a többi poláros aminosav kimutatására is több reakció ismert, amelyek során a kérdéses aminosavakkal színes vegyület keletkezik, ami alkalmas lehet az egyes aminosavak minőségi kimutatására és mennyiségi meghatározására.

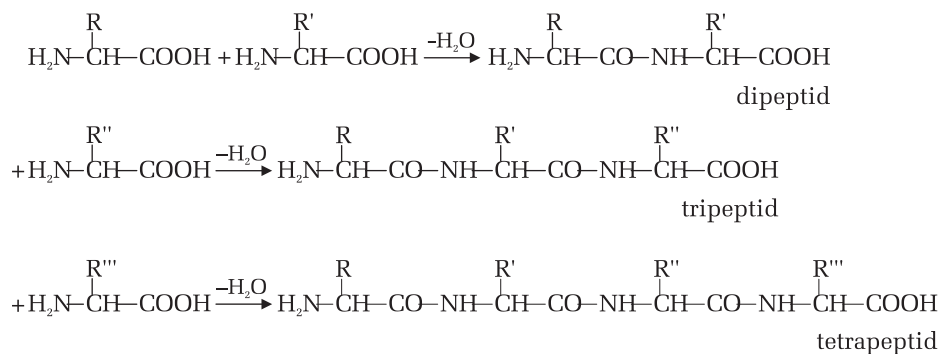
Az aminosavak közötti fontosabb reakciók. A *diketopiperazin-kötés* két aminosav két-két funkciós csoportjai között lejátszódó reakció során jön létre, amely gyűrűs vegyületet ad (4.21. ábra). Erre a kötéstípusra akkor van lehetőség, ha az ellentétes karakterű funkciós csoportok egymáshoz térközelbe kerülnek. A polipeptidláncokban vagy láncok között akkor van nagy valószínűsége e kötés kialakulásának, ha monoamino-dikarbonsavakat, illetve diamino-monokarbonsavakat tartalmazó molekularészek kerülnek közel egymáshoz.



4.21. ábra. A diketopiperazin-kötés kialakulása

Diszulfidhíd a cisztein SH-csoportjának oxidációjával tud kialakulni. Az így egymáshoz kapcsolódó molekularészek révén igen stabil szerkezet jön létre, amely rendkívüli módon ellenáll az enzimes vagy kémiai ráhatásnak.

Az aminosavak legfontosabb reakciója a *peptidek* létrehozása. Ennek során az α -amino- és az α -karboxilcsoportok egy másik aminosavhoz kapcsolódva, vízkilépéssel alakítják ki a peptidkötést (4.22. ábra). Két, három, négy vagy több aminosav kapcsolódása során di-, tri-, tetra- és oligopeptidek, ha az aminosavak száma meghaladja a százat, fehérjék keletkeznek.



4.22. ábra. A peptidkötés kialakulása

4.2. A peptidek

A peptidek aminosavakból épülnek fel peptidkötéssel. A részt vevő aminosavak száma szerint megkülönböztetünk dipeptideket (2 aminosav, 1 peptidkötés), tripeptideket (3 aminosav, 2 peptidkötés), tetrapeptideket stb. Ha a molekulában tíznél kevesebb aminosav található,

akkor oligopeptidekről, tíznél több aminosav esetében polipeptidekről beszélünk. Fehérjének akkor nevezzük a polipeptidet, ha az aminosav-összetevők száma 100 vagy még több.

Két aminosavból, például glicinből és alaninból, attól függően, hogy az amino- vagy a karboxilcsoportjával kapcsolódik az egyik aminosav a másik aminosavhoz, kétféle dipeptid, glicil-alanin vagy alanil-glicin keletkezhet. E két dipeptid attól függetlenül, hogy mindkettőt ugyanaz a két aminosav alkotja, fizikai és kémiai tulajdonságaiban lényegesen eltér egymástól. Egy peptid vagy fehérje aminosavsorrendjének leírását mindig azzal az aminosavval kezdjük, amelynek az NH_2 csoportja szabad (N terminális, aminoterminális), és a szabad α -karboxilcsoportot tartalmazó aminosav (C terminális, karboxiterminális) felé haladunk.

Ha a peptid három aminosavból épül fel, az aminosavak sorrendje hatféle lehet, négy aminosav esetén 24-féle, öt aminosav esetén 120-féle aminosavsorrend képzelhető el. A lehetséges variációk száma az n faktoriállal ($n!$) egyezik meg. Öt aminosav esetén a lehetséges változatok száma:

$$5 \cdot 4 \cdot 3 \cdot 2 \cdot 1 = 120,$$

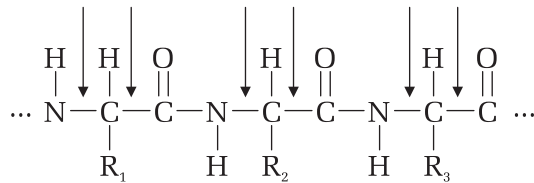
hat aminosav esetén:

$$6 \cdot 5 \cdot 4 \cdot 3 \cdot 2 \cdot 1 = 720.$$

A száznál több húszféle aminosavból felépülő polipeptidlánc aminosav-sorrendje elvileg rendkívül nagy lehet, bár a valóságban ennek csupán csekély része realizálódik.

A peptidkötés kialakulására felírt reakcióegyenletből látszik, hogy a $-\text{C}-\text{N}-$ egyes, a $=\text{C}=\text{O}$ kettős kötéssel kapcsolódik egymáshoz, tehát az NH csoport szubsztituált amidnak tekinthető. *Pauling* szerint a peptidkötés kialakításában részt vevő négy atom (C, O, N, H) egy síkban van. A peptidkötés mezomériája folytán azonban a $-\text{C}-\text{N}$ csoportok 40%-a kettős, a $=\text{C}=\text{O}$ csoportok 40%-a egyes kötéssel kapcsolódik egymáshoz. Ebből egyrészt az következik, hogy a peptidkötésben lévő NH csoportnak nincs ionizációs hajlama, másrészt az, hogy a $-\text{C}-\text{N}-$ peptidkötés merev, rotációs készsége minimális, a kötés körüli elforgatás akadályozott. Az $-\text{N}-\text{C}-$ és a $-\text{C}-\text{C}-$ körül viszont lehetséges az elfordulás, ezért a polipeptidlánc ezeken a helyeken meghajolhat, elcsavarodhat (4.23. ábra).

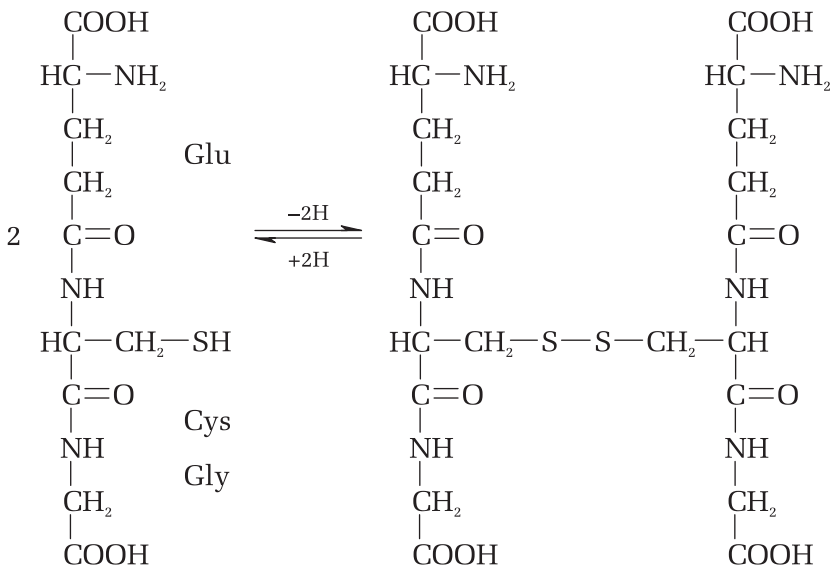
A peptidek elektrokémiai sajátosságait a két terminális szabad amino- és karboxilcsoport, valamint az oldalláncok ionizáló csoportjai határozzák meg. Minthogy a terminális csoportok ellentétes töltésű csoportjai



4.23. ábra. A peptidkötés merev és planáris, rotációs készsége minimális (az elfordulás helyeit a peptidláncban nyíl jelöli)

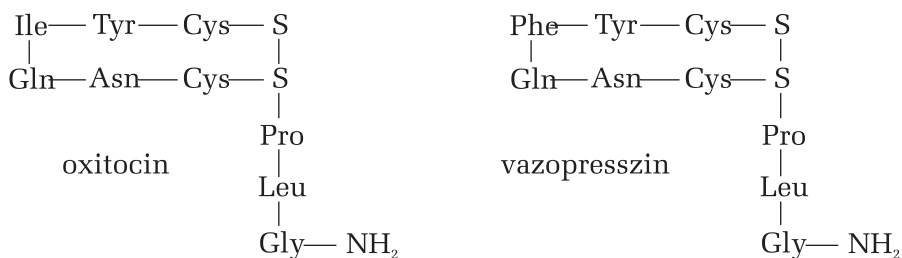
peptidkötésben vesznek részt, ezek elektronszívó hatása a peptidben részt vevő aminosavak számától függően egyre kevésbé érvényesül.

A természetben nagyon sok és rendkívül változatos peptid fordul elő. Az izmokban például a *karnozin* (β -alanil-hisztidin) dipeptid, amelynek funkciójáról még nem sokat tudunk. Sokak által tanulmányozott tripeptid a *glutathion* (γ -glutamil-ciszteinil-glicin). Két glutathion szulfhidrilcsoportja enyhe oxidáció hatására diszulfidkötéssel kapcsolódhat egymáshoz. A redukált és az oxidált glutathion a sejtekben redox-rendszerként működik. A tripeptid különlegessége, hogy a glutaminsav nem az α -, hanem a γ -karboxilcsoportjával kapcsolódik a ciszteinhez, aminek következtében a proteolitikus enzimek nehezebben tudják megtámadni és lebontani (4.24. ábra).



4.24. ábra. A karnozin, valamint a glutathion redukált és oxidált formája

Számos hormonhatású peptid is ismert, amelyek közül talán legismertebb az *oxitocin*, a *vazopresszin*, az *adrenokortikotrop hormon* (ACTH) és az *inzulin*. Az oxitocin és a vazopresszin felépítésében rendkívül hasonló: egy hattagú ciklusból és egy háromtagú farokból állnak. Mindkét hormon a simaizmok működésére hat, azonban a szerkezetükben mutatkozó két aminosav-különbség meghatározza specificitásukat. Az oxitocin a méhizomzat, a vazopresszin a véredények simaizomsejtjeinek összehúzóását okozza. Az ugyancsak kilenc aminosavból felépülő egyenes láncú *bradikinin* a vérnyomást szabályozza (4.25. ábra).



bradikinin

4.25. ábra. Az oxitocin, a vazopresszin és a bradikinin

Fentieken túl még az alábbi peptidhormonok ismertek szélesebb körben: a 14 aminosavból álló *növekedéshormon-reguláló faktor*, az embernél 39 aminosavból álló *adrenokortikotrop hormon*, a 84 aminosavból álló *parathormon*, a 32 aminosavból álló *kalcitonin*, a 90–92 aminosavból álló *lipotrop hormon* és a 191 aminosavból álló *prolaktin*. Ezenkívül nagyon fontos peptidhormon a *luteinizáló*, a *follikulusstimuláló* és a *tireoideastimuláló* hormon, valamint az *inzulin* és a *glukagon*. Az ACTH limitált proteolízisével annak C terminális szakaszából γ -lipotropin, β -endorfin és β -MSH keletkezhet. Az *endorfin* elnevezés (az endo és a morfin összevonásából) a morfinhoz hasonló fájdalomcsökkentő hatásra utal. Az idegrendszerben ugyanazokhoz a célsejtekhez kapcsolódnak, mint a morfin. Az adenilát-ciklázon és a ciklikus nukleotidokon keresztül fejtik ki hatásukat. A morfinszerű hatás az N terminálison lévő pentapeptidhez, az enkefalinhoz kötött. Az enkefalinoknak két alakja ismert: a Tyr-Gly-Gly-Phe-Met szekvenciájú Met-enkefalin és a Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu szerkezetű Leu-enkefalin. Számos antibiotikum is peptid

(aktinomicin, bacitracin, nizin, gramicidin, penicillin). A különböző mikroorganizmusok, mint például a *Streptomyces* törzsek, olyan, szokatlan felépítésű, peptidszerű vegyületeket termelnek, amelyek igen kis koncentrációban (10^{-6} – 10^{-8} M) is gátolják a proteolitikus enzimeket. Ezekre a *proteázgátlókra* jellemző, hogy a fehérjealkotó aminosavaktól eltérő, más aminosavakat is tartalmaznak. A gátlóanyagok közül a *leupeptin* a *plazmint*, a *tripszint*, a *papaint* és a *katepszin B-t*, az *antipain* a *papaint*, a *tripszint*, a *katepszin A-t* és *B-t*, az *elasztin* pedig az *elasztázt* gátolja.

A peptideknél igen fontos érzékszervi tulajdonság a keserű íz, amelynek kiküszöbölése egyes élelmiszerek előállításánál nagy probléma. A peptidek nagy része a konfigurációtól függetlenül keserű vagy semleges ízhatást mutat, az édes L-aszparaginsav-dipeptidek kivételével. A keserű íz intenzitása az egyes peptideknél eltérő. Néhány peptid ízküszöbértékét mM/dm³-ben a 4.1. táblázat tartalmazza.

4.1. táblázat. *Néhány peptid ízküszöbértéke a konfiguráció és aminosav-szekvencia függvényében (mM/dm³) (ha nincs külön jelölés, mindig L-konfiguráció értendő)*

Peptid	Keserű ízintenzitás
Gly-Leu	19–23
Gly-D-Leu	20–23
Gly-Phe	15–17
Gly-D-Phe	15–17
Leu-Leu	4–5
Leu-D-Leu	5–6
D-Leu-D-Leu	5–6
Ala-Leu	18–22
Leu-Ala	18–21
Gly-Leu	19–23
Leu-Gly	18–21
Ala-Val	60–80
Val-Ala	65–75
Phe-Gly	16–18
Gly-Phe	15–17
Phe-Gly-Phe-Gly	1,0–1,5
Phe-Gly-Gly-Phe	1,0–1,5

A táblázatban látható, hogy az ízintenzitás jelentősen függ az oldalláncok hidrofobitásától. A peptidek keserű ízének előfordulásával elsősorban azoknál az élelmiszereknél kell számolnunk, ahol fehérjebontó enzimes folyamatok játszódnak le (pl. sajtok érése folyamán).

4.3. A fehérjék

4.3.1. Általános tulajdonságok (szerkezet, molekulatömeg, oldhatóság)

A fehérjék igen változatos felépítésű makromolekulák, amelyek a sejtek szárazanyagának kb. 50%-át teszik ki. Nincs olyan biológiai jelenség, amely valamilyen módon ne lenne kapcsolatba hozható a fehérjékkel; a fehérjék kifejezői az élőlényekre jellemző összes sajátásnak, amit a biológiai információs rendszer tartalmaz. A fehérjék szerkezetét a funkciójuk szigorúan meghatározza.

A fehérjéket feloszthatjuk aszerint, hogy hidrolízisük során csak aminosavak keletkeznek (egyszerű fehérjék, proteinek), vagy az aminosavak mellett a hidrolizátum még egyéb alkotórészt (összetett vagy konjugált fehérjéket) is tartalmaz. Az *egyszerű fehérjék* elemi összetétele átlagosan 50% C, 7% H, 23% O, 16% N és 0–3% S. Az *összetett fehérjék* emellett egyéb alkotórészeket (pl. fémek, egyéb szerves vegyületek) is tartalmaznak. A fehérjék szerkezetének vizsgálatával a XX. század elején kezdtek foglalkozni; *Emil Fischer* kísérletei járultak hozzá leginkább a fehérjék szerkezetének megismeréséhez. Ekkor oldékonyságuk alapján osztályozva a fehérjéket, különböző csoportokat alakítottak ki (4.2. táblázat).

A prolaminok és a glutelinek növényi magvakban előforduló tartalék fehérjék. A szkleroproteinek csak tömény savval vagy lúggal főzve, bomlás közben oldódnak fel.

A fehérjék funkció szerinti felosztása tájékoztatást ad biológiai szerepükről. Az enzimek közé sorolt fehérjékkel a későbbiek folyamán többször találkozunk. A *transzportfehérjék* feladata a szervek közötti szállítás; a határfelületeken keresztüli membrántranszport útján biztosítják a sejt és környezete közti kapcsolatot. A *védőfehérjék* a szervezet fertőzéssel vagy sérülésekkel szembeni védekezését teszik lehetővé. A *hormonok* a neurohormonális szabályozásban vesznek részt, míg

4.2. táblázat. *A fehérjék csoportosítása az oldékonyság alapján*

Csoport	Oldékonyság
Albuminok	desztillált vízben, híg sóoldatokban
Globulinok	híg sóoldatokban, desztillált vízben nem
Hisztonok	híg savakban
Prolaminok	50–80%-os alkoholban; tisztá vízben vagy tiszta alkoholban nem
Glutelinek	híg savban vagy lúgban
Szkleroproteinek	semmiféle oldószerben nem oldódnak

a *struktúrfehérjék* a mozgáshoz biztosítanak szilárd vázlat, és a külső védelmet is szolgálják. A *tartalék fehérjék* az embrionális fejlődés első szakaszában fehérjeraktárként szolgálnak.

A *globuláris fehérjéknek* a tér egyik irányában sincs kitüntetett méretük, nagyjából gömb alakúak, bennük a polipeptidlánc tömör gombolyaggá gombolyodott össze. Általában olyan, biológiailag aktív, dinamikus funkciókat betöltő fehérjék tartoznak ide, mint például az enzimek és a transzportfehérjék. A statikus feladatokat betöltő *fibrilláris fehérjék* polipeptidlánca általában megnyúlt, kettésével, hármásával sodort fonalat alkot. Ez utóbbiak vizes közegben rosszul oldódnak vagy oldhatatlanok, szerkezeti, mechanikai vagy védőfeladatokat látnak el. Ilyen például a haj, a bőr, a toll, a pata, a köröm fehérjéje, az α -keratin, az inakat alkotó kollagén vagy a selyemlepke által készített fibroin. A rendkívül változatos fehérjék igen érzékenyen reagálhatnak a környezet változásaira. Ha a közeg hőmérséklete nő, ha a pH nő vagy csökken, ha a közegbe idegen anyagok, például só kerül, szerkezetük sok esetben felbomlik, irreverzibilisen elvesztik biológiai tulajdonságaikat, denaturálódnak. Nagyon lényeges tulajdonságuk, hogy más fajba jutva ellenanyagképzést indítanak meg; a fehérjék tehát immunaktív anyagok. Az összetett fehérjék a nemfehérje komponens összetételét illetően is igen sokfélék lehetnek. A szervezetben nagy mennyiségben fordulnak elő lipoproteinek, amelyekben a fehérje lipidekkel kapcsolódik. A transzport *lipoproteinek* egyik csoportja a vérplazmában, a bélben és a májban a lipidek szállításában vesz részt, másik csoportjából lipidtartalmú membránok keletkeznek. A lipoproteinekben a fehérje és a lipid közötti kapcsolat nem kovalens jellegű.

A *glikoproteinekben* ezzel szemben a szénhidrát rész a fehérjével kovalensen kapcsolódik, a szénhidrát a fehérje integráns része; kapcsolódásuk sokféle kombinációs lehetőséget tesz lehetővé. A glikoproteinek egy részének igen speciális funkciója van; lehetnek például antigén-determinánsok vagy vírusreceptorok. Aminosav-sorrendjükben gyakori szekvencia az Asp–egyéb aminosav–Ser vagy az Asp–egyéb aminosav–Thr, amelyekben az aszpartil-oldallánchoz acetyl-glükózamin kötődik. Mind a *ribonukleáz-B*, mind a *ribonukleáz-A* tartalmaz Asp-Leu-Thr szekvenciát; a B-ben ehhez szénhidrát kapcsolódik, az A-ban ilyen nincs. A *metalloproteinek* valamilyen kationt tartalmaznak komplex kötésben, amelynek az esetek nagyobb részében közvetlen szerepe van a fehérje funkciójának kialakításában.

A fehérjék elsődleges, másodlagos, harmadlagos és negyedleges szerkezete. A fehérjék felépítése a rendkívül sokféle feladatnak megfelelően nagyon változatos. Húszféle aminosavból polipeptidlánconként több százat is tartalmazhatnak, és az aminosavak kapcsolódásának sorrendje is rendkívül változatos lehet. Az aminosavak kapcsolódásának sorrendje jelenti a fehérjék elsődleges szerkezetét. A peptidláncok nem maradnak meg fonal alakúnak, hanem egyes szakaszaikon kisebb-nagyobb, periodikusan rendezett szakaszok (csavarmenet vagy zezgugos rendeződés) alakulnak ki. A periodikusan rendezett szakaszok alkotják a fehérje másodlagos vagy szekunder szerkezetét. Globuláris fehérjék esetén a rendezett és rendezetlen szakaszokat tartalmazó peptidlánc összegombolyodik, és tömör, gombolyagszerű szerkezetet hoz létre, amelyben a poláros oldalláncok többsége a külső felületen, míg az apoláros oldalláncok jelentős hányada a polipeptidgombolyag belsejében helyezkedik el. Ez a fehérjék harmadlagos vagy terciér szerkezete. Végül rendszerint páros számú polipeptidgombolyag egymással nem kovalens kölcsönhatásokkal összekapcsolódik, és két vagy négy polipeptidlánccból (alegységéből) álló molekulák alakulnak ki. Ez a fehérjék negyedleges vagy kvaterner szerkezete.

A fehérjék elsődleges szerkezete. A fehérjék aminosav-összetételének meghatározását ma már az ioncserés oszlopkromatográfia elvén működő aminosav-analizátorral, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával, esetleg gázkromatográfiával könnyen el lehet végezni. Ha a vizsgált fehérje molekulatömegét ismerjük, megállapíthatjuk a polipeptidláncban lévő aminosavak számát. Általánosságban elmondható, hogy:

- A globuláris fehérjékben a poláros és apoláros aminosavrészek száma nagyjából megegyezik (kivéve a membránfehérjékben).
- Nem minden fehérjében található meg az összes fehérjeépítő aminosav; több fehérje nem tartalmaz ciszteint, és sok fehérjéből hiányzik például a triptofán (*ribonukleáz*, hisztonok).
- Az aminosavak közül a metionin, a triptofán, a cisztein és a hisztidin kisebb koncentrációban található a többiekénél.
- A funkciónak megfelelően egyes fehérjék aminosav-összetétele rendkívül sajátos. A fibrilláris fehérjékben igen sok a nem poláros aminosav; az elasztinban elérheti a 90%-ot. Néhány fibrilláris fehérje csak rendkívül kevés aminosavat tartalmaz; a selyemfibroin 45% glicin, 30% alanin és 18% szerin mellett aromás aminosavat egyáltalán nem tartalmaz. A sejtmag hisztonjai és protaminjai aránylag sok bázikus aminosavat tartalmaznak, de sok bázikus aminosav található például a *citokróm-c*-ben és a *lizozimban* is. A *pepszin* bázikus aminosavat nem, viszont sok savas aminosavat tartalmaz.
- A genetikai információ állandóságát tükrözi, hogy valamely faj egy adott fehérjéjének aminosav-összetétele mindig állandó.

A fehérjék aminosavsorrendje. Az első fehérje aminosav-szekvenciáját *Sanger* határozta meg 1954-ben. Az elmúlt évtizedek során több száz fehérje aminosavsorrendjét meghatározták. Mivel az aminosavsorrend a biológiai információ „lenyomata”, az aminosavsorrend alapján információkat kaphatunk a DNS-szakaszok és a róluk másolt mRNS-molekulák bázissorrendjére. Az ismert aminosav-szekvenciák alapján néhány következtetés fogalmazható meg.

Egy fajon belül a funkcionálisan azonos fehérjék aminosav-sorrendje meghatározott, míg a fejlődés különböző szintjein álló fajok homológ fehérjeinek aminosavsorrendje többé-kevésbé különbözik. A szabály alól kétféle kivétel van: az egyik esetben azonos funkció ellátásához többféle polipeptidlánc szolgálhat (ilyenek pl. a hemoglobinek és az izoenzimek); ezeknek aminosavsorrendje eltérő, de ugyanazon fajon belül megegyezik. A másik esetben egyéni különbségek lehetnek az aminosavsorrendben, amikor mutáció következtében rendszerint csupán egy-egy aminosav-eltérés tapasztalható.

Néhány esetben, mint például a *citokróm-c*-ben, *megfigyelhető azonos aminosavak*, mint pl. a Lys-Lys- vagy a Lys-Lys-Lys szekvenciák *felhalmozódása*. A szekvenciafelhalmozódás nem gyakori, és ugyancsak

inkább kivételként fordulnak elő ABABAB vagy az ABCDABCD sorrendhez hasonló, periodikusan ismétlődő szekvenciák (ABCD-vel a különböző aminosavakat jelöltük). Nem gyakoriak a génszakaszok duplikációjára utaló, ismétlődő szekvenciarészletek sem, mint amelyek az immunglobulinokban találhatóak.

A polipeptidláncokban adott helyen kétfajta aminosavcsere fordulhat elő. *Konzervatív* csere az, ha hasonló kémiai tulajdonságú és közel azonos méretű aminosavrészek cserélődnek (pl. treonin helyett szerin, glutaminsav helyett aszparaginsav, alanin helyett glicin). *Radikális* csere esetén a neutrális oldallánc helyére töltést viselő kerül (valin helyett glutaminsav vagy izoleucin helyett lizin), vagy kisméretű oldallánc helyére nagyméretű kerül (glicin cserélődik triptofánra). A konzervatív helyettesítés nem befolyásolja lényegesen a fehérje sajátosságait, ezzel szemben a radikális helyettesítés csak akkor nem okoz változást, ha az a fehérje molekulaszervezetileg vagy funkcionálisan indifferens részén történik.

A polipeptidlánc egyes szakaszai konzervatívabbak, ezen szakaszokon aminosavcsere egyáltalán nem, vagy csak nagyon ritkán fordul elő. 1963-ban *Harris* megállapította, hogy a 330 aminosavból felépülő *D-glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz* enzimből *tripszines* hasítással nyert 18 aminosavrészből álló szakasz, amely a szubsztrátot megkötő ciszteinil-oldalláncot tartalmazza, a fejlődéstörténetileg egymástól igen távol álló fajokban is azonos. A globinok aminosavsorrendjében két hisztidin-oldallánc minden fajból származó globinban megtalálható. Ezek az oldalláncok a fehérje proszitetikus csoportjában levő vasatommallétesítének kapcsolatot.

Az előzőekben felsorolt esetekben a konzervativizmust a fehérje funkciója határozza meg, ha ugyanis a funkcionális szempontból kritikus oldallánc kicserélődik, a fehérjék elveszítik a biológiai feladat betöltéséhez szükséges szerkezetüket.

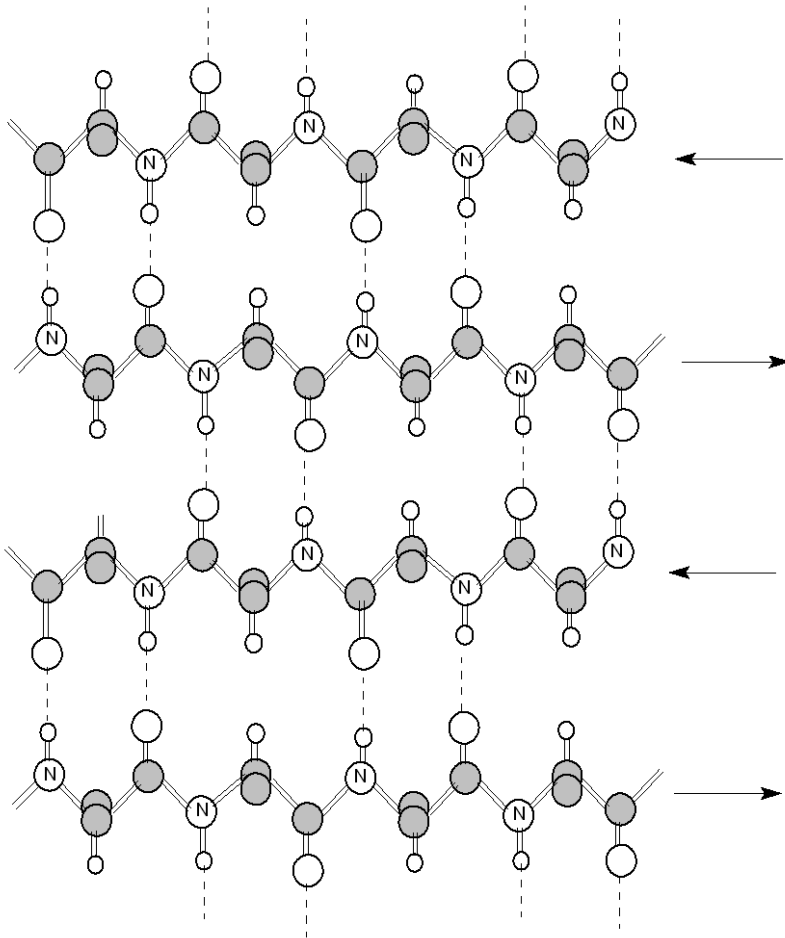
A ferredoxinok különféle redoxreakciókban részt vevő, kevésbé specifikus enzimek, amelyek a nitrogén- vagy kénvegyületek redukációjában, a nitrogénfixálásban és a fotoszintézisben játszanak szerepet. A bakteriális ferredoxin kb. 60 aminosavból felépülő molekula, amely két, csaknem azonos félből áll. Egyes aminosavrészek mindkét láncfélben azonos helyen találhatóak, amiből arra lehet következtetni, hogy a ferredoxin valaha kb. 30 aminosavból állt, és génduplikáció következtében alakult ki a 60 aminosavrészből álló molekula. A molekula második fele változékonyabb, ebben több az aminosavcsere, mint az első láncfélben.

Ebből az következik, hogy a második láncfelet kódoló információszakaszon valószínűleg gyakrabban fordulnak elő mutációk.

Az aerob szervezetek elektrontranszportjában részt vevő *citokróm-c-ben* a fejlődéstörténetileg egymáshoz közel álló fajok aminosavsorrendjében kevés az eltérés, de a távoli fajok esetén is sok a hasonlóság. A lánc 14. és 16. aminosava minden esetben cisztein; ez köti meg a hem proszтетikus csoportot. Ugyancsak megegyezik a lánc 70. és 80. aminosava közti aminosavsorrend minden fajban. Megállapították azt is, hogy az aminosavcserek száma és a fajok fejlődésében mutatkozó fejlődéstörténeti és időbeli távolság között egyenes arány áll fenn, így a cserék száma alapján megalkotható a vizsgált fajok leszármazási törzsfája. Hasonló törzsfák természetesen más vizsgált fehérjére is felállíthatók.

A fehérjék másodlagos szerkezete. A szerves molekulákban a kötések körül az atomok mozgási szabadsága viszonylag nagy, egymáshoz képest rendkívül sok térbeli elhelyezkedés alakulhat ki. A polipeptidlánc úgy tekinthető, mintha végtelen sok konformációja lenne, amelyek a hőmozgás következtében szüntelenül egymásba alakulnak. Az élő sejt viszonyai között létező, az adott viszonyok között legstabilabb alakot natív konformációnak hívjuk. A sejtben keletkező polipeptidláncok többsége nem marad meg fonal alakúnak, hanem jól definiált háromdimenziós térszerkezetet alakít ki. A fehérjék térszerkezetének megismerését a *röntgen struktúranalítika* tette lehetővé 1930 táján. Ekkor megállapították, hogy a fonalas szerkezetű fehérjékben a fonal tengelye mentén 0,50–0,55 nm-enként ismétlődő egységek mutathatók ki. Ebből azt a következtetést vonták le, hogy a polipeptidlánc nem nyújtott, hanem valamilyen módon csavarodott. A hajban, a körömben, a tollban és a patában előforduló α -keratin esetében megfigyelték, hogy feszítés hatására az ismétlődő egységek távolsága megváltozik. Az 1940-es évek elején *Pauling* és *Corey* bizonyította, hogy a polipeptidláncok kétfajta, periodikusan rendezett szerkezetet alakíthatnak ki.

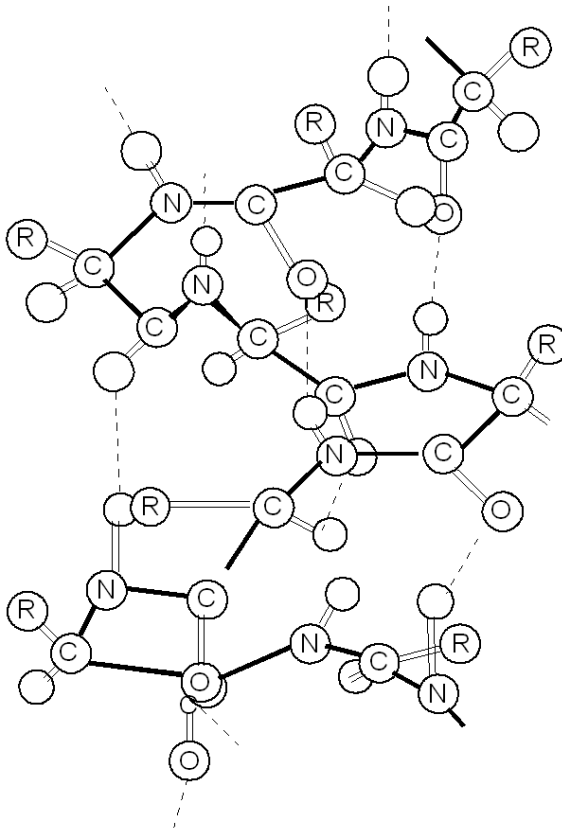
E szerkezetek közül egyszerűbb a β -szerkezet (β -hajtogatott lemez, zezugos, cikkcakkos fonalak), amely két vagy több polipeptidlánc vagy polipeptidlánc-szakaszok közt alakul ki úgy, hogy a karbonil- és iminocsoportok hidrogénkötéseket képeznek (4.26. ábra). A β -szerkezetnek viszonylagos stabilitása miatt különleges jelentősége van a nagy mechanikai igénybevételeknek kitett szövetben, de ez a forma előfordulhat globuláris fehérjékben is. A polipeptidláncok lefutása szerint a β -szerkezetnek két típusa ismert: ha a láncok párhuzamosan futnak,



4.26. ábra. A β -szerkezetű lemez kialakulása párhuzamosan futó, feszített polipeptidláncokból (a szaggatott vonalak a hidrogénkötéseket jelölik)

parallel, ha a tükörképi szimmetriának megfelelően futnak, antiparallel szerkezetről beszélünk.

A periodikus rendezettség másik típusa az α -hélix, amelyben a polipeptidlánc az óramutató járásával megegyező irányban, csavarmenet-szerűen rendeződik. Egy csavarmenetet 3,6 aminosavrész alkot; a csavarmenet átlagos magassága 0,54 nm. Az α -hélix szerkezet stabilitását a hidrogénkötések biztosítják, az oldalláncok a hélix által alkotott képzetbeli hengerpalást sugarainak irányában helyezkednek el. A hélix szerkezetet nagyszámú hidrogénkötés stabilizálja, amely a legkisebb szabadenergiájú állapotnak megfelelően, spontán alakul ki. Az α -hélix megszakad, ahol a peptidlánc prolicsoportot tartalmaz, mivel az nem képes hidrogénkötés kialakítására (4.27. ábra).



4.27. ábra. A jobbra forgató α -hélix szerkezet kialakulása (a szaggatott vonalak a hidrogénkötéseket jelölik)

A fehérjealkotó természetes L-aminosavakból képződő α -hélix jobbmenetes, csavarodása az óramutató járásával megegyezik. Szintetikus polipeptidekben kialakulhat akár jobb-, akár balmenetes α -hélix is. A pozitív töltésű oldallánccal rendelkező polilizin és a negatív töltésű oldallánccal rendelkező poli- α -glutamát neutrális vizes oldatban nem képez hélixet, mert a töltések megakadályozzák a hélix kialakulását. Ha a H^+ koncentrációjának változtatásával a disszociációt megszüntetjük, mindkét esetben spontán kialakul a helikális szerkezet. Elemezve azt, hogy ismert térszerkezetű fehérjékben a különféle aminosavrészek milyen gyakorisággal fordulnak elő, ki lehet mutatni a különböző aminosavrészek hatását a fehérje másodlagos szerkezetére.

Az α -hélix-képzés során:

- erős hélixképző a glutaminsav, az alanin és a leucin,
- közepes hélixképző a hisztidin, a metionin, a glutamin, a triptofán, a valin és a fenil-alanin,
- gyenge hélixképző a lizin és az izoleucin,
- indifferens az aszparaginsav, a treonin, a szerin, az arginin és a cisztein,
- erős hélixrontó a prolin és a glicin.

A β -redőképzés szempontjából:

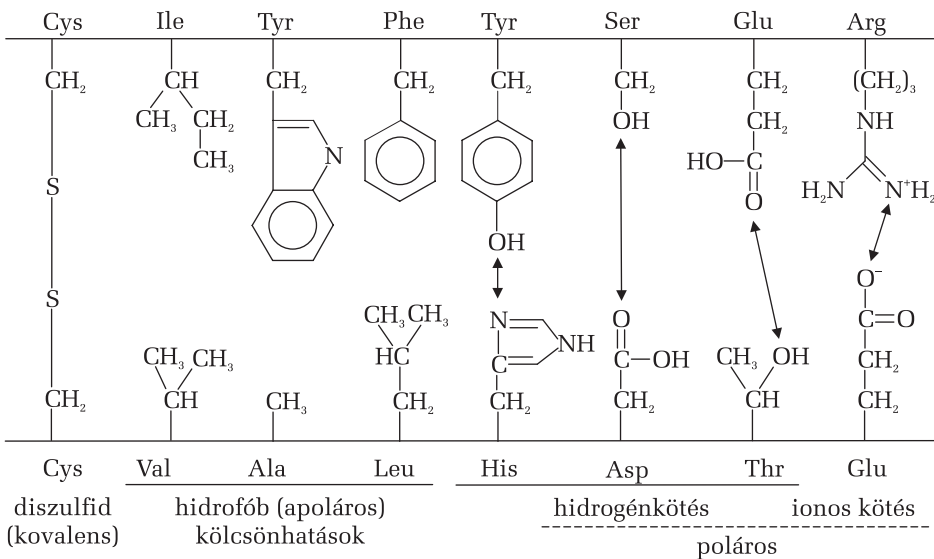
- erős redőképző a metionin, a valin és az izoleucin,
- közepes redőképző a cisztein, a tirozin, a fenil-alanin, a glutamin, a leucin, a treonin és a triptofán,
- gyenge redőképző az alanin,
- indifferens az arginin, a glicin és az aszparaginsav,
- gyenge redőrontó a lizin, a szerin, a hisztidin, az aszparagin és a prolin,
- erős redőrontó a glutaminsav.

Az előzőekben felsoroltak alapján, ismerve a polipeptid vagy fehérjelánc aminosav-összetételét, nagy valószínűséggel megjósolható az α -hélix, a β -redőzött szerkezet vagy a rendezetlen (random coil) struktúra kialakulása.

A fehérjék harmadlagos szerkezete. A natív fehérjékben a periodikusan rendezett szakaszok a nem rendezett szakaszokkal váltakoznak, de ezek a peptidlánc-szakaszok sem tekinthetők teljesen rendezetlennek. Csak olyan láncszakaszokat tekintünk rendezetlennek, amelyek a statisztikus valószínűség alapján számos, különféle konformációban

létezhetnek. A periodikusan rendezett szakaszok közötti részek teszik lehetővé, hogy a periodikus szakaszok egymáshoz közel kerüljenek, hogy rendszerint nagyon tömör, háromdimenziós, gombolyagszerű térszerkezet alakuljon ki. A harmadlagos, gombolyagszerű szerkezetet, különösen a globuláris fehérjék belső, hidrofób magjának kialakulását, a nem poláros oldalláncok segítik elő. Ezek egymás közelében igyekeznek elhelyezkedni, létrehozva apoláros kapcsolatokat. A globuláris fehérje belsejében tehát apoláros oldalláncok helyezkednek el, míg a felületet inkább a poláros oldalláncok foglalják el.

A háromdimenziós szerkezetben az egymástól távol lévő aminosav-oldalláncok a lánc összegombolyodása következtében közel kerülhetnek egymáshoz. A hidrofób kölcsönhatásokon kívül kialakulhatnak hidrogénkötések (4.29. ábra) vagy elektrosztatikus kölcsönhatások is. Létrejöhetnek továbbá a ciszteinil-oldalláncok oxidációja következtében másodlagos kovalens kötések, diszulfidhidak. A felsorolt kötéstípusok együttesen biztosítják, hogy a fehérjemolekula harmadlagos szerkezete az adott körülmények között fennmaradjon (4.28. ábra).



4.28. ábra. Kötéstípusok a fehérjeláncok között

Az α -hélix kialakulásának feltétele egy kritikus méret, azaz minimális számú vagy a minimálisnál több aminosavnak együtt kell működni

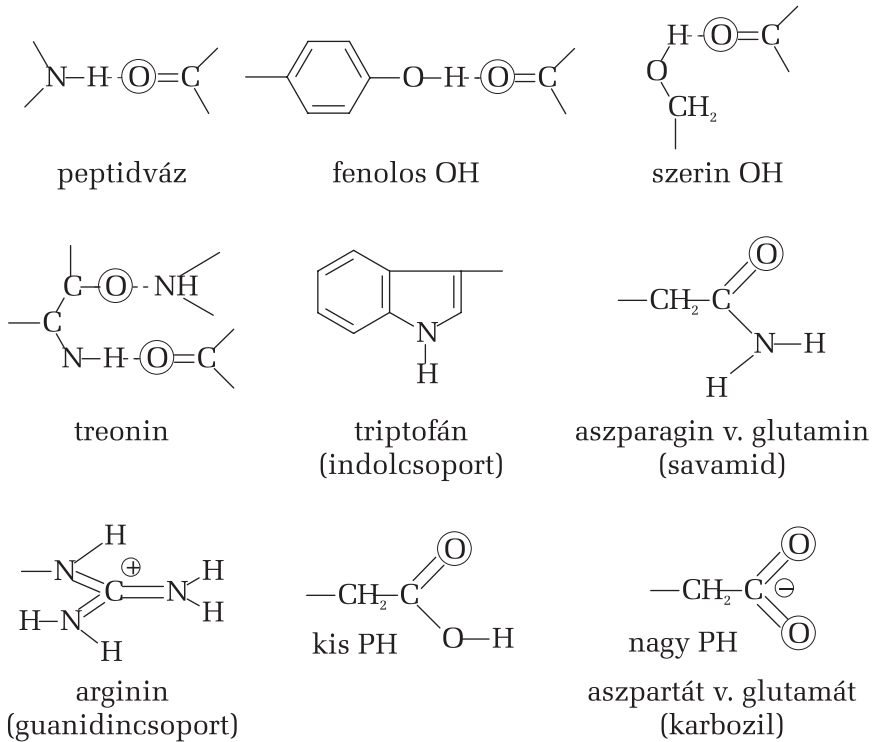
a rendezettség létrejöttéhez. A háromdimenziós szerkezet kialakításához a láncszakaszok közötti szoros kapcsolatok szükségesek. A kötések vagy egyfajta kötéstípus megszüntetése a polipeptidlánc szerkezetének teljes felbomlását, denaturációját okozhatja. Az α -hélix és a β -szerkezet az őket stabilizáló hidrogénkötések nélkül nem létezhetnek, mert a peptidkötések közötti hidrogénhidak energiája valamivel kisebb, mint a vízmolekulák közti hidrogénkötéseké. A víz erősebb hidrogénkötés-képző anyag lévén, a kötések megbonthatnák, hogy ez mégsem történik meg, annak az oka, hogy:

- a molekula belsejében a nempoláros környezetben lévő hidrogénhidak viszonylag stabilak, mert ezekhez nem kerül közel a víz, másrészt
- a hidrogénhidak fenntartása szempontjából jelentékeny a többi kötés energiájának hozzájárulása is.

Funkcionális szempontból jelentős, hogy az egymás közelébe kerülő oldalláncok saját kémiai tulajdonságaikat kölcsönösen megváltoztathatják, és olyan kémiai tulajdonságokat nyerhetnek, amelyek kémiai szerkezetükből nem következnek. Ilyen pl. az, hogy az enzimek egyes oldalláncai a szubsztrátokkal kapcsolatot létesíthetnek, hogy az ellenanyag a specifikus antigénnel kombinálódjon, vagy hogy a receptor a megfelelő szignállal reagáljon.

Az oldalláncok egymással és a vízzel kialakított kölcsönhatásai lehetővé teszik, hogy a fehérjeszintézis során keletkező egydimenziós polipeptidlánc háromdimenziós térszerkezetet alakítson ki. A fehérjék biológiai aktivitással bíró térszerkezetének kialakulásához nem szükséges semmiféle extra információ, mert az aminosavsorrend kellő információt tartalmaz ahhoz, hogy az adott körülmények között a termodinamikailag legstabilabb konformációnak megfelelő térszerkezet alakuljon ki.

Az első fehérje, amelynek térszerkezetét megállapították, a mioglobín volt. A mioglobín egy 152 aminosavból felépülő polipeptidlánc, molekulatömege 16 700; vas-porfirin proszretikus csoportot tartalmaz. A mioglobín polipeptidlánc kb. 70%-ban helikális struktúrájú, a molekula 8 helikális szakaszt tartalmaz. A legrövidebb hélix 7, a leghosszabb 23 aminosavból áll. A molekula igen tömör, ezért belsejében csupán néhány vízmolekula fér el. Az előzőekben elmondottaknak megfelelően a poláros csoportok a molekula felületén, a vizes közeg felé mutatva hidratálva, az apoláros oldalláncok csaknem mindegyike a molekula belsejében hidrofób magot képezve található. A prolin-oldallánc csak a nem



4.29. ábra. A hidrogénkötések előfordulási lehetőségei a fehérjeláncban

helikális kanyarokban található meg, de itt van néhány olyan más aminosav is, amely nem vesz részt a hélix alkotásában (izoleucin, szerin, pH 7-en töltéssel rendelkezők).

A miogloblin szerkezete semmiféle belső szimmetriát nem mutat, ezért a térszerkezet kialakulásakor az aszimmetria mértéke növekszik. A különböző emlősfajokból izolált miogloblinok szerkezete nagyon hasonló egymáshoz, sok tekintetben egyezik a hemoglobinnal. A hem (Fe-porfirin) proszterikus csoport két helikális szakasz által kialakított mélyedésben foglal helyet úgy, hogy a hidrofób része a fehérjemolekulához kapcsolódik, míg a hidrofil része a vizes közeg felé mutat. A közelmúltban megismertük a *citokróm-c*, a *kimotripszin*, a *lizozim* és a *ribonukleáz* térszerkezetét. A különböző fehérjékben a rendezett és a rendezetlen szerkezetű részek aránya igen különböző, bár általánosan megfigyelhető, hogy a molekulák igen tömörek, a hidrofób oldalláncok

a molekula belsejében, a hidrofilek pedig a molekula felületén helyezkednek el.

A molekulák azon területén, amely a fehérje funkciója szempontjából jelentős oldalláncokat és funkciós csoportokat hordoz, mélyedés, zsebszerű forma alakul ki. A globuláris fehérjéket a szerkezetüket kialakító periodikus elemek jelenléte alapján öt nagyobb csoportba sorolhatjuk:

- zömében α -hélix tartalmú globinok,
- periodikus rendezettségként nagy mennyiségben csak β -szerkezetet tartalmazók,
- $\alpha - +\beta$ -szerkezetet is tartalmazók, de a két szerkezet egymástól elválasztva található,
- α/β -szerkezetűnek tekintjük azokat, ahol a kétféle periodikus szerkezet váltakozva fordul elő,
- a viszonylag sok diszulfidkötést tartalmazó fehérjékben a periodikus rendezettség kevés vagy esetleg teljesen hiányzik.

A fehérjék negyedleges szerkezete. A polipeptidlánc szintézise után a fehérjéknek csak kis része marad meg egy polipeptidláncból álló monomerként, nagyobb részük több, rendszerint páros számú polipeptidláncból álló egységgé asszociál, azaz dimerek, tetramerek keletkeznek. Az asszociálódó polipeptidláncok azonos vagy eltérő kémiai felépítésűek lehetnek. A négy azonos alegységből felépülő *glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz* α_4 , a két-két azonos láncból álló hemoglobin $\alpha_2\beta_2$ -szerkezetű. A negyedleges szerkezet kialakulásának több lehetősége ismeretes:

- Kémiaailag és funkcionálisan is azonos polipeptidláncok asszociálódnak.
- Funkcionálisan azonos, de kémiaailag különböző polipeptidláncok kapcsolódnak. Enzimek esetében nem ritka, hogy többféle kémiai felépítésű alakjuk létezik, amelyeket izoenzimeknek hívunk. A *tejsavdehidrogenáz* kétféle polipeptidláncból ötfajta kombinációban kapcsolódhat: α_4 ; $\alpha_3\beta_1$; $\alpha_2\beta_2$; $\alpha_1\beta_3$ és β_4 .
- Funkcionálisan és kémiaailag is különböző láncok kapcsolódnak a regulációs enzimek egyik csoportjában. Gyakori pl., hogy az egyik peptidlánc katalitikus, a másik regulációs tulajdonságú. A kétfajta lánc kapcsolódásakor az enzim rendszerint inaktív; ha a regulációs rész disszociál, az enzim aktívvá válik.

- Többféle felépítésű és többféle funkciójú peptidláncból alakulnak ki az enzimkomplexek. A *piruvát-dehidrogenáz* enzim 3–5 különböző funkciót lát el; mintegy 60 polipeptidláncból áll.

A fehérjék negyedleges szerkezetének kialakulása ugyancsak azok önrendező tulajdonságaival függ össze. Ha a polipeptidláncok közötti kapcsolatot megszüntetjük, az oligomer monomerekre disszociál, *a disszociációt előidéző hatás megszüntetése után viszont az eredeti negyedleges szerkezet és funkcionális tulajdonságok helyreállhatnak*. Ezt az teszi lehetővé, hogy a láncok szerkezeti tulajdonságai egymást kiegészítik, azaz a kapcsolódó felületek komplementerek. A kapcsolódó felület és töltésmintázat a másikkal kiegészül, pl. pozitív töltésű csoporttal szemben a partneren negatív csoport van, a hidrofíllal szemben hidrofíll van. A komplementaritást biztosítja, hogy a polipeptidláncok más, eltérő polipeptidlánccal nem alkotnak stabilis oligomert, mert komplementer felületük nem teszi lehetővé az idegen felismerését. *A negyedleges szerkezetet alegységek alakítják ki*. Alegységnek tekinthető egy-egy polipeptidlánc akkor is, ha néhány polipeptidláncból alakul ki a funkcionális egységet mutató molekula. Más esetben azonos vagy különböző polipeptidláncokból olyan funkcionális alegységek keletkezhetnek, amelyek aggregációval milliós molekulatömegű vagy annál nagyobb egységekké rendeződhetnek. Az oligomerekben a polipeptidláncok egymással nem kovalens kölcsönhatások útján kapcsolódnak. A polipeptidláncok diszulfidkötéssel kapcsolódnak össze a két „könnyű” és a két „nehéz” láncból felépülő γ -globulinokban, vagy a háromszor két azonos polipeptidláncból kialakult fibrinogénben. Az ilyen molekulákat monomereknek tekintjük, mert a láncok közötti kapcsolatot csak a kovalens diszulfidkötések hasítása útján szüntethetjük meg.

A negyedleges szerkezet a fehérje magasabb rendű szerveztségének kialakulását jelenti. A polipeptidláncok közötti kölcsönhatások révén *kialakulnak a fehérje funkcionális tulajdonságai, és lehetővé válik a molekuláris szintű szabályozás*.

A fehérjék molekulatömege. Az előző fejezetek alapján világossá válik, hogy a fehérjemolekula fogalma nehezen definiálható. Egyszerű a probléma, ha a fehérje csak egy polipeptidláncból áll, de bonyolultabb a helyzet az oligomer felépítésű fehérjéknél. Ezen utóbbiak többsége neutrális pH-n, kis ionerősség mellett egységes molekulának mutatkozik, a körülmények megváltozása esetén azonban (alacsony vagy magas pH-n,

tömény karbamid, detergenssek) kisebb egységekre disszociál. A molekulatömeg meghatározásának többféle módszere ismert:

- Felhasználhatók kémiai eljárások akkor, ha a fehérje nemfehérje komponenszt (fématom, prosztetikus csoport, koenzim) is tartalmaz. Ilyenkor a nemfehérje komponens százalékos mennyiségéből számítható a fehérje molekulatömege.
- Meghatározható a molekulatömeg ultracentrifugálással, a fehérje ülepedése alapján. Analitikai ultracentrifuga segítségével a szedimentációs egyensúly, illetve az egyensúly elérésének sebessége alapján következtethetünk a molekulatömegre.
- Viszonylag új módszer a molekulaszűrőkön végzett gélfiltrálással való molekulatömeg-meghatározás.

A fehérjék molekulatömegét az M_r relatív molekulatömeg-értékkel jellemezzük, amely viszonzyszám, ezért dimenziómentes. Azt jelenti, hogy az illető fehérje tömege hányszorosa a molekulatömeg-számítás alapját képező ^{12}C tömege $1/12$ -ed részének. Az ismertetett módszerek csak hozzávetőleges eredményt adnak a fehérjemolekulák tömegére. Pontos értéket csak akkor kaphatunk, ha megismerjük a fehérje aminosavsorrendjét, és az aminosavak molekulatömegének segítségével kiszámoljuk a fehérje pontos M_r -értékét.

A fehérjék oldhatósága. Az egyes fehérjék oldhatóságában jelentős eltérések mutatkoznak, amelyek egyrészt a hidofil és a hidrofób csoportok eltérő számából és térbeli elrendeződéséből, másrészt a molekula nagyságából, alakjából és az oldószer minőségéből adódnak. Az oldhatóság alapján megkülönböztetünk oldódó és nem oldódó, csak duzzadó fehérjéket. A *fehérjék csak poláros oldószerekben oldódnak*, mint pl. a víz, a glicerin, a hangyasav. Az oldódás azáltal következik be, hogy az oldószer-molekula jellegzetes kölcsönhatást alakít ki a fehérjével. Ehhez az szükséges, hogy kellő számú poláros csoport legyen a fehérjemolekulában; a molekulában lévő diszulfidhidak viszont az oldhatóságot jelentős mértékben csökkentik, ami magyarázza, hogy miért nem oldódnak a viszonylag nagy kéntartalmú fehérjék. Duzzadási folyamat indulhat meg olyan fehérjéknél, amelyekben sok szabad karboxil- és aminocsoport található, ezekhez ugyanis a poláros oldószerek elektrosztatikus kötőerőkkel kapcsolódhatnak. Az *oldószer ionerősségének növelésével az oldhatóság nő*. Semleges sók kis koncentrációban növelik az oldhatóságot, azonban egy meghatározott koncentráción túl az oldhatóság csökken, és bekövetkezhethet a fehérje kicsapódása. A *fehérje*

oldhatósága azonos pH és ionerősség mellett 0–40 °C közötti tartományban *a hőmérséklet emelkedésével nő*. Ha 40 °C felett a másodlagos és harmadlagos szerkezetet tartó erők szétesnek, denaturálódás következik be, ami aggregációval folytatódhat; ez a fehérjék oldhatóságát csökkenti.

A fehérjék *elektrokémiai tulajdonságait* a felépítő aminosavak hasonló karaktere határozza meg, ezért a fehérjék amfoter jellegűek. Polionoknak tekinthetők, amelyek töltésjellegét és mennyiségét a rendszer pH-ja jelentősen befolyásolja. *Izoelektromos pontnak* azt a pH-t nevezzük, ahol a pozitív és negatív töltések száma azonos, tehát a fehérje semleges molekulának tekinthető. Ezen a pH-n a fehérjék elektromos erőterében sem a pozitív, sem a negatív pólus felé nem mozdulnak el. *Izoionos pontnak* nevezzük azt a pH-értéket, amelyen a fehérjében lévő bázikus csoportokon felvett protonok száma megegyezik a savas csoportokon leadott protonok számával. Az izoelektromos ponton a legkisebb a fehérje oldhatósága, legnagyobb a kicsapódási hajlama, a kisózódási és a kristályosodási lehetősége. A fehérjék viszkozitása az izoelektromos ponton a legkisebb.

A fehérjék vizes oldatban általában balra *forgatják a poláros fény síkját*, a forgatás értéke -30° és -60° között mozog. A forgatást befolyásolja a fehérjemolekula szerkezete, az aminosav-maradékok jellege és helye a molekulában, a molekulákban fellépő kölcsönhatások és a pH. A fehérjék denaturálódása jelentősen megnöveli a fajlagos forgatás értékét ($-80^\circ - -120^\circ$).

A fehérjék oldataikban az ultraiobolya tartományban *fényabszorpciót mutatnak*. A peptidkötések jelenlétéből adódóan jellegzetes fényelnyelés mérhető a 180–230 nm tartományban, míg a fehérjékben lévő aromás aminosavak a 250–300 nm között adnak fényelnyelési maximumot.

A fehérjék térfogata és térfogattömege az alkotó atomok térfogatainak összeadásával becsülhető. A térfogattömeg $0,8-1,5 \text{ g/cm}^3$ között változik. Azon fehérjék *kristályosodási hajlama* nagy, amelyek gömb vagy ellipszoid alakúak, azaz nagyfokú rendezettséget mutatnak. Egyes hemoglobinek 0°C -ra lehűtve már a vörösvértestekben is kikristályosodnak.

4.3.2. A fehérjék kémiai reakciói, kapcsolódásai

Csapadékképző reakciók. A fehérjék oldataikból szerves oldószerrel, nehézfém sókkal, ásványi és bizonyos szerves savakkal kicsapathatók. A szerves oldószerek közül a legjobb fehérjekicsapó az acetone, a dioxán és az etil-alkohol. A nehézfém sók közül kicsapják a fehérjét

az ólom-, a réz-, a higany-, az urán-, a vas- és a cinksók. Az ásványi savak mind alkalmasak a fehérje kicsapására, közülük leggyakrabban a sósav, a salétromsavat és a foszforsavat használják erre a célra. A szerves savak közül kiváló fehérjekicsapó a triklór-ecetsav, a szulfoszalicilsav és a pikrinsav.

A fehérjék színreakciói. A fehérjék számos színreakciója egy meghatározott aminosav jelenlétére vezethető vissza. E színreakciók közül több felhasználható a fehérjék mennyiségi, illetve minőségi meghatározására. A legfontosabb színreakciók az alábbiak:

Biuret-reakció során a lúgos fehérjeoldat réz-szulfát-oldattal ibolyás elszíneződést mutat. A *ninhidrin* a fehérjével kékesibolya elszíneződést ad. A *xantoprotein-reakció* során az aromás aminosavakat tartalmazó fehérjék sárga elszíneződést mutatnak tömény salétromsav hatására. A sárga nitroszarmazékok ammónia hatására narancssárga színű vegyületekké alakulnak. Az *ólom-szulfid-reakció* során, ha a fehérjeoldatot lúggal főzzük, a kéntartalmú aminosavak felbomlanak, és ólomsó hozzáadására barnásfekete színű ólom-szulfid csapadék keletkezik. A fehérjeoldatot *Millon-reagenssel* forralva (nitrittartalmú salétromsavas higany-nitrát) a tirozin oxidálódik, és rózsaszín csapadék válik le az oldatból. A *Pauly-reakció* során tirozin- és hisztidintartalmú fehérjeoldatokban diazotál-szulfanilsav hatására cseresznyepiros elszíneződés mutatkozik. A *Sakaguchi-reakcióban* arginintartalmú fehérjeoldathoz α -naftolt és hipobromitot adva vöröses elszíneződés keletkezik.

Fehérje-víz kapcsolódások. A víz különböző állapotban tud a fehérjékkel kapcsolódni. A szerkezeti és a fehérje belsejében lévő víz vagy a felületen erősen abszorbeált, vagy a fehérje speciális felületi helyein kötött vizet jelenti, amely 0,3 g lehet 1 g vízmentes fehérjére számolva. A fehérjék a vízzel a peptidkötéseken keresztül (dipól-dipól kölcsönhatás vagy hidrogénkötés), vagy az aminosav-oldalláncokon keresztül (ionizált, poláros, esetleg nempoláros csoportokkal) kötődnek. A fehérje feloldódásához olyan állapotba kell kerülnie, hogy szoros kapcsolatot tudjon létrehozni az oldószerrel. *Az oldhatóságot a pH, az ionerősség, az oldószer és a hőmérséklet befolyásolja.* Az izoelektromos ponttól eltérő pH-n a fehérjék pozitív, illetve negatív töltéseket hordoznak, amelyek elősegítik a vízmolekulákhoz való kapcsolódásukat, tehát az oldhatóság nő. Semleges sók ionjai 0,5–1,0 mólos oldatokban növelni tudják a fehérjék oldhatóságát, mivel az ionok a fehérjékkel reagálnak, és csökkentik

a szomszédos molekulák ellentétes töltéseinek vonzó hatását. Ha a sókoncentráció 1 mólnál nagyobb, az oldhatóság csökken, mert a só oldódásához, a solvatációhoz vízmolekulákra van szükség. Így fehérje–fehérje kapcsolódások jönnek létre, amelyek nagyobb aggregátumok kialakulásához vezetnek, ami végső soron a fehérje kicsapódását eredményezi. Nem vizes oldószerek (etil-alkohol, metil-alkohol, aceton) a víz dielektromos állandójának csökkentésével csökkentik a vízoldhatóságot.

Fehérje–lipid kapcsolódások. A fehérjék és a lipidek közötti kapcsolódás igen gyakori az élővilágban (pl. a fehérjék és a foszfolipidek között). A fehérje és a lipid viszonylagos aránya széles határok közt változhat. A kapcsolódás általában hidrofób kölcsönhatásokkal jön létre, amikor az apoláros alifás lipidlánc és a fehérje apoláros részei között alakul ki kapcsolat. *A fehérje–lipid kapcsolódás védi a fehérjét a hődenaturációtól*, egyrészt a lipid nagy hőkapacitása, másrészt a víz relatív távolléte miatt.

4.3.3. A fehérjék denaturálódása

A denaturálódáson a fehérje natív szerkezetének reverzibilis vagy irreverzibilis változását értjük, amely változatlanul hagyja a peptidkötéseket, de a diszulfidhidak felszakadása előfordulhat. Denaturálódást okoz minden olyan behatás, amely a hidrogénhíd, az ionkötés vagy a hidrofób kötés felbomlását idézi elő. A denaturáció megváltoztatja a fehérje tulajdonságait:

- csökken az oldékonyság,
- megváltozik a vízkötő kapacitás,
- elvész a biológiai aktivitás,
- megnövekszik az érzékenység a fehérjebontó enzimekkel szemben,
- növekszik a belső viszkozitás, megszűnik a kristályosodási készség.

A denaturációt előidéző fizikai módszerek. A fehérjék *hő hatására* bekövetkező denaturálódására több tényező van befolyással: a fehérje sajátságai, a fehérje koncentrációja, vízaktivitása, a pH, az ionerősség és a jelen lévő ionok minősége. A fehérjék sokkal ellenállóbbak a hődenaturációval szemben száraz állapotban. Hőhatásra kémiai átalakulások is végbemehetnek a fehérjét felépítő aminosavakban, melynek során

a diszulfidhidak felhasadására szulfhidrilcsoportok keletkezhetnek, a glutamin és az aszparagin dezaminálódhat, a szerin dehidratálódhat, amely átalakulások jelentős befolyással vannak a fehérjék funkcionális és táplálkozásbiológiai tulajdonságaira. A fehérjék *lehűtés hatására* is denaturálódhatnak; kis hőmérsékleten, de leginkább fagyasztás hatására aggregálódhatnak, majd kicsapódnak. Bizonyos *mechanikai behatások* (kenyér dagasztása, tojásfehérje felferése) denaturálódást idézhetnek elő, amely behatás során elsősorban az α -hélix szerkezet megy tönkre. Denaturálódást idézhet elő az 50 kPa feletti *hidrosztatikus nyomás* is. Az *ultraibolya sugárzás* energiája elég nagy ahhoz, hogy a diszulfidhidak felhasadásával konformációváltozás következhesen be. A γ -sugárzás és más ionizáló sugárzás szintén szerkezetváltozást okoz, miközben az aminosav-oldalláncok oxidálódhatnak, a kovalens kötések felhasadhatnak, szabad gyökök keletkezhetnek és polimerizációs reakciók játszódhatnak le. A fehérjemolekulák rendszerint irreverzibilis denaturálódást szenvednek a víz–levegő, a víz–nemvizes folyadékfázis vagy a víz–szilárd felületeken.

A denaturációt előidéző kémiai anyagok. A *savak* és *lúgok* szélsőségesen savas vagy lúgos pH-n a fehérjéket denaturálják. Hatásukra a disszociált csoportok visszaszorulnak a molekulán belül, ami a molekula kinyúlását eredményezi. A *réz*, a *vas*, a *higany* és az *ezüst* könnyen reagál a fehérjék tiolcsoportjával, komplexeket képezve, melynek során a fehérje kicsapódik. A *szerves oldószerek* legnagyobb része ugyancsak denaturáló hatású, mert az apoláros szerves oldószer-molekulák be tudnak hatolni a molekula hidrofób részeinek belsejébe, széttörve ezzel a hidrofób kötésekkel, aminek eredményeként denaturáció jön létre.

4.3.4. A fehérjék funkcionális tulajdonságai

A fehérjék funkcionális tulajdonságait azok a fizikai-kémiai tulajdonságok adják, amelyek hozzájárulnak az élelmiszerek megfelelő jellemzőinek kialakításához. A funkcionális tulajdonságoknak három fő csoportja van: hidratációs tulajdonságok, fehérje–fehérje kapcsolódások és felületi tulajdonságok. Az első csoportba olyan tulajdonságok tartoznak, mint a vízadszorpció és a vízvisszatartó képesség, a nedvesedés, a duzzadás, az adhéziós kapcsolódás, a diszpergálhatóság, az oldhatóság és a viszkozitás. A második csoportba azok a tulajdonságok tartoznak, amelyek bizonyos szerkezetek létrejötténél és stabilizálásánál fontosak

(gélképződés, tésztaszervezet kialakulása, szálas szerkezet). A harmadik csoport tulajdonságai a felületi feszültség, az emulzióképződés és a fehérjék habképző tulajdonságainak kialakításában játszanak szerepet.

Hidratációs tulajdonságok. Az élelmiszer-fehérjék hidratációs-rehidratációs tulajdonságainak nagy jelentősége van a gyakorlatban, mivel a száraz fehérjekoncentrátumokat és -izolátumokat felhasználáskor hidratálni kell. A száraz fehérje és a víz kapcsolódása során első lépésben a vízmolekulák adszorbeálódnak a fehérje poláros csoportjain, majd többrétegű adszorpciós vízréteg alakul ki a fehérje körül. A folyékonyvíz-kondenzációt követően a fehérje megduzzad, oldhatatlan részei duzzadt állapotban maradnak, oldható részei pedig a szolvatációs diszperziót követően oldatba mennek.

Oldhatóság. A fehérjék oldhatóságát egyrészt befolyásolja maga a fehérje, másrészt a koncentrációja, valamint a pH, az ionerősség és a hőmérséklet. Gyakorlati szempontból rendkívül fontos a fehérje oldhatóságát befolyásoló tényezők ismerete a fehérjék kinyerésénél és tisztításánál. A különböző körülmények között mutakozó oldhatóság felvilágosítást ad a fehérjék felhasználásának lehetőségeiről. Az oldhatatlanság mértéke a legjobb jellemzője a fehérjedenaturációnak és -aggregációnak. Azok a fehérjék, amelyek könnyen denaturálódnak vagy aggregálódnak, igen rossz gél-, emulzió- vagy habképző tulajdonságot mutatnak. Hőkezelés hatására a legtöbb fehérje oldhatósága csökken. Egészen enyhe hőkezelésnél is megindul a fehérjedenaturáció, amely maga után vonja az oldhatatlanság növekedését.

Viszkózitás. A viszkózitást, azaz a fehérjeoldatnak a folyással szemben kifejtett ellenállását leginkább a diszperz molekulák vagy részecskék látszólagos átmérője befolyásolja. A fehérjeoldatok viszkózitása függ:

- a fehérjemolekula tulajdonságaitól (molekulatömeg, méret, térfogat, szerkezet, aszimmetria, elektromos töltés) és a külső tényezőktől (pH, ionerősség, hőmérséklet),
- a fehérje–oldószer kapcsolatuktól, amelyek a duzzadást, oldhatóságot és a molekulát körülvevő hidratációs szféra állapotát befolyásolják,
- a fehérje–fehérje kapcsolódásoktól, amelyek meghatározzák az aggregátumok nagyságát.

A fehérjerendszerek konzisztenciája, viszkozitása igen fontos funkcionális tulajdonság több élelmiszer (italok, levesek, krémek, mártások) esetében, és az egyes technológiai műveletek (szivattyúzás, keverés, melegítés, hűtés, porlasztva szárítás) optimalizálásánál is szükséges ismeretük.

A gélképződés. Gélesedésnek hívjuk azt a folyamatot, amikor a fehérjék összetömörülnek és rendezett térhálós szerkezetet hoznak létre. A gélképződésnek számos élelmiszer előállításánál van meghatározó szerepe (egyes tejtermékek, koagulált tojásfehérje, zselatingél, számos hús- és halkészítmény).

A *texturálás* során a molekulák közötti és a molekulán belüli kölcsönhatások megszűnnek, majd új kapcsolódások jönnek létre, amelyek stabilizálják a szerkezetet. Ezt a hatást két úton lehet elérni:

- a fehérjét feloldjuk, majd fonófejen keresztül kicsapófürdőbe nyomjuk, amit szálképzési eljárásnak hívunk,
- az adott fehérjékben nedves állapotban, nagy nyomáson és hőmérsékleten nyírófeszültséget hozunk létre, amely műveletet extrúziós eljárásnak nevezünk.

Jelenleg leginkább az extrúziós eljárás használatos texturálásra. Ezzel az eljárással száraz, szálás vagy szálszerű anyagok, porózus granulátumok nyerhetők, amelyek rehidratálással gumiszerű szerkezetté alakíthatók.

Emulgeálóképesség. Az élelmiszer-emulziók jelentős részénél a fehérjéknek stabilizáló szerepük van. A tejben pl. a zsírcseppecskék felületén többrétegű fehérjemembrán akadályozza meg azok összefolyását. A zsírgolyócskában a triglicerideket foszfolipidek, lipoproteinek, vízoldható albuminok és globulinok veszik körül, amelyek adszorbeálni tudják felületükön a stabilizációhoz szükséges vízmolekulákat. A fehérjék az ilyen, *olaj a vízben* típusú emulziókat jól stabilizálják. Emulzió-stabilizáló képességük azonban a *víz az olajban* emulzióknál gyenge. *Emulziókapacitás*on azt az olajmennyiséget értjük cm^3 -ben kifejezve, amelyet a fehérje egységnyi mennyisége (g) fázismegfordulás nélkül emulgeálni képes.

Habképző tulajdonságok. Az élelmiszerhabok gázbuborék-diszperziók folytonos folyadék- vagy félszilárd hártýákba ágyazva. A hártýák

rugalmasságát és mechanikai ellenálló képességét a bennük lévő felületaktív anyagok, többek között a fehérjék biztosítják. A fehérjéknek a hab stabilizálásakor a gáz/víz fázis felületéhez kell diffundálniuk, ott ki kell egyenesedniük, szét kell terjedniük, hogy a felületi feszültséget csökkentsék. A legjobb habképző fehérjék a tojásfehérje fehérjéi, a hemoglobin globinrésze, a marha-szérumalbumin, a zselatin, a savófehérjék, a kazein, a búzafehérjék közül a gluteninek, a szójafehérjék és egyes fehérjehidrolizátumok.

4.3.5. A fehérjék csoportosítása

A fehérjék klasszikus felosztása *Osborne* nevéhez fűződik, aki a fehérjéket oldhatóságuk alapján csoportosította. Csoportosíthatjuk a fehérjéket *kémiai összetételük alapján* is; ezek szerint egyszerű fehérjének nevezzük azokat a fehérjéket, amelyeknek savas vagy enzimes hidrolizátumában csak aminosavak találhatók, összetett fehérjék pedig azok, amelyek hidrolizátuma az aminosavak mellett más anyagokat is tartalmaz.

Az egyszerű fehérjék lehetnek:

- protaminok,
- hisztonok,
- albuminok,
- globulinok,
- prolaminok,
- glutelinek,
- vázfehérjék.

Az összetett fehérjék a prosztetikus csoport szerint lehetnek:

- foszfoproteinek,
- mukoproteinek,
- kromoproteinek,
- nukleoproteinek,
- lipoproteinek.

Egyszerű fehérjék

A *protaminok* egyes halak spermájában fordulnak elő, molekulatömegük 6000 dalton körüli. Nagy mennyiségben tartalmaznak bázikus aminosavakat. Vannak csak arginint tartalmazó protaminok, az arginin mellett hisztidint vagy lizint tartalmazók, és olyanok, amelyek arginint,

lizint és hisztidint is tartalmaznak. A fehérje nitrogéntartalma a bázikus aminosavaknak köszönhetően 18–25% között van. Bázikus karakterüknek megfelelően izoelektromos pontjuk $\text{pH}=10\text{--}12$ között váltakozik. Ként egyáltalán nem tartalmaznak, és a fehérjében aromás aminosav sem található. Mérsékelten oldódnak ammóniában és vízben. Ismertebb fehérje a *szalmin*, amely a lazacban és a *klupein*, amely a heringben fordul elő. Mindkét fehérje arginintartalma 80–85%. A *hisztonok* bázikus karakterű fehérjék, triptofánt egyáltalán nem, és cisztint is csak kis mennyiségben tartalmaznak, vízben és híg savakban oldódnak, nukleoproteinek formájában nukleinsavakhoz kapcsolódnak. Valószínűleg a gének specifikus csoportjainak tevékenységét képesek gátolni. Molekulatömegük nagy, izoelektromos pontjuk a bázikus tartományban $\text{pH}=10\text{--}11$ között van. A hisztonok közül legismertebb a *globin*, amelynek kristályos alakját több mint 110 éve állították elő hemoglobinból.

Az *albuminok* desztillált vízben és híg sóoldatban oldhatók, ammónium-szulfát telített oldatából kicsapódnak. Igen elterjedtek mind állati, mind növényi szervezetekben (vérben, nyirokrendszerben, izomban, tojásban, tejben, hüvelyesekben, gabonafélék magjaiban). Az albuminok csaknem valamennyi fehérjealkotó aminosavat tartalmazzák. Izoelektromos pontjuk $\text{pH}=4\text{--}5$ körül van. A *globulinok* az albuminokkal általában együtt fordulnak elő, szétválasztásuk a molekulatömeg alapján lehetséges. A globulinok nagyobb molekulatömegük révén oldataikból semleges sókkal könnyen kisózhatók, s a csapadék eltávolítása után az oldatban az albuminok maradnak vissza. A globulinok híg sóoldatokban, egyesek desztillált vízben is oldódnak. Ez utóbbiakat pseudo- (ál)globulinoknak nevezték el, szemben az eredeti, híg sóoldatban oldódó eu- (valódi) globulinokkal. Ismertebb globulin a *fibrinogén* a vérplazmában, a *fazeolin* a babban, az *amandin* a mandulában, az *ovoglobulin* és a *lizozim* a tojásfehérjében, a *livetin* a tojássárgájában, a *legumin* és a *vicilin* a borsóban, a *miozin* az izomban és a β -*laktoglobulin* a tejben.

A *prolaminok* etil-alkoholban, fenolban, p-krezolban oldódnak. Aminosav-összetételükre jellemző a prolin és a glutaminsav nagy koncentrációja, lizint nem tartalmaznak. A *gliadin* a gluteninrel együtt képezi a sikér (glutén) komplex fehérjéjét, amely a búzatészta előállításának kulcsfehérjeje. Az árpában a *hordein*, a kukoricában a *zein* található. A *glutelinek* jellegzetes növényi fehérjék, amelyek a magvakban fordulnak elő. Jól oldódnak híg savakban és híg lúgokban, de semleges

sóoldatokban oldhatatlanok. Aminosav-összetételükben dominál az arginin, a prolin és a glutaminsav. Ismertebbek: a búzában a *glutenin*, a rozsban a *hordenin*, a rizsben az *orizenin* és a kukoricában a *zeanin*.

A *vázfehérjék* a támasztó- és kötőszövetekben fordulnak elő. Feladatuk a szilárdítás, ezért nehezen oldódnak oldószerekben, és az enzimhatással szemben is igen ellenállóak. Megtalálhatók a bőrben, a szőrben, a tollban, a körömben, a csontokban, a selyemben, a szivacsfélékben. A *keratinok* és a *kollagének* csoportjára oszthatók. A keratinokat oldhatóságuk alapján feloszthatjuk eukeratinokra, amelyek oldhatatlanok oldószerekben, és nagy mennyiségben tartalmaznak cisztint; a *tripszin* és a *pepszin* sem képes lebontani őket. A pszeudokeratinok jobban oldódnak, és az enzimek is képesek megtámadni őket. Cisztintartalmuk lényegesen kisebb az eukeratinokénál. Ide tartoznak az idegyszövet keratinjai. A kollagének a bőrben, a kötőszövetekben és a csontokban találhatóak. Vízen nem oldódnak, de pH=3–4 között különböző pufferekben feloldhatók. Hosszabb ideig főzve zselatinná alakulnak, aminosav-összetételükre jellemző a glicin, az alanin, a prolin és a hidroxiprolin nagy koncentrációja. A zselatinnak jelentős szerepe van az élelmiszer-gélek előállításánál. Az *elasztin* ínszövetekben és érfalakban fordul elő. A *fibroin* és a *szericin* a selyem jellegzetes fehérjéje. A *spongin* a szivacsfélékből izolálható. Ezekre a fehérjékre jellemző a sok glicin és alanin mellett a szerin, valamint a tirozin nagy koncentrációja.

Összetett fehérjék

A *foszfoproteinek* nemfehérje része, az ortofoszforsav, észterkötésen keresztül kapcsolódik a fehérjéhez a szerin vagy a treonin alkohol hidroxilcsoportján keresztül. Sóoldatokban jól oldódnak. Ismertebb foszfoproteinek a tojássárgájában található *vitellin* és *foszvitin*, továbbá a tej jellegzetes fehérjéje, a *kazein*. Ezek a fehérjék kalciumsóik formájában léteznek, feladatuk az embrió, illetve a fiatal szervezet táplálása. A *mukoproteinek* nemfehérje része szénhidrát. A mukoidok 4%-nál több, a glikoproteinek 4%-nál kevesebb hexóزامint tartalmaznak. A mukopoliszacharidok savas karakterű vegyületek (kondroitinkénsav, hialuronsav, heparin). A mukoproteinek nagy része a szervezetben kenőanyagként szerepel; feladatuk a felület (nyelv, orr, gyomor, ízület) védelme a kémiai, mechanikai és fertőző hatásokkal szemben. A *kromoproteinek* fémet nem tartalmazó és fémtartalmú vegyületekre oszthatók. A fémet nem tartalmazó kromoproteinek képviselője a *rodopszin*,

amely a látás alapvegyülete. Nemfehérje része karotinoid típusú vegyület. A sárga színű flavinenzimek nemfehérje része az izoalloxazin vázú *riboflavin*. A fémtartalmú kromoproteinek csoportjába tartozik a vér színezőanyaga, a *hemoglobin*. Legfontosabb funkciója a belső szöveti részek oxigénellátása. Prosztetikus csoportja a hem, amelyben a Fe(II)-ion két fő vegyértékével a hemet alkotó két pirrol-nitrogénhez, két koordinációs kötéssel pedig a másik két pirrol-nitrogénhez kapcsolódik. Az izom színezőanyaga a *mioglobin*, amelynek prosztetikus csoportja egy Fe(II)-porfirinból áll. A *kloroplasztin* a zöld növények színanyaga, prosztetikus csoportja a forbinváz, amelyben magnéziumatom található. A *ferritin* a gerincesek májában és lépében kimutatható Fe(III)-iont tartalmazó fehérje. A *hemokupreinben* és a *hemocianinban* Cu(II)-ion fordul elő; oxidált formában kék, redukált formában sárga színűek. A *citokróm* enzimek oxidációs-redukációs állapotuktól függően Fe(II)-, illetve Fe(III)-iont tartalmazó, a biológiai oxidációs folyamatokat szabályozó enzimrendszerek. A *kromoproteinek* molekulatömege igen tág határok között változik a citokróm-*c* enzim 12 ezer dalton értékétől a meocianin milliós nagyságrendjéig.

A *nukleoproteinek* a nukleinsavaknak hisztonokkal, protaminokkal vagy más fehérjékkel képzett, sószerű vegyületei. A citoplazmában és a sejtmagban fordulnak elő; a kromoszóma fő alkotóelemei. A vegyületek prosztetikus csoportjai nukleinsavakból állnak, amelyeket más néven polinukleotidoknak is hívunk. A nukleoproteinek vizes sóoldatokban kismértékben oldódnak. Gyenge savakkal könnyen kicsaphatók, könnyen disszociálnak, és hő hatására denaturálódnak. Savakkal vagy enzimekkel könnyen hidrolizálhatók.

A *lipoproteinek* olyan, összetett fehérjék, amelyeknek prosztetikus csoportja a lipidekhez tartozik. Oldhatóságuk alapján megkülönböztetünk zsírolldható lipoproteineket, amelyek zsírokban, olajokban és zsírolldószerekben jól oldhatók, valamint vízzoldható lipoproteineket, amelyek hidofil tulajdonságokkal rendelkeznek. Az oldhatóságban mutatkozó eltérés a két összetevő térbeli elhelyezkedésével magyarázható; ha a fehérje a molekula külső részén helyezkedik el, akkor ez hidofil karaktert ad a lipoproteinnek, amely vízben oldódni fog. Amennyiben a molekula felszínén a lipidkomponens helyezkedik el, a lipofil tulajdonság lesz jellemző a lipoproteinre, és a molekula zsírolldhatóvá válik. A vízzoldható lipoproteinek segítségével a vízben egyébként nem oldódó lipidek a tápcsatornából képesek felszívódni, és a vér- vagy nyirokáram segítségével a különböző szövetekbe eljutni. A lipoproteinek lipidkomponense

könnyen eltávolítható a molekulából, a prosztetikus csoport lehet glicerid, foszfatid, karotinoid vagy más lipidvegyület.

A lipovitellinben főként a *lecitin* és a *kefalin* fordul elő. A vérszérum α_1 -lipoproteinjében 30–40%-ban található glicerid, foszfatid és koleszterin. A β_1 -lipoprotein viszont 75%-ban tartalmaz gliceridet, koleszterint és foszfatidot.

4.3.6. Fontosabb természetes fehérjék

A fehérjék eredetét vagy funkcióit tekintve a fontosabb természetes fehérjéket az alábbiak szerint csoportosíthatjuk: izomfehérjék, plazmafehérjék, légzőfehérjék, tejfehérjék, tojásfehérjék, szkleroproteinek, protaminok, hisztonok, növényi fehérjék és toxikus fehérjék.

Az *izomfehérjéket* szarkoplazma fehérjékre és fibrillafehérjékre oszthatjuk. A szarkoplazma fehérjék közül legjelentősebb a *miogén*, amely albumin jellegű tulajdonságokkal rendelkezik. A fibrillafehérjék közé tartozik a *miozin*, az *aktin* és az *aktomiozin*. A miozin három polipeptidláncból álló, globulin típusú fehérje, amelyben a fehérjeláncok α -hélixet alkotnak. Az aktin vízben jól oldódó fehérje. Az aktomiozin a miozin és az aktin 3:1 arányban való összekeverésével jön létre, amelyből vízben vékony szálak válnak ki. A vérplazmában mintegy 6,5–6,8% fehérje van.

A *plazmafehérjék* közé tartoznak az *albumin*, a fibrinogén, az α -, a β - és a γ -globulinok. A 65 ezer molekulatömegű albumin perhangyasavas oxidációval 32 ezer dalton nagyságú alapegységekre hasad. A marha és juh szérumalbuminjainak peptidjeiben több a treonint, mint a lóéban. A vérplazma fibrinogéntartalma 0,25%, a fehérje molekulatömege 33–34 ezer dalton. A molekula nitrogéntartalma 16,9%, a fehérje mellett 4,6% redukáló cukrot, 1,1% hexóزامint és 0,64–0,89% neuraminsavat tartalmaz. Véralvadáskor a fibrinogén *trombin* enzim hatására fibrin né alakul. A protrombin mintegy 0,015%-ban található a vérplazmában. A szérumglobulinok közül a legfontosabb a γ -*globulin*, amely védő funkciót tölt be az emberi szervezetben. A lipoproteinek között ismeretesek az α -lipoprotein és a β -lipoprotein frakciók. A fehérje–fém komplexek úgy keletkeznek, hogy a szervezetben lévő fémionok egy része a fehérjéhez kötődik, és ilyen formában vándorol a szervezetben. A Fe(III)-transzferrin az emlősök vérplazmájában fordul elő. A *ceruloplazmin* réztartalmú, globulin típusú fehérje. A vérplazmában glikoproteinek is vannak, amelyek 14,9% fehérjenitrogént és 37,3% összes szénhidrátot tartalmaznak. A plazmin proteolitikus hatású fehérje. Inaktív formája

a plazminogén, amelyet az euglobulin frakcióból lehet kristályos formában kinyerni.

Légzőfehérjéknek nevezzük azokat a fehérjéket, amelyek képesek a molekuláris oxigénnel laza kapcsolatot létesíteni, majd azt kisebb parciális nyomáson a szövetekben átadni. A *hemoglobin*, amelynek molekulatömege 68 ezer dalton, négy polipeptidláncból épül fel, amelyek egy hemcsoportot hordoznak. A négy polipeptidláncból kettő mindig azonos. A hemoglobinnmolekula hemrésze egy vasatomból áll, amely a négy pirrolgyűrűt metinhidakkal összekötő porfirinváz közepén helyezkedik el. A vas a hemoglobinban mindig kétértékű, a hozzákapcsolódó vízmolekula helyére molekuláris oxigén, hidrogén-cianid, szén-monoxid vagy nitrogén-oxid kapcsolódhat vegyértékváltozás nélkül. Ha a vasatom háromértékűvé oxidálódik, *methemoglobin* keletkezik, amely képtelen az oxigén szállítására. Ha oxigénmolekula kötődik a hemoglobinhoz, *oxihemoglobin* keletkezik, amely a tüdőből a szövetbe szállítja az oxigént. A *mioglobin* az izmokban található fehérje, amely az izomszöveteket látja el oxigénnel. A molekuláris oxigént a hemoglobinhoz hasonló mechanizmussal köti meg. Az így keletkezett oximioglobinban a vas kétértékű; az oxigén erősebben kötődik, mint a hemoglobinban, ezért azt nehezebben is adja le. A mioglobin vasatomja metmioglobin keletkezése közben oxidálódni tud, amelynek színe az eredeti rózsaszínről barnára változik. A *hemocianin* réztartalmú fehérje, amely képes a molekuláris oxigén megkötésére. A puhatestűek és a lábasfejűek sejt közötti állományában található, az oxigénnel szemben mutatott affinitása gyengébb, mint a hemoglobiné. A *hemovanadin* egyes tengeri állatokban mutatható ki, benne a fehérjéhez háromértékű vanádium kapcsolódik.

A *tejfehérjéket* két csoportra oszthatjuk; kazeinfehérjékre és savófehérjékre. A különböző emlősök tejének kémiai összetétele nagyon eltérő lehet egymástól. A kanca tejének pl. rendkívül magas (6,9–7,0%) a tejcukortartalma, tejfehérje- és tejszírtartalma viszont alig több mint fele a tehéntejének. Az élelmiszeripar szempontjából legnagyobb jelentősége a tehéntejnek van, ezért a tej elnevezésen, ha az eredet egyébként nincs megjelölve, mindig tehéntejet kell érteni. A tehéntejfehérje mintegy 77–79% *kazeint* tartalmaz, amely a foszforproteinek csoportjába tartozó, összetett fehérje. A savas jellegű aminosavak dominanciája miatt izoelektromos pontja $\text{pH}=4,6$, amelyen savval kicsapható. A kazein poliakrilamid-gélelektroforézissel több kazeinfrakcióra választható szét, amelyek közül az α -, β - és γ -kazein képez nagyobb egységet. A *kazein*

75%-a α -, 22%-a β - és 3%-a γ -kazein, amely frakciók további alcsoportokra választhatók szét. Az elektroforézis mellett az egyes kazeinfrakciókat alkoholos eljárással, karbamidos módszerrel és kalcium-kloridos kisózással is el lehet egymástól választani. Az α -kazein kalciumérzékeny kazeinfrakcióra és kalciumra nem érzékeny κ -kazeinre bontható. A κ -kazein glikoprotein típusú fehérje, amelyben a neuraminsav mellett más szénhidrát is található. Molekulatömege lúgos pH-nál 26 ezer dalton; a pH csökkentésével a molekula aggregálódik. Gélelektroforézissel (módszertől függően) 10–15 kazeinfrakciót kaphatunk. Oltós alvadás közben a κ -kazeint az oltóenzim lebontja, a κ -kazeinből felszabadítja a glikomakropeptideket, miközben oldhatatlan para- κ -kazein keletkezik. Mivel a κ -kazein stabilizálja a kalcium-kazeinát micellát, a κ -kazein lebontódása kalciumionok jelenlétében kazein-kalciumsók kiválását, a kazein kicsapódását okozza. Egyes tejtermékek – különösen a sajtfeleségek – érése során a kazein proteolízisével kell számolni, aminek következtében megnő a szabad aminosavak, a peptidek és a kisebb tömegű fehérjefrakciók mennyisége. A tejben a *savófehérjék* mennyisége 0,6–0,7%, amely albumin- és globulinfrakcióból áll. A globulinok a magnézium-szulfáttal telített savóból kicsapódnak; ezek dialízissel euglobulin és pszeudoglobulin frakciókra választhatók szét. A savófehérjék mintegy 13%-át képezik az immunglobulinok, amelyek ugyancsak euglobulin és pszeudoglobulin frakciókra bonthatók. Molekulatömegük 160–190 ezer dalton; az immunvédekezés alapját képezik. Az albuminok α -laktalbumin és β -laktoglobulin frakciókra választhatók szét, amely utóbbi a savófehérjék mintegy 50%-át teszi ki.

A tejfehérje legfontosabb feladata az újszülött és a fiatal állat aminosavakkal való ellátása, emellett a kolosztrum, magas immunglobulintartalmának köszönhetően, hozzájárul a passzív immunitás kialakításához is. A savófehérjék esszenciális aminosav-tartalma nagyobb, mint a kazeiné, ezért a savófehérjék biológiai értéke mintegy 20–30%-kal több a kazeinénél.

A *tojásfehérjék*. A különböző háziszárnyas- és madártojások közül étkezésre a tyúktojást használjuk; ezt nevezzük egyszerűen tojásnak. A tojás két jellegzetes részből áll, a tojásfehérjéből és a tojássárgájából. A tojásfehérje átlagosan 86,6% vizet, 0,2% zsírt és 13–14% fehérjét tartalmaz. A tojásfehérje valójában fehérjemolekulák kolloidoldata, amely három, térben jól elkülöníthető részből áll. Középen sűrűn folyó rész helyezkedik el, amelyet a tojássárgája és a tojás héj felől egy-egy híg folyó rész vesz körül. Az ovalbumin a tojásfehérje fő komponense; az összes

fehérjetartalom 65%-át teszi ki. A konalbumin az összes fehérje mintegy 13%-a, a lizozim jellegzetes bázikus fehérje, az ovomukoid pedig a glikoproteinek csoportjába tartozó, összetett fehérje. Jelentős még a tojásfehérjék globulin-, ovomucin- és avidintartalma. Ez utóbbi a biotinnal oldhatatlan komplexet képez, miáltal megakadályozza annak biológiai hasznosulását.

A *tojássárgája* víztartalma 50%, lipidtartalma több mint 30%, fehérjetartalma pedig 17% körül van. A lipidek részben szabadon, részben lipoproteinként, kötött formában fordulnak elő. A legfontosabb fehérjefrakció a *foszvitin* és a *livetin*. A tojássárgája lipoproteinjei α - és β -lipovitellinből és vitellinből állnak. Aminosav-összetételükben nem különböznek lényegesen egymástól, eltérő azonban foszfortartalmuk, és a vitellinnek lényegesen nagyobb a lipoidtartalma. A foszvitin 9,5% foszfort tartalmaz. A livetinfrakcióra jellemzők a vízdoldható és a hő hatására koaguláló fehérjék.

A *vázfehérjék* vagy szkleroproteinek szálas szerkezetű vegyületek; olyan, állati szervezetben található, vázat alkotó, védő tulajdonságokkal rendelkező fehérjék, amelyek csak aminosavakból épülnek fel, és ellenállóak a kémiai és enzimes behatásokkal szemben. Közéjük tartozik a kollagén, a zselatin, az elasztin, a keratin és a selyemfibroin. A *kollagén* a kötőszövet legfontosabb része. Aminosav-összetételére jellemző a glicin, a prolin és a 4-hidroxi-prolin nagy mennyisége, és ezek mellett kevés aromás és kéntartalmú aminosavat tartalmaz. Ezek miatt a fehérje biológiai értéke csekély. A kollagén hideg vízben nem oldódik, enyhén savas, erősen lúgos vagy nagy sótartalmú oldatban melegítve azonban zselatin keletkezése közben oldatba megy. Az emlősök bőréből kinyert kollagént a *tripszin* és a *papain* nem képes lebontani; lebontására csak a *kollagenáz* képes. A *zselatin* a kollagén savas vagy lúgos kezelésével jön létre. Enyvének is hívják, nitrogéntartalma (18%) nagyobb, mint a legtöbb természetes fehérjéé. Az *elasztin* a rugalmas tulajdonságú rostokban fordul elő. A kollagénból vizes forralással lehet elválasztani, aminek során az elasztin változatlan marad, a kollagénból pedig zselatinoldat keletkezik.

A *keratin* megtalálható a szaruban, a hajban, a szőrben és a tollakban. Kéntartalma igen nagy, ami a cisztein viszonylag nagy mennyiségével (10%) függ össze. Eukeratin (kemény keratin) és pszeudokeratin (lágy keratin) frakciókra osztható. A kemény keratin kéntartalma és arginin-tartalma lényegesen nagyobb a lágy keratinénál. A fehérjebontó enzimek (a sok diszulfidhídtnak köszönhetően) egyik keratinfrakciót sem tudják

lebontani, ezért a feltáratlan toll-liszt értéktelen fehérjeforrás. A hajkeratinban a polipeptidláncok α -hélix szerkezetűek (α -keratin). Az α -keratin a hőmérséklet és a nedvességtartalom függvényében át tud alakulni hajtogatott lemez szerkezetű β -keratinná, amely az eredeti molekulánál lényegesen rövidebb. A *selyemfibroin* olyan, összetett szerkezetű fehérje, amelynél a selyemszálfehérjét egy hüvelybe beágyazva enyvszerű, selyemenyvnek vagy szericinnek nevezett anyag vesz körül. A szericin nagy szerintartalmú, forró vízben jól oldódó anyag. Igen nagy a glicin-, alanin- és szerintartalma.

A *protaminok* és a *hisztonok* erősen bázikus jellegű fehérjék, amelyek a sejtmagban találhatók, dezoxiribonukleinsavakhoz kötve. A protaminok csak a spermában vannak jelen, a hisztonok viszont igen elterjedtek az élő szervezetekben. A protaminok kis móltömegű (4–8 ezer dalton), erősen bázikus kémhatású fehérjék, ami a bázikus aminosavak nagy arányának tulajdonítható, amelyek mintegy 2/3-át teszik ki az összes aminosav-tartalomnak. Magas arginintartalma miatt a protaminok nitrogéntartalma 20–30% között van. A hisztonok a sejtmagban található, bázikus jellegű fehérjék, amelyek a dezoxiribonukleinsavakhoz nukleohisztonok képződésével kapcsolódnak. A triptofán kivételével valamennyi aminosavat tartalmazzák.

A *növényi fehérjékben* általában albumin-, globulin-, prolamin- és glutelinfrakciók vannak, amelyek vízzel, sóoldattal, 70%-os alkohollal vagy híg savakkal és lúgokkal nyerhetők ki a növényekből. A gabonafehérjék közül a búzafehérjéket eltérő oldékonyságuk alapján négy frakcióra bonthatjuk, amelyek közül az *albumin* vízzel oldható, a *globulin* híg sóoldattal, a *prolaminok* 70%-os alkohollal, a *glutelinek* pedig alkáliákkal nyerhetők ki. A *gliadin* és a *glutenin* egy-egy arányú komplexe a sikér (glutén), ami a tésztakészítés elengedhetetlen komponense. A sikér összetett fehérje, amelyből a különböző búzafajták különböző mennyiséget tartalmaznak: a lágy búzában 8–10,5%, a kemény búzában 9–11%, a durumbúzában pedig 17% szárazsikér van.

A búzához hasonló összetételű fehérjék találhatók a rozsban, az árpában, a zabban és a rizsben. A kukoricafehérjék hasonló fehérjefrakciókra bonthatók szét, mint a búzafehérjék. Legfontosabb fehérjéjük, a *zein*, a prolaminok csoportjába tartozó, 92%-os alkoholban jól oldódó, heterogén anyag. A kukorica fehérjei közé tartozik még a *glutelin*, a *mayzin* és az *edesztin*. A kukoricafehérjében limitáló aminosav a lizin, amely a fehérje 2,6–2,8%-át teszi ki. A hüvelyesek fehérjei közül legnagyobb jelentőségű a szójafehérje, amely a szójanövény szemtermésének 40%-a.

A szója fehérjetartalmának 80%-át a globulin típusú *glicinin* teszi ki. A szójafehérje aminosav-összetétele a növényi fehérjék közül az egyik legkedvezőbb, mert az összes esszenciális aminosavat az optimálishoz közelítő arányban tartalmazza. A babfehérjék az érett étkezési babban 20–25%-os arányban fordulnak elő. Fő komponensük a globulinokhoz tartozó *fazeolin*. A lencse- és a borsófehérjék fő komponense az ugyancsak a globulinokhoz tartozó *legumin*.

Az olajos magvak fehérjéi közül a napraforgó-fehérjék a jelentősebbek, amelyek a szójafehérjénél kisebb metionin- és lizintartalmúak. A burgonya fehérjetartalma rendkívül alacsony, a legfontosabb, globulintípusú *tuberin* fehérjéjének aminosav-összetétele azonban rendkívül kedvező. A friss zöldségfélék fehérjetartalma általában 1% vagy kisebb. A levélzöldségekben 1,7%, a gyökerekben 0,6%, a zöldségfélék termésében pedig 0,4% a fehérjetartalom.

4.3.7. Új fehérjeforrások

Régóta folynak genetikai kísérletek olyan gabonafélék előállítására, amelyek nagyobb fehérjetartalmúak, magas lizintartalommal. Ilyen kísérletek eredménye pl. a rozs és a búza keresztezésével előállított triticales. Az új fehérjeforrások közé tartoznak az olajosmag-fehérjék; közülük is kiemelkedik a magas biológiai értékű fehérjét tartalmazó szójafehérje, amelynek hasznosítására számos új technológiai megoldást dolgoztak ki. Jelentős tartalékok vannak az élelmiszer-termelés melléktermékeinek és hulladékainak felhasználása területén, hisz pl. a savóban lévő fehérjéket, a vágóhídi vért, tollat még ma sem hasznosítjuk kellő hatékonysággal. Jelentős eredményeket értek el az egysejtfehérjék előállítása területén, amikor a különböző mikroorganizmusok a fehérjeforrások. Az élesztők *Candida* törzsei paraffinbázison, folyamatos fermentorokban jelentős mennyiségű fehérje termelésére képesek. Az egysejtfehérje-előállítás során az alkánokat először a megfelelő zsírsav-előállítás céljából oxidálják, majd β -oxidációval lebontják. A keletkezett élesztősejteket centrifugálással leválasztják, mosás, majd szárítás után egy tonna alkánból és 0,11 tonna ammóniából 1,2 tonna száraz élesztő nyerhető, 63%-os fehérjetartalommal. Jelenleg megoldottnak tekinthető a fontosabb esszenciális aminosavak kémiai vagy fermentációs úton való szintézise. Kémiai úton a DL-metionint, fermentációval az L-lizint, L-treonint, L-triptofánt és

az L-izoleucint állítják elő. Az ily módon előállított esszenciális aminosavakat növényi fehérjékhez keverve, azok biológiai értéke jelentősen megnövelhető.

4.3.8. Élelmiszer-fehérjék átalakulása a feldolgozás és tárolás során

Ebben a fejezetben csak röviden említjük, illetve összefoglaljuk azokat a változásokat, amelyek az élelmiszer-fehérjék feldolgozása és tárolása során bekövetkezhetnek. A fehérje-átalakulásokat részletesen a 8., *Az élelmiszer-fehérjék károsodása* című fejezetben tárgyaljuk. A legtöbb élelmiszer-fehérje már mérsékelt hőhatásra *denaturálódik*, ami jelentős változást eredményez mind a biológiai, mind a funkcionális tulajdonságok alakulásában. A hőkezelés inaktíválja az enzimeket, előidézhet nemkívánatos szín- és ízváltozásokat, textúraváltozásokat, valamint csökkentheti a vitamintartalmat. A legtöbb fehérjetoxin és antinutritív anyag viszont hőhatásra denaturálódik és ezáltal inaktíválódik. Az inaktíválás nedves állapotban végezve hatékonyabb; a hőkezelés módja lehet autoklavozás, sterilizálás, sütés és extrúziós főzés.

Az aminosavak átalakulása a feldolgozás és tárolás során. A fehérjék hőkezelése az egyes aminosavak deszulfurálódásához, dezaminálódásához, izomerizációjához és egyéb kémiai átalakulásához vezethet. 115 °C feletti hőkezeléskor a cisztin és a cisztein részleges lebomlása kén-hidrogén, dimetil-szulfid és ciszteinsav képződéshez vezet. Deaminálódás játszódik le 100 °C feletti hőkezelés során, amely elsősorban a glutamin és aszparagin amidcsoportjait érinti. Oxigén jelenlétében a hőkezelés során számolni kell a kéntartalmú aminosavak oxidációjával és a triptofán indolcsoportjának hasadásával. A 200 °C feletti vagy lúgos közegben való hőkezelés az L-aminosavak kisebb-nagyobb mértékű racemizációját okozhatja, amelynek során D-aminosavak keletkezhetnek. Ezek nemcsak csökkentik a fehérje emészthetőségét és rontják biológiai értékét, hanem egészségkárosodást is okozhatnak. Hosszan tartó hőkezelés során gyűrűs származékok is keletkezhetnek, amelyek mutagén hatást fejthetnek ki. Alkalikus közegben végezve a hőkezelést, az arginin ornitinre, karbamidra, citrullinra és ammóniára bomolhat, a ciszteinből pedig rendkívül reaktív dehidroalanin képződik.

A feldolgozás és tárolás során létrejövő fehérje–fehérje kapcsolódások. Hőkezelés során létrejövő inter- és intramolekuláris kötések a lizin-, a cisztein- vagy az ornitin-oldalláncok és a ciszteinből keletkező dehidroalanin (DHA) között jönnek létre, kondenzációval. A dehidroalanin a ciszteinből vagy a szerinből jön létre β -eliminációval; a vegyület rendkívül reakcióképes, amely a cisztein szabad szulfhidrilcsoportjával lantionin, a lizin ε -aminocsoportjával pedig lizinoalanin képződése közben hoz létre keresztkötéseket. A keresztkötéseket az emésztőenzimek rendkívül nehezen tudják lebontani, ezért az ilyen fehérjék biológiai értéke kisebb, mint a natív, kezeletlen fehérjéé. Erélyesebb hőkezelés hatására a lizin ε -aminocsoportja, valamint a glutamin és az aszparagin amidcsoportja között jöhetnek létre keresztkötések. A fehérjében lévő lizin 15%-a képes így reakcióba lépni, ami jelentősen csökkenti a fehérje biológiai értékét.

A fehérjék oxidálóanyagokkal is reagálhatnak a termék előállítása során. Az aminosavak közül a kéntartalmú cisztin, cisztein és metionin, valamint a triptofán a legérzékenyebb az oxidációra. A metionint erős oxidálószerrel metionin-szulfoxiddá, metionin-szulfonná oxidálják. A cisztin és a cisztein számos oxidációs terméke közül a mono- és diszulfoxidok és a cisztein-szulfénsav még vissza tud alakulni L-ciszteiné, a ciszteinsav és a cisztein-szulfinsav azonban már felhasználhatatlan az ember és az állat számára.

A *fehérjék szénhidrátokkal* is kapcsolatba léphetnek a feldolgozás és a tárolás során. Ilyen kapcsolat lehet a *nem enzimés barnulás* vagy *Maillard-reakció*. A reakció során létrejött termékek biológiai értéke kisebb, mert a reakció végtermékei, a melanoidinek nehezen emészthető, nagy móltömegű komplexek, amelyek még mutagén hatást is mutatnak.

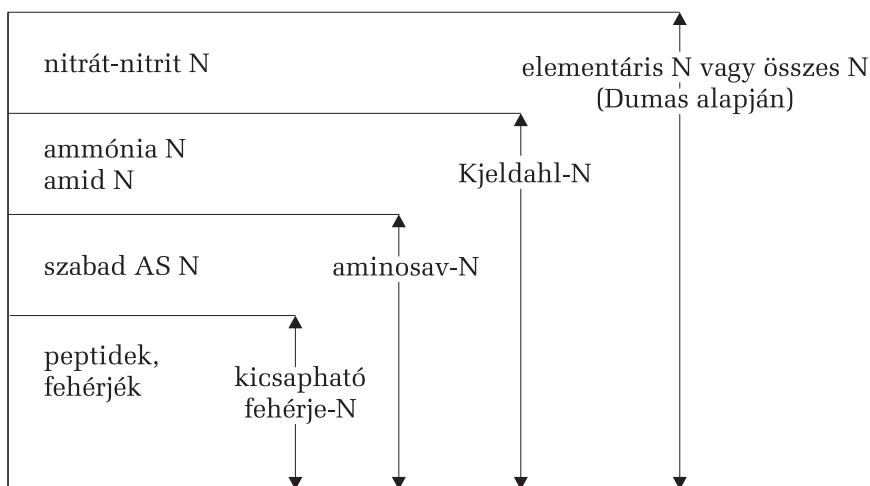
A feldolgozás és a tárolás során jelentős változások mehetnek végbe a *funkcionális tulajdonságokban* is. A funkcionális tulajdonságokra leginkább a fehérje másodlagos, harmadlagos és negyedleges szerkezetében bekövetkező változások vannak hatással. A pH vagy a sókoncentráció megváltoztatásával reverzibilis aggregáció lép fel, amely módszert előszeretettel alkalmaznak fehérjekészítmények előállítására és tisztítására. A víz részleges eltávolítása következtében fehérje–fehérje, fehérje–só és fehérje–szénhidrát kapcsolódások alakulhatnak ki, amelyek ugyancsak megváltoztatják a funkcionális tulajdonságokat. Enyhe alkalikus kezelés hatására proteínatok (fehérje–sók) jönnek létre, amelyek vízben jól oldódnak, vízmegkötő képességük igen jó, és felületaktív tulajdonságaik is kiválóak. Mechanikai hatásokra a részecskék fajlagos felületének

megváltozása következtében megnő a víz- és zsíradszorpció, a fehérje oldhatósága és habképző tulajdonsága az eredeti anyaghoz viszonyítva. Hőkezelés hatására megváltozik a fehérjék szerkezete, bekövetkezhet a peptidkötés hidrolízise és az aminosav-oldalláncok módosulása. Az oldalláncban bekövetkező változások és az ezt követő kondenzációs reakciók jelentős mértékben csökkenthetik a biológiai értéket.

Enzimek hatására jelentős változások jöhetnek létre a funkcionális tulajdonságokban is. Az élelmiszer-iparban a legtöbb esetben fehérjebontó enzimeket alkalmaznak a kedvezőbb fizikai és kémiai tulajdonságok elérése céljából. Ilyen módszer pl. a hús érlelése *papainnal*, a kazein kicsapása *kimozinnal* és a vízoldható fehérjekészítmények előállítása növényi és állati fehérjékből. Részleges proteolízissel javítani lehet a hődenaturált fehérjék emulgeáló és habképző tulajdonságait, valamint a fehérjék emészthetőségét.

AZ ÉLELMISZEREK NITROGÉNTARTALMÚ ANYAGAINAK MEGHATÁROZÁSA

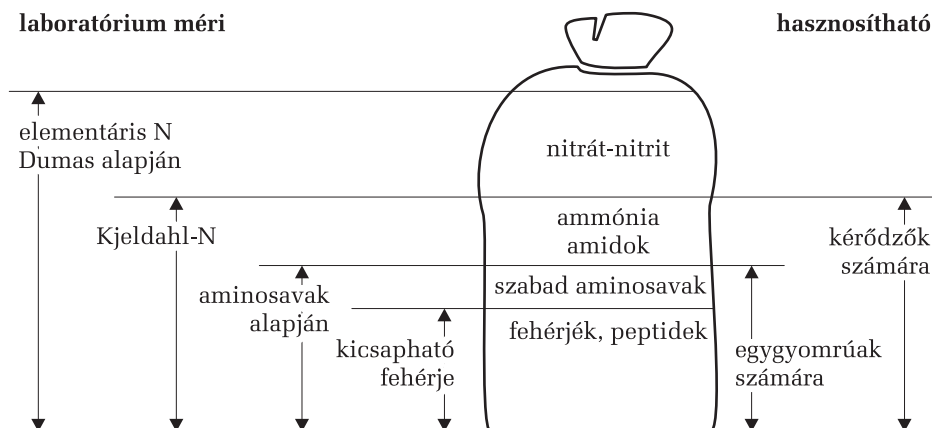
Az élelmiszerek nitrogéntartalmú anyagait kémiai szerkezetük, illetve a meghatározás módja alapján az 5.1. ábra szerint osztályozhatjuk:



5.1. ábra. Élelmiszerek nitrogéntartalmú anyagainak osztályozása a kémiai szerkezet, valamint a meghatározás módszere alapján

Az összeállításból látszik, hogy a fehérjéket és peptideket fehérjekicsapó szerekkel el lehet távolítani, ezek a komponensek alkotják a nitrogéntartalmú anyagok valódi fehérje frakcióját. Az aminosav-analízissel e frakción túl még szabad aminosavakat is meg lehet határozni, míg a *Kjeldahl*-féle eljárással, az amid- és az ammónia-nitrogént az aminosav-analizátorral meghatározható frakción túl is lehet mérni. A *Dumas*-féle eljárás minden nitrogéntartalmú vegyületet mér. A nitrogéntartalmú anyagok kémiai szerkezet alapján való elkülönítése nemcsak az alkalmazott analitikai módszer miatt fontos, hanem azért is, mert az ember és a különböző állatfajok eltérő emésztési sajátosságai miatt a különböző frakciókat nem egyformán hasznosítják. A valódi fehérjéket, a peptideket

és az aminosavakat az egygyomrúak és a kérődzők is egyaránt hasznosítják, az amidok és az ammónia csak a kérődzők számára hasznosíthatók, a nitrátok és a nitritek pedig sem az emberben, sem az állatban nem értékesülnek, sőt nagyobb mennyiségben károsak is lehetnek. A fentieket az 5.2. ábra szemlélteti.



5.2. ábra. Élelmiszerek és takarmányok nitrogéntartalmú anyagai

5.1. A fehérjék kivonása, kicsapása

A fehérjék állati vagy növényi anyagokból történő kinyerése során a hatékonyság döntő tényezője a vizsgált minta maximális mértékű dezintegrálása. A sejtszerkezet megbontására a mechanikai aprításon kívül a szétfagyasztást vagy hipertóniás oldatokkal történő kezelést is alkalmazzzák. A fehérjék oldhatósága – amint arról egy külön fejezetben is beszámoltunk – igen különböző, így pl. a vázfehérjék nem oldódnak vízben és más egyéb oldószerekben sem. A növényi fehérjék egy csoportja pl. 60–80%-os alkoholban oldódik, a többi fehérje pedig többé-kevésbé oldható vízben, illetve híg vizes oldatokban. Az oldódás függ a vizes oldat ionerősségétől, az ionok minőségétől és koncentrációjától, a pH-tól és a hőmérséklettől.

Magas hőmérsékleten és extrém alacsony vagy magas pH-n az oldódás általában végbemegy, az izoelektromos pontnak megfelelő pH-n a fehérjék viszont kicsapódnak. Az egyes oldószerek a különböző fehérjéket eltérő arányban oldják, mert az oldás mértéke az oldószereken kívül

függ a fehérje minőségétől, a poláros hidrophil és az apoláros hidrofób csoportok arányától, ezek elrendezésétől és az így létrejövő dipólusmomentum nagyságától. Az ionok minőségétől függően ugyanabból az anyagból különböző mennyiségű és minőségű fehérje oldható ki. A neutrális só- és pufferoldatok peptizáló hatása növelhető anionos detergensok adagolásával, és a peptidlánc összecsavarodottságát okozó diszulfidhidak redukciója vagy oxidációja szintén növeli az oldhatóságot. Nyolcnál nagyobb pH-n, a rézionokkal történő komplexképzés ugyancsak a fehérje oldhatóságának növelése irányába hat, azonban itt már a fehérje szerkezete is mélyrehatóan átalakul.

A gyakorlatban a fehérjék analízise során az alábbi fehérje-kioldási technológiákat alkalmazzák. Albuminok és globulinok kinyerése állati szövetekből a következő módszerek szerint lehetséges: *Az albuminok, a különféle pszeudoglobulinok és a globulinok csak együtt vonhatók ki*; az egyes frakciók elkülönítését különféle egyéb eljárásokkal lehet elvégezni. Az albuminok pl. tiszta vízben jól oldhatók, és csak ammónium-szulfáttal telített oldatból csapódnak ki. Gabonafehérje extrakciójára a híg lúgokat, a pH 9–12 közötti puffereket, vagy a lúgosan hidrolizáló sók oldatát használják, melynek során a kísérleti körülményektől függően az összes fehérje 60–95%-a vonható ki. A kukoricafehérje kivonására *Mertz* és *Bressan* az alábbi eljárást dolgozták ki, mely alkalmazható más növények fehérjéinek extrakciójára is:

10 g zsírtalanított őrleményhez 20 cm³ desztillált vizet, majd annyi 0,2%-os NaOH-oldatot adunk, hogy a szuszpenzió pH-ja 9 legyen. Ezt követően lefagyasztjuk, a fagyasztás után felolvasztjuk a szuszpenziót, a műveletet pedig még kétszer megismételjük. A felolvasztott anyaghoz 250 cm³ desztillált vizet, 150 g CuSO₄ · 5 H₂O-t és 20 g Na₂SO₃-at adunk. A sók feloldódása után az oldat pH-ját 40%-os NaOH-dal pH=10-re állítjuk be, majd 0,5M NaOH-dal folytatva a lúgosítást, a pH-t állandó keverés közben 12-re növeljük. Ezt követően a szuszpenziót 25 °C-on 3 órán át intenzíven kevertetjük, és 20 percig 2000 g-n centrifugáljuk. A felülúszót leöntjük és megőrizzük, az üledéket pedig 100 cm³ 0,01M NaOH-dal szuszpendáljuk, és 1 órán át 25 °C-on ismét kevertetjük, illetve centrifugáljuk. A mosó felülúszót is az eredeti kivonathoz adjuk, utána az egyesített kivonatot lefagyasztjuk és felolvasztjuk. A kicsapódott keményítőt centrifugálással eltávolítjuk. A tiszta oldatot 0,02M sósavval szemben 3 napig 0 °C-on dializáljuk, majd a dialízist 3 napon keresztül desztillált vízzel szemben folytatjuk. A sómentes fehérjeoldatot rotációs gyorsbepárlón bepároljuk, és a negyedére csökkent oldatot liofilezzük.

A kapott száraz fehérjepor 68–75% nyersfehérjét tartalmaz, 11-es pH-jú karbonát- vagy hidrogén-karbonát-pufferben, valamint 0,01M NaOH-oldatban jól oldódik. A fehérje 26%-a oldódik vízben, 44%-a 70%-os etanolban, 10%-a pedig nemfehérje nitrogénként dializálódik.

Az albuminok és a globulinok együttes meghatározása esetén 6 g lisztet 100 cm³ 5%-os K₂SO₄-oldattal 20 °C-on 1 órán át rázatjuk, majd centrifugáljuk, és az oldatot finom pórusú analitikai szűrőpapíron szűrjük. Az oldat 50 cm³-ét használjuk fel az albumin- és a globulinfrakció meghatározására. A meghatározást *Kjeldahl*-módszerrel végezzük. A glutenin meghatározása során 8 g lisztet 50 cm³ vízzel és 5 cm³ 1M NaOH-dal 1 óráig intenzíven kevertetünk, 96–99%-os metanollal 200 cm³-re feltöltjük, majd további 5 cm³ metanollal kompenzáljuk a 8 g liszt térfogatát. A keményítő a metanol hatására kicsapódik, a vattaszűrőn átszűrt szuszpenzióból 50 cm³ 2 g lisztnek felel meg. Brómtimolkék-indikátor jelenlétében az 50 cm³ oldat pH-ját 0,2M sósavval 6,4-re állítjuk be. A pH-beállítást követően a glutenin kicsapódik, a gliadin pedig oldatban marad. Egy óra állás után a csapadékot lecentrifugáljuk, ezt követően a gliadint tartalmazó felülúszó alkoholos oldat leönthető, a glutenin-csapadékot pedig kevés vízzel *Kjeldahl*-lombikba mossuk át. A gliadint a sósavban oldható fehérje és a glutenin összegéből, valamint az összes fehérje különbségéből számoljuk.

Növényi vagy állati szövetek fehérjetartalmát sajtolással is kinyerhetjük. A laboratóriumi méretű hidraulikus sajtolókkal létrehozott nyomás hatására a nedves minták folyadéktartalma eltávolítható. Az így nyert minta azonban nem képviseli a vizsgálati anyag teljes fehérjetartalmát, hanem csak a strukturális elemekhez nem kötött, vízben oldott fehérjéknek azt a részét, amely az adott nyomáson sajtolással kinyerhető.

A fehérjeoldatokból a fehérjéket analitikai célra esetenként kicsapatjuk. A fehérjék oldataikból kicsaphatók szerves oldószerekkel, melyek közül az acetón, a dioxán és az etil-alkohol használatos leginkább erre a célra, illetve nehézfém sókkal, melyek közül főleg az ólom-, a réz-, a higany-, az urán-, a vas- és a cinksók jöhetnek számításba. Az ásványi savak közül a fehérjék leválasztására leggyakrabban a sósavat, a salétromsavat és a foszforsavat használjuk, a szerves savak közül pedig kiváló fehérjekicsapó hatása van a triklór-ecetsavnak, a szulfo-szalicilsavnak és a pikrinsavnak. Esetenként alkalmazhatjuk a különböző savak keverékét (1 g pikrinsav + 2 g citromsav 100 cm³ vízben), és a savak mellett adhatunk kemikáliát is (10 rész 20%-os ecetsav és 1 rész 10%-os kálium-hexaciano-ferrit elegye). A fehérjék kivonása és kicsapása akár

gravimetriás meghatározásra is alkalmas lehet, amennyiben az a mintából kvantitatíve kivonható, és vizes oldatba vihető. Az eljárás alkalmas lehet néhány fehérje esetében, a gyakorlatban azonban ez a módszer nem terjedt el, mert az őrlés és a kivonás körülményei nehezen standardizálhatók.

5.2. A fehérjetartalom mérése a nitrogéntartalom alapján

Az indirekt fehérjemeghatározási módszerek többsége a nitrogéntartalom meghatározásán alapszik, melyet az tesz lehetővé, hogy a fehérjék elemi összetétele a fehérje minőségétől és eredetétől függetlenül közelítőleg azonos. A nitrogéntartalmú meghatározás alapja, hogy a legtöbb fehérje nitrogéntartalma 16% körül alakul, ezért ha a nitrogéntartalmat megszorozzuk a $100/16=6,25$ konverziós faktoral, akkor megkapjuk a fehérjetartalmat. A nitrogéntartalom alapján csak a tiszta, tisztított fehérjék vagy olyan anyagok fehérjetartalmát lehet meghatározni, amelyekben a fehérjén kívül nincs más nitrogéntartalmú anyag. Élelmiszerek a fehérjén kívül más nitrogéntartalmú anyagot is tartalmazhatnak, ezért az élelmiszer-analitikában a nitrogéntartalom alapján nem a fehérjetartalmat, hanem az úgynevezett nyersfehérje-tartalmat határozzuk meg, melynek során az élelmiszer nitrogén%-át 6,25 konverziós faktoral szorozzuk. Ennek megfelelően fehérjeként mérjük az összes nitrogéntartalmú vegyületet, amelyet az adott módszerrel meg tudunk határozni. A gyakorlatban kielégítő pontosságú az eredmény a 6,25 szorzófaktor számításával, amennyiben ennél pontosabb eredményt kívánunk elérni, akkor célszerű a vizsgálati anyag fehérjét tényleges nitrogéntartalmának megfelelő szorzószámával szorozni. Szélsőséges esetként említhető a lazacikrában lévő protamin, melynek nitrogéntartalma 30,7%, ezért a 6,25-ös konverziós faktor alkalmazásával majdnem kétszer annyi fehérjetartalmat kapnánk, mint a tényleges érték. A protamin tényleges konverziós faktora 3,25. Ellenpéldaként említhető a toll keratintartalma, mely összesen csak 15% nitrogént tartalmaz, ennek megfelelően a konverziós faktor 6,66. Az 5.1. táblázat a különféle fehérjék nitrogéntartalmát és a nitrogéntartalomból számított konverziós faktorokat sorolja fel.

5.1. táblázat. *Néhány alapanyag fehérjenitrogén-tartalma és a szorzófaktorok*

Fehérje	A fehérje nitrogéntartalma (%)	Faktor
Árpa	17,15	5,83
Bab, borsó, lencse	16,00	6,25
Búza	17,15	5,83
Búzacsíra	17,23	5,80
Búza-endospermium	17,54	5,70
Búzakorpa	15,84	6,31
Edesztin (kendermag)	18,55	5,39
Fibrin (humánplazma)	16,90	5,91
Fibroin (hernyóselyem)	18,70	5,35
Földdió-dara	18,31	5,46
Gliadin (prolamin búzából)	17,66	5,66
Glicinin (szójabab)	17,30	5,78
Globulin (humánplazma)	15,24	6,56
Globulin	16,03	6,24
Gyapotmag	18,86	5,30
Hemoglobin (lóvér)	16,80	5,95
Hisztin (borjúmáj)	18,00	5,55
Hisztin (borjútímusz)	18,20	5,49
Hordein (prolamin árpából)	17,21	5,81
Hús	16,00	6,25
Kazein (tehéntej)	15,63	6,39
Keratin (gyapjú)	16,30	6,13
Keratin (sertéssörte)	16,60	6,02
Keratin (toll)	15,00	6,66
Kókuszdió	18,86	5,30
Kollagén (marhabőr)	18,60	5,37
Kukorica	16,00	6,25
Laktoglobulin (tehéntej)	15,60	6,41
Legumin (borsó)	16,04	5,54
Napraforgó és lendara	18,87	5,30
Ovalbumin (tyúktojás)	15,76	6,34
Plazmaalbumin (humán)	15,95	6,27
Plazmaalbumin (marha)	16,07	6,22
Protamin (lazacikra)	30,70	3,25
Protamin (madársperma)	24,40	4,10

Fehérje	A fehérje nitrogéntartalma (%)	Faktor
Rizs	16,80	5,95
Rozs	17,15	5,83
Szójabab	17,51	5,71
Tej	15,67	6,38
Tojás	16,00	6,25
Zab	17,15	5,83
Zein (prolamin kukoricából)	16,20	6,17
Zselatin (kollagén)	18,00	5,55

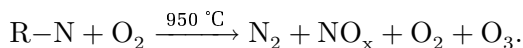
5.2.1. A nitrogéntartalom mérése *Dumas*-módszerrel

A különböző szerves és szervetlen nitrogéntartalmú anyagok jelentős részének meg lehet határozni a nitrogéntartalmát a *Dumas* által 1826-ban közölt eljárással. Az elmúlt közel két évszázad alatt a módszert folyamatosan fejlesztették, s ma a módosított *Dumas-féle égetéses módszerként* ismerik a világban. Az alapelv a minta 900–1000 °C-os hőmérsékleten, ellenőrzött oxigénellátás melletti elégetése inert nitrogénáramban. A *Dumas*-módszerrel történő összesnitrogén-tartalom meghatározása négy fő szakaszból áll:

- égetés,
- redukció,
- gáztisztítás,
- detektálás.

A Dumas-féle égetés mechanizmusa

A nitrogéntartalmú szerves és szervetlen vegyületek 950 °C-on katalizátor (réz-oxid vagy réz-oxid/platina) jelenlétében részben nitrogén-oxidokká, részben pedig molekuláris nitrogénné alakulnak a következők szerint:



A technikai megvalósítás során mind az oxigén, mind az ún. inert gáz (He, Ar, CO₂) áramlik. Az eljáráshoz nagy tisztaságú (99,99%, ún. négykilences) gázok szükségesek. Az égetés réz-oxid töltetű kvarccsőben történik, majd a gázkeverék az utóégetőbe kerül, melynek töltete

réz-oxid/platina katalizátor keveréke. Ekkor a nehezen oxidálható vegyületek mennyiségi átalakítása is megtörténik. Tekintettel arra, hogy az égetésnél nitrogén-oxidok is képződnek, ezeket a vegyületeket – mivel a detektálás gázfázisban N_2 -ként történik – molekuláris nitrogénné kell redukálni. Erre szolgál a wolframkatalizátor, amely egyidejűleg a felesleges oxigént is megköti.

A nitrogéntartalom mérése

Az így kapott áramló gázkeverék több olyan komponenst is tartalmaz, melyek a mérést többé-kevésbé zavarják (SO_2 , H_2O , hidrogén-halogenidek), s így az eredményt torzítják. Ezért ezen összetevők eltávolítására, a gáz szárítására adszorbenseket kell alkalmazni. Ha a hordozógáz CO_2 , akkor az elégetéskor keletkező CO_2 elnyeletéséről le lehet mondani. A kapott „tisztá” hordozógázban a nitrogén mérése azon az elven történik, hogy a gázok hővezetőképessége eltérő. *Egy hővezetőképesség-mérő cella (egyenletes hőfokon tartott cella hőmérséklet-változása) alkalmazásával elérhető az, hogy a N_2 mennyiségével arányos jelet kapjunk.* Ennek nagyságát ismert minták nitrogéntartalmának ugyanilyen körülmények közötti meghatározása során kapott eredményekkel hasonlítjuk össze. *Korábban a detektálás során térfogatméréssel állapították meg a képződött N_2 gáz mennyiségét,* miután a CO_2 gázt KOH-ban elnyelették. Ebben az esetben figyelembe kell venni a hőmérséklettel változó légnomás értékét is.

A fehérjetartalom számítása

A nitrogéntartalomból a nyersfehérje-tartalmat az 5.1. táblázatban bemutatott fehérjekonverziós faktorok segítségével számíthatjuk ki. Összehasonlító kalibráló mintaként leggyakrabban nikotinsavat, lizin-hidrogénkloridot, EDTA-t és triptofánt használunk. Tekintettel arra, hogy ezzel a módszerrel a nitrát-nitrit tartalmat is – a Kjeldhal módszerrel ellentétben – a redukció után a nitrogéntartalomban mérjük, számos mintatípusnál az átszámítás során a ténylegesnél magasabb nyersfehérje-tartalmat kapunk. Ez különösen a leveles zöldségeknél (spenót, sóska), a zöldliszteknel (lucerna-, fűszénák) fordulhat elő. Több típusú mintának a két eltérő módszerrel kapott vizsgálati eredményei az 5.2. táblázatban láthatók.

5.2. táblázat. A Kjeldahl- és Dumas-féle N-meghatározási módszerrel kapott eredmények összehasonlítása

	N% Kjeldahl-módszerrel	N% Dumas-módszerrel
Vizsgálati minták		
fű	2,34	2,62
lucerna	2,76	2,72
kukoricaszilázs	1,64	1,73
széna	3,70	3,88
extrahált szója	7,98	8,00
Standard minták		
EDTA *	9,57	9,58
triptofán **	13,68	13,70
lizin-hidroklorid ***	15,36	15,35

Elméleti N% értékek: * 9,59%, ** 13,72%, *** 15,34%.

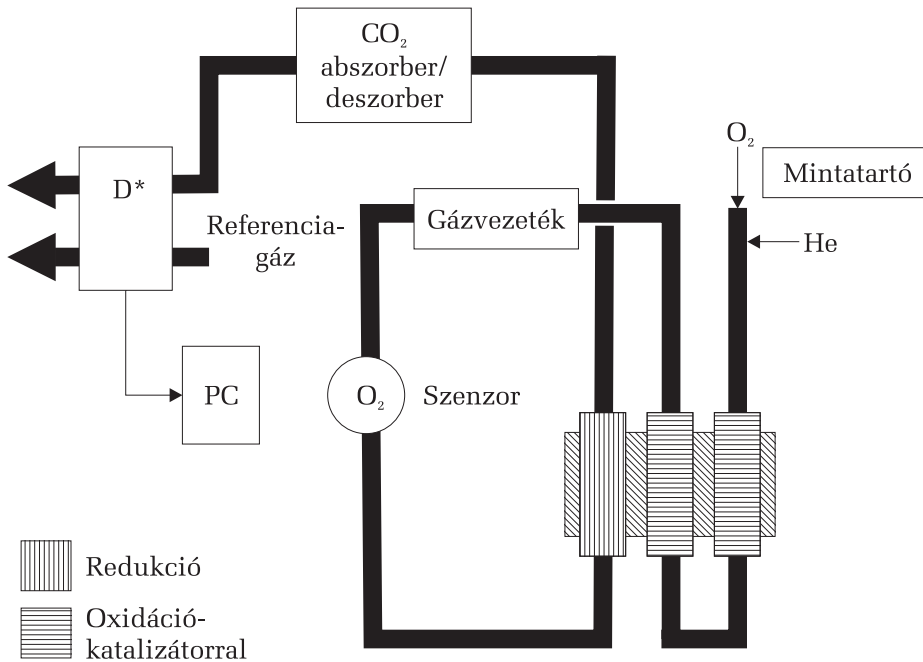
Az ismertetett módszer nagy sorozatú mérésekre alkalmas változatainak számos fontos követelményt kell teljesíteniük. Ilyenek többek között:

- egyszerű mintabevitel szilárd és/vagy folyadékmintákból,
- olcsó vagy többször felhasználható mintatartók,
- kevés gázfogyasztás,
- könnyű adszorbercsere lehetőség,
- nagyfokú, gázszivárgás elleni tömítettség,
- a gázáram és annak pontos szabályozhatósága.

Egy Dumas-féle módszerrel működő nitrogénmeghatározó készülék sematikus rajzát az 5.3. ábra mutatja.

A Dumas-módszer előnyei

A ma elterjedőben lévő készülékek a mintatartóba behelyezett mintát (szilárd minta esetén ón- vagy alumínium-kapszulában, illetve porcelántégelyben) adott számítógépes program szerint elemzik, s adják meg a nitrogéntartalmat. A módszer elterjedését az teszi indokolttá, hogy a gyártók egyre jobban meg tudják oldani a számítógép vezérelte gépüzemeltetést (műszakszám növelése), továbbá ezen módszer *kevesebb*



* Hővezetőképességi detektor

5.3. ábra. Egy Dumas-féle módszerrel működő nitrogénmeghatározó készülék sematikus rajza

környezetszennyező terméket bocsát ki. A mezőgazdasági és élelmiszeripari alkalmazás terjedését elősegítheti, hogy ma már olyan készülékek is kereskedelmi forgalomban vannak, amelyekkel maximum 1 g szerves minta vagy 1 cm³ mintatérfogot is mérhető. Természetesen ekkor figyelembe kell venni a végeredményként várható ún. abszolút nitrogén mennyiségét (maximum 200–300 mg), amit a gépkönyvek tartalmaznak. Ugyanakkor hátrány, hogy *csak napi jelentős mintaszám esetén érdemes a készüléket működtetni*, a beruházási költségek magasak és nem elhanyagolható az égető- (kvarc-) és adszorpciós csövek, továbbá a katalizátorok költsége sem.

E készülékek további előnye lehet, hogy ezen elv alapján lehetőség van a nitrogén mellett más elemek (kén, szén) mennyiségének meghatározására is. A fehérjék kéntartalmának ismerete számos növénynél nagyon fontos lehet (pl. őszi búza sikérfehérjéknél), ezért bizonyos

esetekben indokolt a korábbinál jóval bonyolultabb (más égetési hőmérséklet, több adszorpciós cső), s így drágább készülék üzemeltetése is. Ma már az ún. égetéses módszer is bevonult a nagy világszervezetek által elfogadott standard módszerek közé.

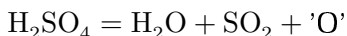
5.2.2. A nitrogéntartalom mérése *Kjeldahl* szerint

Az élelmiszer-fehérjék nitrogéntartalmát az előző fejezetben ismertetett *Dumas*-módszer mellett jobbára a *Kjeldahl* által 1883-ban publikált eljárással határozzák meg. Az eredeti eljárást sokan módosították, az alapelvek azonban több mint 120 év alatt nem változtak, és ez a módszer ma is legelterjedtebb a nitrogénmeghatározás területén, mely óriási hatással volt a biokémia, az élelmiszer-kémia, a táplálkozás és a takarmányozás tudományának fejlődésére. A *Kjeldahl*-módszer két fő szakaszból áll:

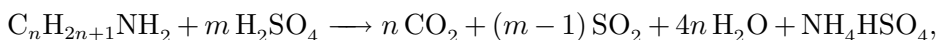
- A szerves anyag roncsolása, melynek során a nitrogéntartalmú vegyületek – a nitrit és a nitrát kivételével – ammóniává alakulnak át.
- Az ammónia meghatározása, a nitrogéntartalom és a nyersfehérjé-tartalom számolása.

5.2.2.1. A *Kjeldahl*-féle roncsolás mechanizmusa

A módszer 120 évvel ezelőtti publikálása óta történt módosítások és fejlesztések nagyrészt a roncsolás tökéletesítésére, a roncsolás idejének csökkentésére irányultak. A kénsavas roncsolás során a tömény kénsav elvonja egy adott hőmérsékleten a víz elemeit a meghatározni kívánt anyagból, melynek következtében szén válik szabaddá. A kénsav a bomlási hőmérsékleten a következő reakció szerint naszcensz oxigént produkál, mely a szabaddá vált szenet szén-dioxiddá oxidálja.



Telített, nyílt szénláncú *primer aminok* esetén a reakció a következőképpen írható le:

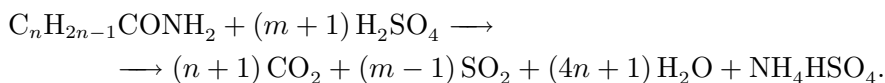


ahol:

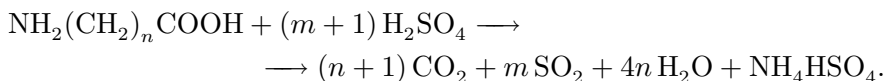
n = a szénatomok száma,

m = a szén- és hidrogénatomok számának összege az alkilláncban.

Amidok esetében a reakció a következő:



Aminosavak esetében pedig az alábbi folyamatok játszódnak le:



Többek megállapítása szerint a fehérjék átlagosan grammonként 9 g kénsavat fogyasztanak, ezért a roncsolást nagy feleslegben lévő tömény kénsavval kell végezni. A kénsavas roncsolás gyorsítását a reakció hőmérsékletének emelésével, oxidálóanyagok adagolásával, illetve katalizátorok alkalmazásával tudjuk elérni. Amennyiben a mintában lévő nitritet és nitrátot is meg kívánjuk határozni, ezeket az anyagokat redukálóanyagok segítségével tudjuk ammóniává konvertálni.

A roncsolás hőmérsékletének emelése. A kénsav forráspontja 338 °C, mely fölött az előzetesen ismertett reakcióegyenlet szerint bomlik. Amennyiben a forráspontot megemeljük, a bomlás és ennek következtében a molekuláris oxigén felszabadulása intenzívebbé válik, és ezért a roncsolás ideje lerövidül. Kihasználva az ismert törvényszerűséget, miszerint az oldatok forráspontja mindig magasabb, mint az oldószeré, sók adagolásával a forráspont emelhető, melynek következtében a roncsolási idő lerövidül, és néhány nehezen feltárható anyag nitrogéntartalmú vegyületei is ammóniává konvertálhatók. A különféle sók közül a legkedvezőbb eredményt a kálium-szulfát adagolásával érték el. A kénsav forráspontjának emelkedését a kálium-szulfát koncentrációjának növekedésével összefüggésben az 5.3. táblázat mutatja.

A *kálium-szulfát* adagolása nemcsak a forráspontot emeli, hanem a kénsavval is reakcióba lép a következő egyenlet szerint:



1 g K_2SO_4 a fenti reakció alapján 0,56 g H_2SO_4 -at fogyaszt, melyet a H_2SO_4 adagolásánál feltétlenül figyelembe kell venni. A kálium-szulfáton kívül kipróbálták még a nátrium-szulfátot, a lítium-szulfátot és a nátrium-tetraborátot is, azonban ezek semmilyen tekintetben nem bizonyultak jobbnak a kálium-szulfátnál. Amennyiben kálium-szulfát

5.3. táblázat. *A kénsav forráspont-emelkedése K_2SO_4 hatására*

$g K_2SO_4 / cm^3 H_2SO_4$	Forráspont °C
0	338
0,33	349
0,625	363
1,0	383
1,3	397
2,0	450

helyett nátrium-szulfátot használunk, a roncsolás végén megnő a bekrisztályosodás veszélye. Nem találták előnyösebbnek a különféle foszfátok adagolását sem, ráadásul ezek még több kénsavat fogyasztanak, mint a kálium-szulfát, savanyú sók képződése közben. A sók adagolásának határát oldhatóságuk szabja meg a roncsolásra használt kénsavban, ezért próbálkoztak más, nem illékony sav, pl. ortofoszforsav adagolásával is a hőmérséklet emelésére. A *kénsav-ortofoszforsav elegy* használata esetén azonban csökkent az oxidációs kapacitás és az oxidáció sebessége, ezért nem célszerű, ha az ortofoszforsav aránya a roncsoló elegyben meghaladja a 40%-ot. Ez az összeállítás azonban nem emeli jobban a hőmérsékletet a kénsavban oldott kálium-szulfátnál, ezért a gyakorlatban nem is terjedt el. Előnyösen lehet használni viszont a két módszer kombinációját, melynek során 80% kénsav és 20% ortofoszforsav elegyéhez cm^3 -enként 0,45 g kálium-szulfátot adunk, melynek során kedvező roncsolási hőmérsékletet és oxidációs kapacitást lehet elérni. Ebben az elegyben a roncsolás kezdeti hőmérséklete 354 °C, mely a roncsolás ideje alatt az oldószergőzök párolgása következtében folyamatosan nő. Az oldat forrásának hőmérsékletén percenként 0,081 cm^3 kénsav bomlik el, ilyenformán a roncsolás végére a 80:20 savarány 76:24-re változik, így a forrás hőmérséklete 364 °C-ra nő.

A roncsolás hőmérséklete a nyomás növelésével is fokozható megfelelő berendezésben, vagy leforrasztott üvegcsőben végzett műveletekkel. A *Kjeldahl*-féle roncsolást rendszerint hosszú nyakú, körte alakú *Kjeldahl*-lombikban végezzük, melynek során a lombik hosszú nyakán a vízgőz kondenzálódik, mely megakadályozza a roncsolt folyadék gyors bepárlódását. Zárt rendszerben végezve a roncsolást, lényegesen magasabb hőmérséklet érhető el minden forráspontemelő nélkül, mert *a nyomás emelkedése következtében a forrási hőmérséklet is emelkedik.*

A speciális anyagokat és eszközöket igénylő, balesetveszélyes roncsolást csak akkor érdemes alkalmazni, ha az lényeges előnnyel jár a *Kjeldahl* által kidolgozott roncsoláshoz képest. A *nyomás alatt* lévő roncsolás előnye lehet az, hogy *katalizátort nem szükséges alkalmazni*, ami kis mennyiségű nitrogéntartalmú anyagok meghatározásakor kaphat különösebb hangsúlyt. Ilyen esetben ugyanis a kis mennyiségű ammóniát desztillálással nagyon nehéz eltávolítani, titrálással pedig szinte lehetetlen meghatározni, ezért az ammónia meghatározására ilyenkor érzékeny kolorimetriás módszert kell alkalmazni. *A kolorimetriás módszereket* azonban (pl. *Nessler*-reakció) *zavarják a katalizátorok*, ezért itt rendkívül előnyös a katalizátor nélküli, nyomás alatti, magas hőmérsékleten történő roncsolás. A roncsolási hőmérséklet ezzel a módszerrel – forráspontemelők nélkül – is elérheti a 490 °C-ot, vigyázni kell azonban arra, hogy az 500 °C-ot ne lépje túl, ekkor ugyanis nitrogéngáz képződhet, mely alacsonyabb nyersfehérje-tartalmat eredményez. Nyomás alatt, leforrasztott csövekben csak száraz mintákat lehet roncsolni, az oldott állapotú anyagokat roncsolás előtt vákuumbepárlással vagy liofilezással be kell szárítani.

Oxidáló anyagok alkalmazása a roncsolás során. Már *Kjeldahl* eredeti módszerében is alkalmazott kálium-permanganátot a roncsolás utolsó szakaszában az oxidáció teljessé tétele érdekében. Utólag bebizonyosodott, hogy a kálium-permanganát nem hoz jelentős előnyt a tiszta kénsavval történő roncsoláshoz képest, ezért a módszer a gyakorlatban végül is nem terjedt el. A későbbiekben *az oxidáció meggyorsítására főként a hidrogén-peroxid, a perklórsav és a perszulfátok terjedtek el*. Nehéz volt annak megállapítása is, hogy a roncsolás melyik szakaszában célszerű az oxidálószer alkalmazni, hisz a vízelvonással járó elszenesedési szakaszban a nitrogén még nem konvertálódott ammóniává, redukciója nem tökéletes, így az oxidálószer gátolhatja a redukciót, különösen az oxidált nitrogénkötésekét. A roncsolási idő lerövidítésére irányuló fejlesztés azonban szükségessé tette a roncsolás elején alkalmazott oxidálószer használatát, mely nem bizonyult hátrányosnak olyan természetes anyagok esetében, amelyek nem tartalmaznak nagyobb mennyiségben oxidált nitrogént. *Különösen jó oxidálószernek bizonyult a hidrogén-peroxid*, melynek alkalmazása nemcsak a roncsolás sebességét növelte meg, hanem csökkentette a füstképződést is.

Kleeman módszere szerint kb. 1 g légszáraz vagy 5 g friss növényi vagy állati eredetű anyaghoz *Kjeldahl*-lombikban rázás közben 25 cm³

30%-os H_2O_2 -t töltünk, majd hozzáadunk 40 cm^3 koncentrált kénsavat. Az oxidáció és a kénsav hatására *az összes nitrogén 80%-a igen gyorsan ammóniává redukálódik*, 15 g kálium-szulfát adagolását követő 10–15 perces forralás pedig elegendő a nitrogén tökéletes redukciójára. Javasolják a tökéletes konverzió érdekében a 45 percig végzett forralást, melynek során a konverzió veszteség nélkül lejátsszódik, amit ismert mennyiségű $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -tal intenzív oxidatív körülmények között végzett kísérletekkel is igazoltak, melynek során nem tapasztaltak nitrogénvesztést.

A módszert többen módosították. *Huess* $1,75\text{ g}$ szárazanyagra 15 cm^3 30%-os hidrogén-peroxidot és 20 cm^3 tömény kénsavat, valamint 7–8 g kálium-szulfátot adott, mely roncsoló eleggyel 30–45 perc alatt tudott teljes feltárást elérni. Mások a hidrogén-peroxid adagolása mellett katalizátort, 0,5 g réz-szulfátot és 0,8 g higany(II)-szulfátot adtak a roncsoló elegyhez. A hidrogén-peroxidot a roncsolás megszakítása után csep-penként is adagolták a roncsoló elegyhez, amit a roncsolás folyamán többször megismételtek, és a hidrogén-peroxidot egy ötperces előroncsolás után is adták a roncsolt anyaghoz. A hidrogén-peroxid mellett a perklórsavat is hasonló hatásfokkal alkalmazták a roncsolás gyorsítására, melynek során 25 cm^3 tömény H_2SO_4 -hoz 2 cm^3 tömény HClO_4 -at és 1 g CuSO_4 -ot adtak, melynek következtében *az ammóniává történő konvertálás 3–4 perc alatt lezajlott*, a biztonságos konverzió miatt azonban legalább 15 perces forralást javasolnak.

Többen alkalmazták a perszulfátokat is a roncsolás gyorsítására. Ennek során a mintákat 15 cm^3 kénsavval addig roncsolták, amíg a fehér füstképződés meg nem szűnt, majd a lombikokat lehűtötték és a meghatározáshoz bemért anyag tízszeresének megfelelő $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ -ot adtak hozzá. Az oldat kitisztulásáig gyengén melegítették, majd ötperces intenzív melegítéssel elbontották a perszulfát felesleget. A perszulfát adagolásával óvatosan kell bánni, mert a túl nagy perszulfátfelesleg a roncsolás során nitrogénvesztést okozhat.

Redukálóanyagok alkalmazása a roncsolás során. Amennyiben a cél az összes nitrogéntartalom meghatározása, beleértve pl. a növényi minták nitrit- és nitráttartalmát is, ebben az esetben *a nitrátion nitrogénje csak redukcióval konvertálható a Kjeldahl-roncsolásban ammóniává*. A nitráton kívül redukcióra van még szükség az azo-, a nitro-, az oxim-, az izoxazol-, a hidrazin- és a hidrazoncsoportok nitrogénje meghatározásának esetében is. A redukciót a kénsavas roncsolás előtt, vagy a kénsavas roncsolással egyidejűleg lehet elvégezni. A roncsolás előtti

redukcióra fém cink, fém réz, TiCl_2 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ vagy benzoésav használható. Tapasztalatok szerint a nitrát redukciója hatékonyabb, ha benzoésav helyett fenolt használnak. Ezen kívül még a szalicilsavat és a fém cinket is javasolják a redukció fokozására.

Katalizátorok alkalmazása a Kjeldahl-roncsolás során. A módszer kidolgozását követően különféle fémek, fém-oxidok és -sók garmadájának katalitikus hatását vizsgálták a roncsolás idejének lerövidítése céljából. *A leghatékonyabb katalizátornak a higanyt és a szelént találták*, de jó hatásfokkal tudták a különféle rézsókat is alkalmazni a roncsolás idejének a csökkentésére. A fémek katalitikus hatékonyságának szempontjából az alábbi sorrendet állapították meg: Hg, Se, Te, Ti, Mo, Fe, Cu, V, W és Ag. Más vizsgálatok szerint a réz hatékonyabb katalizátornak bizonyult a szelénnél, és ugyan egyértelműen nem bizonyítható a katalizátorkeverékek fölénye az egyes katalizátorokkal szemben, *a gyakorlatban mégis különféle katalizátorkeverékek terjedtek el*. Ha az ammóniává átalakult nitrogén mennyiségét a roncsolási idő függvényében ábrázoljuk, egy olyan telítődési függvényt kapunk, amelyben az ammónia mennyisége kezdetben rendkívül gyorsan, majd egyre kisebb relatív sebességgel tart a minta abszolút nitrogéntartalmához. Az ammónia mennyiségének az időtengellyel csaknem párhuzamos szakaszát *utóforralásnak* hívjuk, melynek *során az ammónianitrogén-mennyisége aszimptotikusan közeledik az abszolút nitrogénhez*. Az utóforralás idejét néhányan több napban állapították meg, és a nehezen feltárható anyagok (piridin, nikotinsav) esetében a tökéletes konverzióhoz a kitisztulás után legalább 3–4 óra utóforralást tartottak szükségesnek. Katalizátorok alkalmazásával és a *forráspontemelő* K_2SO_4 használatával az utóforralási szakaszt jelentősen le lehet csökkenteni. A roncsoláshoz használt sav mennyisége is befolyásolhatja a mérés pontosságát, hisz ha az utóforralás végén nem áll elegendő savmennyiség rendelkezésre, és így nem tudja a keletkező ammóniát megkötni, akkor jelentősebb a veszteség, ha a KHSO_4 és a katalizátor betöményedése következtében a roncsolás szilárd fázisban fejeződik be. Célszerű, ha a roncsolás befejezésekor a roncsoláshoz bemért sav mennyiségének egyharmada még megmarad a feltárt oldatban. Azonos jellegű vizsgálati anyagok nagyobb sorozatainak elemzésekor célszerű a roncsoláshoz szükséges sav optimális mennyiségét és az utóforralás idejét megállapítani, és ezzel az ammóniavesztéséget csökkenteni.

A különböző országokban más-más szabványok érvényesek a nyersfehérje-tartalom meghatározására. Az alapelv szinte mindenütt ugyanaz,

azonban az egyes országokban némi eltérések mutatkoznak a szabványos módszerek között. Általánosságban az ammónia feltárására az alábbi katalizátorkeveréket használják: 0,7 g higany-oxidot vagy 0,65 g fém higanyt, 10 g kálium-szulfátot vagy vízmentes nátrium-szulfátot adnak 2,2 g mintára, és a feltárást 25 cm³ kénsavval végzik. Nagyobb mintabemérés esetén további 1 g mintára még 10 cm³ kénsavat adagolnak a roncsolóelegyhez. Német területen a higany helyett a réz és a szelén keverékét alkalmazzák. A kénsavhoz hozzáadott adalék 10 g kálium-szulfátból, vagy vízmentes nátrium-szulfátból, 0,5 g CuSO₄ · 5H₂O-ból és 0,3 g szelénből áll. 1 g anyaghoz, illetve 3 g fehérjében szegény mintához 25 cm³ tömény kénsavat adagolnak, az erős habképződést 0,5 g paraffin adagolásával akadályozzák meg.

Az elmúlt tíz évben a környezetvédelmi előírások fokozott betartatása, és a higany-szulfid csapadék igen drága megsemmisítése miatt *a higannyal történő katalízis teljes mértékben visszaszorult*, és csak speciális esetekben használják kisszámú minta nitrogéntartalmának meghatározására.

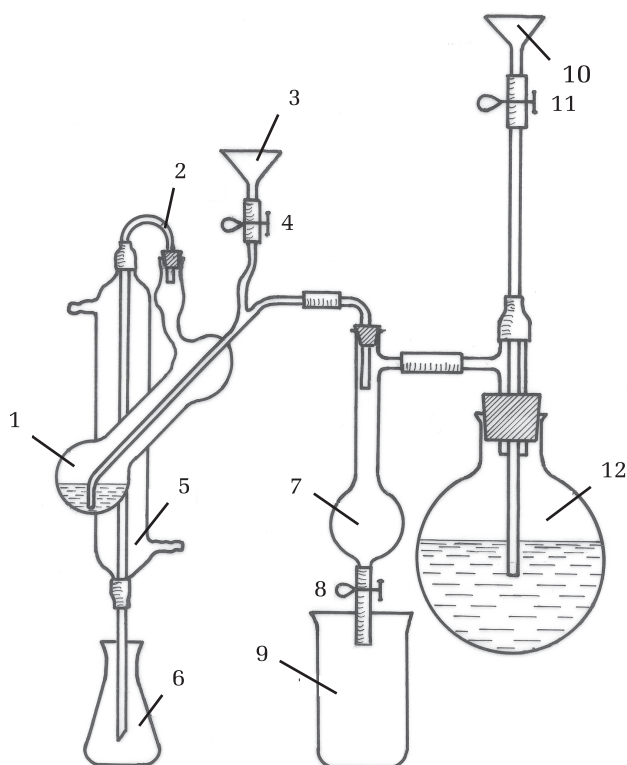
5.2.2.2. A roncsolásban képződött ammónia meghatározása

A roncsolásban képződött ammónia meghatározása titrálással.

A Kjeldahl-féle nyersfehérje-meghatározás következő művelete a képződött ammónia meghatározása, melyet titrálással, fotometriásan, illetve ionszelektív elektród alkalmazásával is elvégezhetünk. Az ammónia titrimetriás meghatározása során az ammóniát vagy elválasztjuk a roncsolt oldatból desztillálással és a ledesztillált oldat ammóniatartalmát határozzuk meg, vagy az ammóniát közvetlenül a roncsolt folyadékból mérjük.

A desztillációt alkalmazó módszereknek három változatát ismerjük. *Az ammónia közvetlen desztillálása, az ammónia vízgőz-desztillálása, illetve a diffúziós ammónia-elválasztás.* A makro meghatározási módszereknél a Kjeldahl-lombikot desztilláló lombikként használva, közvetlen desztillálást alkalmaznak. Ennek során az elroncsolt anyag teljes mennyiségéből 30–50%-os nátrium-hidroxid- vagy kálium-hidroxid-oldattal szabadítják fel az ammóniát, és az összes ammóniatartalmat meghatározzák. Mikromódszereknél a roncsolás utáni folyadékot ismert térfogatra hígítják, és az ammóniát ennek aliquot részéből szabadítják fel. Higanytartalmú katalizátor esetén *a higanyt nátrium-tioszulfát segítségével a roncsolt folyadékból le kell választani*, mert a higany

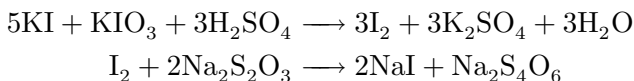
komplexet képez az ammóniával, és jelenléte a lúgosított oldatban ammóniaveszteséget okozhat. A higany lecsapására a nátrium-tioszulfát mellett kálium-szulfid (K_2S) is használható. 1 g higany lecsapásához mintegy 0,2 g $Na_2S_2O_3$ szükséges. Higanykatalizátor alkalmazása esetén az ammóniaveszteség úgy is elkerülhető, ha a desztillálandó lúgos oldathoz cinkport adunk, a cink ugyanis a lúgos közegben képződött higany-oxidot fémhigannyá redukálja. A higanykatalizátorok hátránya még az is, hogy a higany-szulfid csapadék a desztillálólombikból csak nehezen távolítható el, össze kell gyűjteni, és mint a környezetre rendkívül veszélyes anyagot meg kell semmisíteni. A *Parnas*-féle desztillálókészülék összeállítását az 5.4. ábra mutatja.



5.4. ábra. A Parnas-féle ammóniadesztilláló készülék (1. desztillálólombik, 2. kvarccső-csatlakozás, 3. tölcsér, 4. szorítócsap, 5. vízűtőköpeny, 6. gyűjtőpohár, 7. kondenzvízgyűjtő, 8. szorítócsap, 9. gyűjtőpohár, 10. tölcsér, 11. csap, 12. gőzfejlesztő lombik)

Az ammónia közvetlen desztillálása a desztilláció fajtájától függően 5–10 perc alatt megvalósítható. Hasonló idő szükséges a mikro- és a fél-mikro összes nitrogén meghatározása során is az ammónia maradéktalan átdesztillálásához.

A klasszikus *Kjeldahl*-módszer szerint az ammóniát ismert térfogatú és koncentrációjú kénsavban nyeletjük el, a kénsavfelesleget pedig jodometriásan határozzuk meg az alábbi reakcióegyenletek szerint:



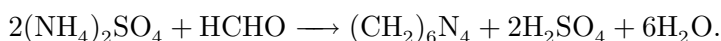
Egyszerűbb megoldás az, ha az ammóniát ismert térfogatú és koncentrációjú kénsavban elnyeletjük, és a savfelesleget acidimetriásan határozzuk meg. Az ammónia elnyeletésére *Winkler* a bórsavas módszert javasolta, melynek során az ammóniát 4%-os bórsavban fogják fel. A bórsavoldat pH-ja 4,7-ről 8,6-ra változik akkor, ha az első hidrogénion mennyiségének kb. 20%-át helyettesíti az ammóniumion. Ennek következtében a *bórsavoldatban az ammónia alkalimetriásan titrálható*, tehát a rendkívül gyenge sav csak az ammónia veszteség nélküli megkötését segíti elő, de az alkalimetriás meghatározást nem zavarja. Az ammónia meghatározása során különféle indikátorokat, illetve indikátorkeveréket használnak. Javasolják a metilnarancs- vagy kongóvörös-indikátort, a brómfenolkéket, valamint a 0,2% metilvörös és a 0,1% metilénkék 1:1 arányú keverékét, mellyel a 4,7 pH-s ekvivalenciapont jól jelezhető. Ez az utóbbi indikátorkeverék a tiszta bórsavban lila színű, az átmeneti szín szürkés lesz, 4,7 pH felett pedig almazöld színűre vált át. Javasolták még ezen túl az egy térfogat 1%-os metilvörös, a három térfogat 1%-os brómkrezolzöld és a négy térfogat desztillált víz elegyét is a titrálás végpontjának a meghatározására, melynek során az indikátorkeverék színe kékesszürkéről ibolyára vált át.

A *Parnas–Wagner-féle mikromódszer* esetében a feltárt kénsavas oldatot megfelelően hígítjuk, majd ennek aliquot részét mérjük a desztilláló készülékbe. Az ammóniát 0,1–0,01 M H_2SO_4 vagy 3%-os bórsavoldatban fogjuk fel, a kénsavfelesleget pedig nátrium-hidroxiddal, a bórsavban kötött ammóniát pedig 0,01 M kénsavval titráljuk metilvörös-metilénkék indikátor jelenlétében.

Kis mennyiségű (0,1–100 μg) ammóniatartalom meghatározására alkalmas a *Conway* által kidolgozott *diffúziós módszer*. A *Conway*-csészék segítségével 20 °C-on mintegy három óra alatt lehet a mintában lévő

ammóniát a minta mellett elhelyezett bórsavoldatba átdiffundáltatni. A módszer alkalmas a sorozatvizsgálatra, ennek ellenére a fehérjeanalitikában jobbra csak a mikrobiális nitrogén-anyagcsere tanulmányozása során alkalmazzák.

Az ammónia titrimetriás meghatározásának ritkán használt módszere a *formolitrálás*, melynek során az ammónium-szulfátból formaldehid hatására kénsav szabadul fel, melynek mennyiségéből az ammóniára lehet következtetni:



A formolitrálás gyakorlati végrehajtása során a felhígított, roncsolt folyadékot metilvörös-indikátor jelenlétében semlegesítik, a semlegesített oldathoz formaldehidet adnak, majd a felszabadult kénsavat fenolftalein-indikátor jelenlétében meghatározzák. A semlegesítéshez és a fenolftalein átcsapásához szükséges savmennyiség különbsége egyenértékű az ammóniával.

A roncsolásban képződött ammónia meghatározása fotometriásan.

Az ammónia meghatározására előzetes desztilláció nélkül kolorimetriás vagy spektrofotometriás módszerek alkalmasak. Ultramikro-mennyiségek meghatározására, rendkívüli érzékenységüknel fogva, ezek a módszerek a desztillációs módszereknél alkalmasabbak. Míg a különböző titrálási módszerek érzékenysége 2,8 μg nitrogénnek felel meg, addig az ammónia és a ninhidrin rendkívül érzékeny reakciójával 1 cm^3 végtérfogatban 570 nm-en 0,007 μg nitrogén még jól mérhető a fényabszorpció alapján. Hátránya a kolorimetriás, illetve spektrofotometriás módszereknek viszont az, hogy az ammónia színreakcióit számos vegyület, így pl. a roncsolás során használt katalizátorok is zavarhatják. A sok színreakció közül mennyiségi meghatározásra a *Nessler*-reagenssel adott színreakciót, az indofenolreakciót, illetve a ninhidrinreakciót használják.

A *Nessler-reagensből* (kálium-[tetra-jodo-merkurát(II)] lúgos oldata) ammónia hatására higany(II)-oxid-ammónium-jodid keletkezik, mely kevés ammónia jelenlétében sárga, többnél narancsszínű színeződés, sok ammónia jelenlétében pedig barnásvörös csapadék.

A *Kjeldahl*-roncsolással kapott kénsavas oldatot a „*Nesslerizálás*” előtt hígítani és semlegesíteni kell. A *Nessler-módszer* használata különösen akkor *előnyös*, ha a meghatározandó nitrogén mennyisége 10–100 μg között található. A módszer hátránya, hogy a *Nessler*-reagens

hosszabb ideig nem tárolható, a színreakció intenzitása pedig függ a reakció idejétől, a reagens mennyiségétől, a reakcióelegy hőmérsékletétől, az oldatban lévő ionok minőségétől és koncentrációjától, valamint az oldat pH-jától. A minta fényelnyelését ezért mindig azonos kísérleti körülmények között a mérésel egyidejűleg felvett standard alapján kell meghatározni. A színes oldat fényabszorpciójának maximuma 400–500 nm. A különböző módszerek a mérést 430–450 nm hullámhosszon javasolják. A mérések során még optimális körülmények között is észlelhető zavarosodás a színreakció kifejlődése során, melyet stabilizátorok adagolásával akadályoznak meg. Régebben gumiarábikum-oldatot, újabban tartarát- és cianidion-tartalmú oldatokat használnak stabilizátorként. Amennyiben a roncsolásban képződött ammóniát neszlerizálással kívánjuk meghatározni, akkor olyan roncsolási módszert kell alkalmazni, mely esetében a színreakcióhoz használt végső hígításban a katalizátorok és a kálium-szulfát koncentrációja alacsony.

Johnson az alábbi módszert javasolja 10–40 μg nitrogént tartalmazó anyag nitrogéntartalmának meghatározására. 18×150 mm-es Pyrex kémcsőbe bemérjük a 10–40 μg nitrogént tartalmazó anyagot vagy oldatot, és 10 cm^3 2M H_2SO_4 -at adunk hozzá, mely literenként 0,2 g CuSeO_3 -et tartalmaz, a kémcsőre üvegfedőt teszünk és egy éjszakán keresztül homokfürdőn vagy alumíniumtömbben 100–115 °C-on roncsoljuk.

A réz-szelenit helyett használható CuSO_4 és nátrium-szelenit ekvivalens keveréke is. A víz nagy része gyorsan bepárlódik, melyet követően a koncentrálnódó kénsav kb. 3 cm magasságot foglal el a kémcsőben. A roncsolás befejezése után a lehűtött oldathoz 2 cm^3 vizet, 2 cm^3 *Nessler*-reagenst, majd 3 cm^3 2M nátrium-hidroxidot adunk, 15 perc állás után az oldatot küvettába öntjük, és 490 nm hullámhosszúságon mérjük a fényelnyelést. Minden sorozattal együtt vakmeghatározást és nitrogénstandard elemzést is végzünk. A 45 μg nitrogénnél kevesebbet tartalmazó minták esetén a fényelnyelés a *Lambert–Beer*-törvényt követi, a koncentráció és az extinkció összefüggése ebben a tartományban lineáris. A meghatározás hibája $\pm 3\%$. Nagyon kis nitrogéntartalom esetén a roncsoláshoz 2 cm^3 1M H_2SO_4 -at használunk, nehezen roncsolható anyagok feltárását pedig egy-két csepp nitrogénmentes 30%-os hidrogén-peroxidral segíthetjük elő.

Az eljárás során használt *Nessler*-reagens stabilis, mivel a lúgot csak a reakció közben adjuk a vizsgálati anyaghoz. A *Nessler*-reagenst a következőképpen készítik: 4 g KI-ot és 4 g HgI_2 -ot feloldanak 25 cm^3

vízben, majd hozzáadnak 750 cm³ vízben feloldott 1,75 g gumiarábi-kumot, 1 dm³-re feltöltik, majd nitrogénmentes szűrőpapíron szűrik.

Minari és Zilversmit a neszlerizálás során létrejövő *zavarosodás elkerülésére kálium-cianidot használt*. Ezek szerint: a roncsoló oldat előállításánál 4 g kálium-szulfátot és 0,5 cm³ szelén-oxid-kloridot 125 cm³ vízben oldunk, majd 125 cm³ tömény H₂SO₄-at adunk hozzá. Szilárd minták roncsolása esetén ötszörösére hígítjuk. *A stabilizált Nessler-reagens készítését az alábbiak szerint javasolják:*

- A-oldat: 22,5 g jódot feloldunk 20 cm³ víz és 30 g kálium-jodid oldatában, az oldódás után 30 g fém higanyt adunk hozzá, erőteljesen rázzuk, időként csapvíz alatt hűtjük. A felülúszó folyadék fokozatosan veszít sárga színéből, ha már alig látható a szín, néhány cseppel és keményítőoldattal ellenőrizzük a jód jelenlétét. Ha nincs többé jódreakció, az oldatot vízzel 200 cm³-re hígítjuk.
- B-oldat: 10%-os nátrium-hidroxid oldat.
- Használati reagens: 200 cm³ A-oldathoz 975 cm³ B-oldatot adunk, majd ülepedés után a tiszta oldatot használjuk reagensként. A stabilizált *Nessler*-reagenst úgy állítjuk elő, hogy 1 dm³ *Nessler*-reagensben feloldunk 976,7 mg kálium-cianidot, amely 0,015 mólnak felel meg. A KCN-dal stabilizált *Nessler*-reagens sötét üvegben, hűtőszekrényben hat hónapig is eltartható.
- Nitrogén standard: 707,9 mg (NH₄)₂SO₄-ot 100 cm³ 0,05M H₂SO₄-ban oldunk, e törzsoldat százszorosra hígítva köbcentiméterenként 15 μg nitrogént tartalmaz.

A nitrogénmeghatározás kivitelezése során a 3–30 μg nitrogént tartalmazó mintát 16×150 mm-es körjelekkel ellátott vastag falú kémcsőbe töltünk, majd folyadék esetében 0,2 cm³ roncsolóoldatot adunk az oldathoz, szilárd anyag esetében pedig 1 cm³ hígított roncsolóoldatot használunk. A kémcsövet 110 mm mély alumíniumtömbben 120–150 °C-ra hevítjük, miközben a víz nagy része elpárolog. A kb. 0,5 cm³-es maradékot tartalmazó kémcsöveket 75 mm mély alumíniumtömbben 250–300 °C-ra melegítjük, melynek folyamán a kénsavgőzök a kémcső falán kondenzálódnak. Egy-két órás melegítés után teljesen tiszta oldatot kapunk, mely kész a neszlerizálásra. Alumíniumtömbök helyett szükség szerint megfelelő mélységű homokfürdőt is használhatunk. A neszlerizálás során a feltárt oldatot szobahőmérsékletűre hűtjük, 3 cm³ vízzel hígítjuk és 3 cm³ *Nessler*-reagenst adunk hozzá, összerázzuk és szobahőmérsékleten 30 percig állni hagyjuk. Hasonló módon készítjük el

a vakpróbát és a standardot is. Az oldatok fényelnyelését 420 nm hullámhosszon mérjük a vakpróbával szemben. A módszer alkalmas a szabad ammónia meghatározására roncsolás nélkül is, pl. élővizekből.

A Nessler-reakció mellett az *indofenol-reakciót* is elterjedten használják az ammónia meghatározására és közvetett fehérjemeghatározásra is a különböző analitikai eljárásokban. A reakciót *Berthelot* már 1859-ben leírta, mely szerint az oxidáló hipobromit jelenlétében a fenolból és az ammóniából p-nitrozo-fenol képződik, ami lúgos közegben *világoskék színű indofenol alkálisóvá alakul*. Az indofenol-képződés sebességét a hőmérséklet és az idő nagymértékben befolyásolja, és a reakciót a Mn^{2+} -ionok is katalizálják. Az indofenol-reakció az összes nitrogén meghatározására, főként az automatizált analitikában terjedt el, de használható hagyományos módon egyedi minták analízisére is. A különféle módosítások fenolt, szalicilsavat, esetleg timolt használnak, oxidáló közegként pedig a hipobromit mellett nátrium- vagy kálium-hipokloritot is. A módszert fenol és hipoklorit hozzáadásával *ultramikro eljárássá fejlesztették* és igen kis mennyiségű fehérjék analízisére alkalmazták.

Az indofenol-reakció alapján *Mann olyan módszert fejlesztett ki, amely 1–15 μg közötti nitrogén meghatározására alkalmas*. A színreakcióhoz a végső hígítás 0,1–1,5 μg nitrogénnek megfelelő ammónia cm^3 -enként, mely koncentrációban a képződött fenol-indofenol fényelnyelése 630 nm-en mérve követi a *Lambert–Beer-törvényt*. A nitrogén meghatározást a *Kjeldahl-feltárásból* az alábbiak szerint végezhetjük.

Reagensok:

- Feltáró oldat: 20 cm^3 tömény H_2SO_4 , 19 g K_2SO_4 , 0,4 g HgO.
- Finom cinkpor.
- Nátrium-fenolát reagens: 6 g frissen desztillált fenolt 50 cm^3 jég-hideg desztillált vízben feloldunk, majd 3,8 g Na_3PO_4 -ot és 2,9 g NaOH-ot adunk hozzá.
- $4,2 \cdot 10^{-4}M$ nitroprusszid-nátrium-reagens.
- 0,015M NaOCl-reagens.

Roncsolás és meghatározás: Az 1–10 μg nitrogént tartalmazó vizsgálandó anyagot 18×150 mm-es, vastag falú kémcsőbe mérünk vagy pipetázunk, és 0,5 cm^3 feltáróoldatot adunk hozzá. A víz elpárolgásáig 120 °C-os fűtőtömbben melegítjük, majd a hőmérsékletet 345–350 °C-ra emeljük. Egy óra alatt a roncsolás általában befejeződik, de ha szükséges, még 0,05 cm^3 kénsavat adunk hozzá, és a feltárást további melegítéssel befejezzük. Lehűlés után 1 cm^3 vizet, majd rázás közben 25–50 mg cinkport adunk a kémcsövekbe, majd a feltárt oldatot 20–40 másodpercig

erősen forraljuk. A kémcsöveket szobahőmérsékletre hűtjük, és egy éjszakán át állni hagyjuk.

Az oldatot 3–5 °C-ra lehűtve fenolftalein-indikátor jelenlétében 0,4M NaOH-dal semlegesítjük, a kémcsövek tartalmát pedig desztillált vízzel 6 cm³-re egészítjük ki. Minden kémcsőbe 1 cm³ nátrium-fenolát reagenst pipettázunk, összerázzuk, majd 1 cm³ nitroprusszid-nátrium-reagenst, végül 2 cm³ NaOCl-reagenst adunk hozzá. A kémcsöveket zárjuk, 30 percig 40 °C-os vízfürdőn tartjuk, majd 5 percig hidegvízben lehűtjük, a kivált Zn(OH)₂ csapadékot lecentrifugáljuk és mérjük a tiszta oldat fényelnyelését 630 nm-en desztillált vízzel szemben. A standardoldatsorozatot (NH₄)₂SO₄-ból hasonló módon készítjük.

Mivel a színreakció intenzitása a pH-tól, a hőmérséklettől, a reagensek koncentrációjától, különösen a bomlékony NaOCl koncentrációjától függ, ezért ennek beállítását jodometriás titrálással minden vizsgálati sorozat előtt el kell végezni. Egyesek a fenol-hipoklorit reakció helyett a timol-hipobromit reakciót előnyösebbnek tartják, mások fenol helyett nátrium-szalicilátot, a hipohaloid oxidálószer helyett pedig nátrium-diklór-cianurátot használnak nitroprusszid-nátrium jelenlétében. *Az indofenol-reakció az alapja a sorozatvizsgálatra alkalmazott spektrofotometriás ammónia-nitrogén meghatározásnak*, melyet különböző automatikus elemző berendezések esetén használnak.

A roncsolásban keletkezett ammónia meghatározására alkalmas a *ninhidrines módszer* is, melyet Moore és Stein az α -aminocsoport meghatározására dolgozott ki. Ezt a rendkívül érzékeny reakciót az ammóniumion is adja, így az ammónia a bázisos aminosavak elválasztása során meghatározható. A ninhidrinreakció ugyan érzékeny a közeg pH-jára, előnye azonban, hogy az anionok és a kationok hatása a reakcióra elhanyagolható. Az ammónia-ninhidrin komplex abszorpciója 570 nm-en a legnagyobb.

A roncsolásban képződött ammónia meghatározása ionszelektív elektróddal. Az elmúlt évtizedekben számos ionra fejlesztettek ki olyan szelektív membránelektrodokat, melyek az ionkoncentráció gyors meghatározását teszik lehetővé. Az ionszelektív elektróddal történő mérés a potenciometriás módszerek közé tartozik. A méréshez az ionszelektív elektródon kívül még egy referencia-elektrodra is szükség van, és e két elektróda a mérőrendszert együttesen alkotja. A pH-mérésnél használt kombinált elektróddal ellentétben az ionszelektív méréstechnikában nem kombinált elektródokat használnak, hanem külön ionszelektív

és külön referencia-elektrod alkalmazására kerül sor. Az ionszelektív elektrod potenciálja a mintában lévő mérendő ion aktivitásától függ, mely potenciál nagyságát a *Nernst*-féle képlettel lehet leírni:

$$E = E_o + \frac{RT}{nF} \ln a,$$

ahol:

E = az elektrod potenciálja,

E_o = az elektrod normálpotenciálja,

R = egyetemes gázállandó (8,314 J·mol⁻¹·K⁻¹),

T = abszolút hőmérséklet (K),

n = a mérendő ion töltésszáma,

F = *Faraday*-féle állandó (96 496 Coulomb),

a = a mérendő ion aktivitása (mol/dm³).

A referencia-elektrod és az ionszelektív elektrod potenciáljának különbségét egy mérőeszköz méri, mely feszültségérték arányos a mérendő ionaktivitással.

Az elektrod legfontosabb része egy ionszelektív membrán, melynek anyaga a mérendő ion rosszul oldódó vegyületéből áll, mely a szilárdtest-elektrodok esetében lehet egy szervetlen só, üvegelektrodok esetében egy speciális üveg, mátrix-elektrodok esetében pedig egy szerves ioncserélő anyag. Az elektrod mintába kerülésekor *a membrán felületén egyensúlyi állapot áll be az oldott ionokra vonatkozóan*. Minél nagyobb a mintában lévő ionok aktivitása, annál több mérendő ion található a membrán felületén, melyek a membránt feltöltik. Az elektrodok szelektivitása a membrán csökkenő oldhatóságával növekszik. A keresztérzékenységet és az elektrodmérgeződésekkel olyan anyagok okozzák, amelyek a membrán anyagával reagálva a mérendő ionnál kevésbé oldható anyagot tudnak képezni. Azok az ionok, amelyek a membrán anyagával jobban oldódó anyagot adnak, mint a mérendő ion, a mérést csak igen nagy feleslegben zavarják, de az elektrod mérgeződését nem okozzák.

Az ammóniumionok koncentrációjának mérése esetén (és más ionok koncentrációjának mérésekor is) a referencia-elektrod potenciáljának függetlennek kell lennie a minta anyagától, hisz *az ionszelektív elektrod potenciálját mindig a referencia-elektrod potenciáljához méri*. A referencia-elektrod az úgynevezett normál hidrogénelektrod; ez egy platinakorommal bevont fém-platinaelektrod, amely 1 mol/dm³ koncentrációjú sósavoldatba merül, miközben 0,1 MPa nyomású hidrogéngázt buborékoltatunk rajta keresztül. A *gyakorlatban* azonban

az *Ag/AgCl referencia-elektrodot használjuk*, amely egy tömény klorid-oldatba merülő ezüst-klorid réteggel bevont ezüstdrótból áll, és klorid-szelektív elektródként a klorid koncentrációjának megfelelő potenciált adja. A vonatkoztatási elektrolit egy diafragmán keresztül áll kapcsolatban a mérendő mintával, mely érintkezési ponton történik a méréshez szükséges elektródok közötti töltésátvitel. Az ionszelektív mérésekhez csiszolatos diafragmájú referencia-elektrodokat használnak, melyeknél ugyan a pH-méréseknél nagyobb diffúziós potenciálok alakulnak ki, de a potenciálok reprodukálhatósága lényegesen jobb.

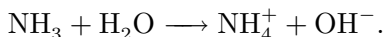
Az ionszelektív elektróddal történő méréskor létrehozuk az *elektrod kalibrálási görbét*, mely a koncentráció logaritmusának függvényében az elektródpotenciált ábrázolja. A kimutatási határ közelében lévő nagyon kis koncentrációnál az elektród potenciálja gyakorlatilag alig változik, a mérendő ion koncentrációjának növekedésével azonban a potenciált egyre inkább a mérendő ion határozza meg. A *lineáris szakaszban* a potenciál egyenletesen változik a koncentráció logaritmusának függvényében, melynek során a *potenciált kizárólag a mérendő ion koncentrációja határozza meg*. Nagyon magas koncentrációtartományban a lineáris szakasz egy nemlineáris szakaszba vált át, melynek következtében e koncentrációk az ionszelektív elektróddal nem mérhetők.

A legtöbb ionszelektív elektród szilárdtest-elektrod, melynek membránját egy nehezen oldódó szervesen só alkotja. Néhány ion esetében a membrán anyagát speciális üveg vagy PVC-vel polimerizált szerves ioncserélők alkothatják. Néhány esetben, pl. az ammóniumionok meghatározásánál, olyan szenzorokat alkalmaznak, melyek a gáznemű állapotba átjutott anyagokkal reagálnak; ezek az úgynevezett gázérzékeny elektródok. A *gázérzékeny elektródok* valójában nem is ionszelektív elektródok, mert ezekkel nem az ionok koncentrációját, hanem a *gázok parciális nyomását mérik*. A gázérzékeny elektróda alkotóeleme egy speciális felépítésű pH-üvegelektrod, mely az Ag/AgCl referencia-elektroddal közösen merül egy speciális elektrolitoldatba, amelyet egy gázáteresztő membrán választ el a mérendő mintától. A mérés során a meghatározandó iont a pH beállításával gázállapotba viszünk; ammóniumionok esetében a következő módon:



A keletkező gáz nyomása függ a koncentrációtól és a mérés során uralkodó légnyomástól. A parciális nyomástól függően a gáz az

elektród elektrolitterébe diffundál, és megváltoztatja a membrán és a pH-elektroda közötti diffúziós réteg pH-értékét, ugyanis itt a következő reakció játszódik le:



A beépített pH-elektroda megváltozott jeléből következtetnek vissza a mintában lévő ammóniumion koncentrációjára. Az ammónium gáz-érzékelő elektróda esetén az alap elektród a hidrogénion szelektív üvegelektrod. A reakcióréteg 10^{-2} mol/dm³ ammónium-klorid-oldat, a detektálás alsó határa 10^{-6} mol/dm³, az optimális pH-érték 12, és a meghatározást zavarják az illó aminok. *A gázérzékelő elektródok szelektivitása nagyobb*, mint bármely más elektróda típusé, ugyanis csak a keletkező gáz diffundál át a membránon az elektróda elektrolit terébe, melynek koncentrációját a minta pH-értékének megváltozása révén méri meg, melynek következtében keresztérzékenységből származó mérési hiba nem léphet fel. A gázérzékelő elektródokat is zavarhatja azonban a minta sótartalmától függő ionerősség, ugyanis az ozmózisnyomás miatt vízgőztranszport indul meg a töményebb oldatba, mely azt lassan felhígítja. Az elektrolitoldatok hígulása és töményedése főleg a membrán diffúziós rétegeire van hatással. A minta túl alacsony ionerősségét kondicionáló-oldat hozzáadásával lehet az elektrolitok ionerősségére emelni, a nagyobb ionerősségű mintákat pedig megfelelő mértékben hígítani kell. Óvatosnak kell lenni a 13-nál nagyobb pH-tartományban végzett mérésnél az ammónia-szelektív elektróddal, mert a membrán egy idő múlva megdagad, és ekkor a pórusméretek csökkennek. Az ammónia mérésekor további *problémát okoznak a nehézfémek*, melyek egyrészt *amino-komplexekben megkötik az ammóniát*, másrészt pedig a membránon kicsapódva nehézfém-hidroxid lepedéket alkotnak. E jelenség meggátolható, ha a mintához 1,5%-os EDTA-oldatot adagolnak.

A hőmérséklet is jelentős mértékben befolyásolja az elektródpotenciált, ezért nagyon lényeges, hogy a minta és a kalibráló oldatok hőmérsékletének különbsége a ± 2 °C-ot ne haladja meg. Ebben a hőmérséklettartományban a hőmérséklet okozta hiba kisebb mint 1,5%. A minta előkészítése során ügyelni kell arra, hogy némely elektróda esetén bizonyos feltételek szükségesek ahhoz, hogy a mérés végbemehessen. Az ammóniumionok méréséhez elengedhetetlen a megfelelő pH-beállítás, és az adott ionerősség beállításával megteremtődik a stabil vonatkoztatási potenciál előfeltétele. A mintaelőkészítésnek célja az is, hogy a mintát a befolyásoló tényezőkre úgy kondicionálják, hogy

a mérés ideális körülmények között mehessen végbe. Célszerű, ha mind a standardoldatot, mind a minta ionerősségét desztillált vízzel történő hígítással vagy ionerősség-beállító oldatok segítségével azonos koncentrációra hozzuk. A pH-értéket tekintve úgy tűnik, hogy minden meghatározáshoz tartozik egy különösen előnyös pH-tartomány, melynek beállítása pH-pufferek hozzáadásával történhet. Az erősen savas vagy lúgos oldatokat a pH-beállítás előtt hígítani kell, nehogy túlságosan megemelkedjen az ionerősség a pufferek hatására keletkező sók miatt. Zavaró ionok – az elektróda megmérgeződését vagy keresztérzékenységet okozva – a mérést zavarják. A minta megfelelő előkészítése után következhet a mérés, amely háromfajta módszerrel valósítható meg.

Az ammóniát (ammóniumion) direkt módszerrel, közvetlenül mérjük, vannak azonban indirekt módszerek is, amelyeknél egy indikátorionra van szükség, mivel az elektróda a mérendő ionra nem reagál. Az ammónia meghatározása során felvett *kalibrációs görbe lineáris szakaszán célszerű a mérést elvégezni*. A kalibrációs görbéhez a lineáris szakaszban elegendő kevesebb (kettő-három), a nemlineáris tartományban pedig öt standardoldat használata. A standardoldatok mérését követően, *az elektródfeszültséget a koncentráció logaritmusának függvényében ábrázolva, kapjuk meg a kalibrációs egyenest*. A kalibrációra használt standardoldatok ionerősségének, hőmérsékletének és pH-jának meg kell felelnie a mérendő minta hasonló paramétereinek. A mintába helyezett elektródák közti feszültséget mérve, majd azt a kalibráló egyeneshez hasonlítva, a koncentráció közvetlenül számolható.

A *Kjeldahl*-roncsolás során keletkezett ammóniumionok meghatározására jól használható pl. az OP-NH₄-0711P típusú ammónium-szelektív elektród, mely 10⁰–10⁻⁶ mol/dm³ tartományban használható, és amelynek reprodukáló képessége a nagyobb koncentrációtól a kisebb felé haladva ±0,02–0,05 pNH₄. Az elektróda szelektivitása a szelektivitási állandóval jellemezhető, mely azt a mérendő ion/zavaró ion koncentrációarányt fejezi ki, amelynél nagyobb koncentrációhányados esetén az elektród szelektív a mérendő, jelen esetben az ammóniumionra nézve. A szelektivitási állandó káliumionok jelenlétében 1,5·10⁻¹, ami azt jelenti, hogy a mérés káliumionok jelenlétében akkor hajtható végre, ha az ammóniumionok koncentrációja eléri vagy meghaladja a káliumion-koncentráció 0,15-szeresét. A szelektivitási állandó nátriumionra 5,5·10⁻³. E két ionon kívül más ionokkal nem nagyon kell számolni, hisz e két ion forráspont-emelőként kerülhet a *Kjeldahl*-roncsolás során az oldatba.

Az elektród előkészítése során az elektródtestet az elektródkábellel összekötjük, majd a tömítőgyűrűk segítségével a membránt az elektród alsó részénél rögzítjük. Ezt követően egy 2 cm³-es fecskendő segítségével a membrán feletti részt FIL-NH₄-1 töltőoldattal megtöltjük, majd a kupakot buborékmentesen visszacsavarjuk. Az összeszerelt, buborékmentes elektródot néhány órán át 0,01 mol/dm³ koncentrációjú ammónium-klorid-oldatban áztatjuk, melyet követően az elektród négyöt hétig működőképes, majd mérőképességét elveszíti, amit a mérések reprodukálhatatlansága jelez.

A mérések során kialakított mérőcella az előzőek szerint összeszerelt ammónium-ionszelektív elektródból és a vonatkoztatási elektródból áll, melyek egy pohárban lévő mérőoldatba merülnek. Az ismeretlen minta mérése előtt kalibrációs egyenest kell felvenni, melynek során ismert ammóniumion-koncentrációjú standardoldatokat használunk. Az azonos típusú elektródok kalibrációs adatai nem azonosak, ezért *minden elektróda esetében egyedi kalibrációs görbét kell felvenni*. Amennyiben a minta várható pNH₄-értékeit ismerjük, elegendő a kalibrációs görbének csak a várt tartományba eső részletét felvenni. A kalibrációs görbét célszerű a mérés során többször ellenőrizni 0,1 mol/dm³-nél higabb ammónium-klorid-oldat mérésével. Amennyiben a mérendő oldat az ammóniumionokon kívül más ionokat is tartalmaz, akkor a standardoldatok ionerősségét célszerű a mérendő oldat ionerősségéhez közelíteni.

A *Kjeldahl*-roncsolás során keletkezett ammónia- (ammóniumion-) tartalomból számítjuk a nitrogéntartalmat, figyelembe vesszük a mintából történt bemérés tömegét, a hígításokat, majd a kapott nitrogéntartalmat 6,25-ös konverziós faktorial szorozva kapjuk a minta nyersfehérje-tartalmát.

5.2.2.3. Nyersfehérje-tartalom meghatározás automata készülékekkel

Kjel–Foss automata a nitrogéntartalom meghatározására. A Kjel–Foss gyors nitrogénelemző élelmiszerek nyersfehérje-tartalmának gyors meghatározására szolgál a *Kjeldahl*-módszer alapján. A munkamenet egyezik a hagyományos *Kjeldahl*-módszerrel. A munkafolyamat gyors végrehajtását speciális technikák segítik úgy, hogy az első minta bevitelétől az eredmény kijelzéséig mindössze csak 15 perc szükséges, ezt

követően pedig minden három percben a készülék újabb és újabb analízis elvégzésére képes. A Kjel–Foss automatának a standard módszerhez hasonlóan a következő munkafolyamatai vannak:

- savas roncsolás,
- hűtés,
- hígítás vízzel,
- vízgőz-desztilláció és az ammónia titrálása,
- nyersfehérje-tartalom számítása.

A készülék hat speciális *Kjeldahl*-lombikkal dolgozik, amelyek hárompercenként az óramutató irányába 60°-kal elfordulnak. Az 1-es helyzetben lévő lombikba helyezük be a kálium-szulfát forráspontemelőt, a higany-oxid katalizátort, a roncsolást végző kénsavat, az oxidációt elősegítő hidrogén-peroxidot, és végül a lombikba helyezük a nitrogénmentes selyempapírba (bemérőpapír) csomagolt, 0,5–1 g tömegű mérendő anyagot. A 2-es helyzetben a lombik alatt meggyullad a roncsoló lángja, és a minta három percen keresztül forr. A roncsolás során keletkező gőzök és gázok egy szívócsövön keresztül elnyelődnek és víz-sugárszivattyú segítségével távoznak. Három perc elteltével a rendszer újabb 60°-os fordulatot tesz meg. A 3-as helyzetben a roncsolás újabb három percen keresztül folytatódik. A rendszer következő fordulatával a 4-es helyzetű hűtőhelyre kerül, ahol nagy teljesítményű ventilátor szobalevegővel hűti a lombikot. E pozíció végén a mintát a készülék mintegy 140–150 cm³ vízzel meghígítja, majd az 5-ös helyzetbe kerül a minta, ahol a kénsav közömbösítésére és a higanykatalizátor megkötésére nátrium-tioszulfátot tartalmazó NaOH-oldat keveredik a mintával, és megkezdődik az ammónia vízgőz-desztillációja.

Az ammóniatartalmú vizes oldat hűtőn keresztül kondenzálódik, majd titráló pohárba kerül, ahol az automatikusan adagolt metilvörös-metilénkék indikátoroldattal elegyedik. A lecsepegő ammóniatartalmú oldatot automata titrálóberendezés titrálja, az automata fecskendőjének dugattyúját pedig a titráló pohár alatt lévő fotocella szabályozza. A fotocella észleli az indikátor színváltozását, és annyi savmennyiséget továbbít a titráló pohárba, amennyi mindig arányos a jelenlevő ammónia mennyiségével. A titrálókészülék dugattyúját mozgató tengely potenciométerhez csatlakozik, amelynek segítségével az ammóniával arányos elmozdulás háromjegyű digitális kijelzés formájában jelenik meg a készülék oldalán. A kijelzés lehet nitrogén% vagy nyersfehérje%, és a készülék lehetőséget ad a különféle konverziós faktorok alkalmazására is.

Az ammóniameghatározást követően három perc múlva a lombik a 6-os helyzetbe kerül, ahol sűrített levegő segítségével a rendszer saját magát kiüríti, kitisztítja. A kitisztítást követően a lombik az 1-es helyzetbe fordulva kész újabb minta meghatározására. A műszer teljesítménye 15 perces indulószakasz után hárompercenként egy analízis, azaz óránként 20 minta. A mérés pontossága megegyezik a hagyományos *Kjeldahl*-módszerrel. A módszer különösen alkalmas nagyszámú minta gyors sorozatvizsgálatára. Mivel a roncsolás és az ammónia vízgőz-desztilláció ugyanabból a lombikból történik hígítás és egyéb manipuláció nélkül, a készülék különösen alkalmas inhomogén vagy nehezen homogenizálható minták mérésére is. A készülékkel folyadékok (tej, vizelet, testnedvek) nitrogéntartalmát is meg lehet határozni, amelynek során a bemérés pipettával történik.

Tecator Kjeltec fehérjemeghatározó. A Kjeltec fehérjemeghatározó ugyancsak élelmiszerek nyersfehérje-tartalmának gyors meghatározására szolgál a *Kjeldahl*-módszer alapján. Az analitikai laboratóriumokban a készülékkel váltották fel a korábban rendkívüli módon elterjedt és közkedvelt Kjel–Foss gyors nitrogénelemzőt. A készülék kifejlesztését az egészségre és környezetre rendkívül veszélyes higany-oxid katalizátor réz-szulfáttal, illetve szelénrel történő kiváltása indokolta. A munkafolyamat lépései teljesen megegyeznek a klasszikus *Kjeldahl*-módszerrel, illetve a Kjel–Foss ismertetésében leírtakkal, azaz: savas roncsolás, hűtés, vízgőz-desztilláció és az ammónia titrálása, a nyersfehérje-tartalom számítása.

A készülék szakaszos üzemű működésű, egy blokkroncsolóból és egy desztilláló-titráló részből áll. A roncsoló a fűtőblokkból, a roncsolócsövekből és az ezeket tartó állványból, valamint az elszívó feltétből áll, mely egy vízszugárszivattyúhoz csatlakozik. A roncsolásnál az őrölt és homogenizált szilárd mintából a nyersfehérje-tartalomtól függően 0,50–1,00 g-ot, nyershúsból 1,00 g-ot, tejből 1 cm³-t, vizeletből 2,0–5 cm³-t mérnek be a 250 cm³-es roncsolócsőbe. Hozzáadnak két darab Kjeltab Se 3,5 tablettát, mely tablettánként 3,5 g K₂SO₄ forráspontemelőt és 3,5 mg szelénkatalizátort tartalmaz, vagy 2 db Kjeltab Cu 3,5 tablettát, amely 3,5 g K₂SO₄-et és 0,4 g CuSO₄ · 5 H₂O-t tartalmaz és 13 cm³ analitikai tisztaságú, koncentrált kénsavat. A minta minőségétől függően különböző mennyiségben az oxidációt elősegítő hidrogén-peroxidot is adnak hozzá, ami szilárd minták esetében 1–5 cm³, tejmintáknál 1 cm³, húsmintáknál 7 cm³. Ezt követően a csöveket behelyezik az előzetesen 420

°C-ra felfűtött roncsolóblokkba, ráhelyezik az elszívófeltétet és elindítják a vízszugárszivattyút, melynek segítségével a roncsolás során keletkezett gázok és gőzök távoznak a rendszerből. A roncsolás 420 °C-on 1 órán keresztül történik, majd a roncsolóból kivett csöveket lefedve lehűtik, hűtés után következik a vizsgálat második szakasza: a desztillálás és a titrálás.

A Kjeltec 2400 berendezés alsó szintjén helyezték el a reagenseket tartalmazó tartályokat, a középső részben az automatikus mintaadagoló található, ahol három tartóállvány van 60 db roncsolócső, illetve minta elhelyezésére, a felső részben pedig a desztilláló és titráló egység, valamint a folyamatok programozására szolgáló rész helyezkedik el. A mérés a reagensek betöltésével, a mintatartó állványok elhelyezésével és a készülék programozásával indul. A program szabja meg, hogy az egyes reagensekből milyen sorrendben és mennyit adagoljon a készülék, valamint azt, hogy mennyi ideig történjen a desztillálás és a titrálás. A programozás során megadják a minta sorszámát, a bemért mennyiséget, a minta helyét a titráló berendezésben és azt, hogy az eredményt milyen mértékegységben számolja a készülék. Az analízis üzemmódban a készülék az első állványban lévő első csövet egy emelő segítségével a desztilláló egységbe helyezi, egy pumpa 30 cm^3 1%-os bórsavban oldott brómkrezolöld–metilvörös indikátort adagol a titráló edénybe, ezzel egy időben egy másik pumpa 30 cm^3 desztillált vizet juttat a roncsolócsőbe. Ezt követően 60 cm^3 33%-os nátrium-hidroxidot adagolnak a roncsolócsőbe, mely egyrészt megköti a kénsavat, másrészt felszabadítja sójából az ammóniát. A gőzszelep késleltetve nyit, gőz áramlik a roncsolócsőbe és elindul a desztillálás, az ammóniatartalmú gőz a kondenzátorban lecsapódik és a titráló edénybe jut, mely a bórsavban oldott indikátort tartalmazza. A desztilláció alatt – az indikátor színének megfelelően (zöldről rózsaszínre vált) – egy automata büretta 0,1M kénsavat adagol a titráló edénybe mindaddig, amíg a zöld szín rózsaszínre nem vált. A desztilláció addig tart, amíg az indikátor színe folyamatos rózsaszínné nem alakul. Ezt követően az ürítőszelep kinyit, a titráló edény kiürül és a gőzszelep lezár. Kinyit a roncsolócső ürítő szelepe is, és a desztillációs maradvány a katalizátorral együtt a gyűjtőtartályba ürül. Az eredmény megjelenik a kijelzőn, a nyomtatón és szükség szerint a memóriában is tárolható, ezt követően a következő roncsolócső fel-emelésével megkezdődik az újabb minta elemzése. *A nitrogéntartalom számítása a következő képlet szerint történik:*

$$N\% = \frac{(F - B) \cdot 1,401 \cdot M}{\text{bemérés (g)}},$$

ahol:

F = a 0,1M kénsavoldat fogyása a mintára (cm³),

B = a 0,1M kénsavoldat fogyása a vakra (cm³),

M = a kénsavoldat (mol/dm³) koncentrációja.

A nyersfehérje-tartalom számolása a nitrogénszázalék konverziós faktorról való beszorzásával történik. A készülék ellenőrzését (NH₄)₂SO₄ elemzésével végzik, a roncsolás hatásfokának ellenőrzésére pedig a nikotinsav vagy a triptofán nitrogéntartalmát határozzák meg. Az eredményt a vizsgálatot kérő igényeinek megfelelően nitrogénszázalékban, nyersfehérje-százalékban vagy más mértékegységben adják meg.

5.3. A fehérjetartalom meghatározása spektrofotometriás módszerekkel

5.3.1. Ultraibolya spektrofotometriás módszerek

A legtöbb fehérjének a *280 nm hullámhosszon* az ultraibolya tartományban *fényelnyelési maximuma van*, amely a fehérjék tirozin-, fenil-alanin- és triptofántartalmára vezethető vissza. Különböző fehérjék aromás aminosavtartalma viszonylag szűk határok között változik, ezért ezek fényelnyelése felhasználható a fehérje mennyiségének meghatározására. A módszer előnye a *rendkívüli érzékenység*, továbbá az, hogy *reagens nélkül lehet végezni a meghatározást*. Oszlopkromatográfiás elválasztások során az UV abszorpciót használjuk fel a fehérjekoncentráció folyamatos mérésére. A mérést a nukleinsavak, a purin- és a pirimidinbázisok, valamint a purin- és pirimidingyűrűt tartalmazó vegyületek 260 nm körüli erős UV abszorpciója zavarja, ezért különböző nukleinsav-fehérje keverékek elemzése során *korrekciókat dolgoztak ki a nukleinsavak okozta fehérjemeghatározási hiba kiküszöbölésére*. Kis nukleinsavtartalom esetében a 280 nm-en mért fényelnyelés alapján a 10–1000 μg/cm³ méréshatárok között lehet a tiszta, nem zavaros fehérjeoldatok koncentrációját meghatározni. A méréshez szükséges egy olyan UV detektor, amely 280 nm vagy ez alatti hullámhosszat tud szelektálni. A fehérje meghatározásánál figyelembe kell azt is venni, hogy a fehérjeanalitikában használt számos oldószernek jelentős UV

abszorpciója van a fehérjék 280 nm-es elnyelési sávjában. Az elektronikus úton történő háttérkompenzáció csökkenti a mérés érzékenységét, gradienselúció esetén történő meghatározásnál viszont, mivel az abszorpció folyamatosan változik, a háttérkompenzáció elektronikus úton nem lehetséges. A nukleinsavak zavaró hatása miatt kidolgoztak olyan fehérjemérési módszereket is, amelyeknél a 280 nm-nél rövidebb hullámhossztartományban jelentkező fényelnyelést mérik. *Használhatják a 220–240 nm-en mért fényelnyelést a fehérje meghatározására*, annak ellenére, hogy ebben a tartományban a fehérjének nincs abszorpciós maximuma, a nukleinsavaknak viszont abszorpciós minimumuk van. Ebben a hullámhossztartományban nemcsak a tirozin és a triptofán, hanem a fenil-alanin, a metionin, a cisztein és cisztin, továbbá a peptidkötés 185 nm-es fényelnyeléséből összegződik a mért extinkció. Az eljárással 5–180 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ fehérjét lehet meghatározni. Ezekben a hullámhosszakon a ribonukleinsavak zavaró hatását még hatékonyabban lehet kiküszöbölni.

A fehérjék és a peptidok UV abszorpciót mutatnak a 191–194 nm közötti tartományban is. Ebben a tartományban azért előnyös a fehérje- vagy peptidtartalmat mérni, mert az UV abszorpció független az aromás aminosavak mennyiségétől, így *a fényelnyelés csaknem független a fehérje vagy peptid minőségétől*. A módszer hátránya, hogy optikailag igen kiváló minőségű, és nagy érzékenységű spektrofotométert és jó mérés-technikai feltételeket kíván, mert a rövid ultraibolya tartományban a szórófény-effektus nagyon megváltoztathatja a mérések eredményeit. Ebben a mérési tartományban 40–80-szor nagyobb érzékenységet lehet elérni, mint a hagyományos 280 nm-en mért fényelnyeléssel.

5.3.2. Spektrofotometriás módszerek a látható fény tartományban

A fehérjék színreakciója valójában az őket felépítő aminosavak színreakcióira vezethető vissza. A fehérjék kimutatására használható színreakciók közül csak kevés használható mennyiségi analízis céljaira. A legfontosabbak a biuret-reakció és a *Folin–Ciocâlțeu*-féle fenolreagenssel történő színreakciók.

5.3.2.1. Biuret-módszer

A biuret-reakció során lúgos közegben a Cu^{2+} -ion négy peptid-nitrogénhez kapcsolódik. A $-\text{CONH}$ -csoporton kívül adják a reakciót a $-\text{CSNH}_2$ -, a $-\text{C}(\text{NH})\text{NH}_2$ -, a $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ -, a $-\text{CRHNH}_2$ -, a $-\text{CHOHCH}_2\text{NH}_2$ -, a $-\text{CHNH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ -, a $-\text{CHNH}_2\text{CHO}$ -csoportok és természetesen maga a biuret is ($\text{CONH}_2\text{NHCONH}_2$), amelyről a reakció a nevét kapta. Az ibolyaszínű rézkomplexnek a látható fény tartományban, az 540–560 nm között van abszorpciós maximuma, de mérhető a rézkomplex a közeli ibolyántúli tartományban is 310 nm-en.

Gornall és mtsai. az alábbiak szerint állították elő és használták a biuret-reagenst. 1,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ -t és 6 g $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ -t feloldunk 500 cm^3 vízben, 300 cm^3 10%-os karbonátmentes NaOH-oldatot adunk hozzá, majd vízzel 1 dm^3 -re hígítjuk. A reagens polietilén palackban, sötét helyen eltartható. 0,1% kálium-jodid hozzáadása megakadályozza a réz redukcióját, de nem befolyásolja a biuret színreakciót. A meghatározás során 1 cm^3 1–10 mg/cm^3 -es fehérjeoldathoz 4 cm^3 biuret-reagenst adunk, összerázzuk, szobahőmérsékleten 30 percig állni hagyjuk, majd 540–550 nm hullámhosszon mérjük a fényelnyelést 1 cm^3 víz és 4 cm^3 biuret-reagens keverékével szemben. A standard görbét bovin szérumalbumin-oldattal készítjük. Ha nagyobb pontosságra van szükségünk, célszerű a vizsgálati anyagból Kjeldahl-módszerrel fehérjemeghatározást végezni, és erre vonatkoztatni a meghatározást. Mivel a nemfehérje nitrogén is reagál a biuret-reagenssel, ezért a meghatározást triklór-ecetsavas kicsapás után a csapadék lúgos oldatából célszerű elvégezni.

A kisebb molekulatömegű, biuret-reakciót adó nemfehérjeszerű vegyületektől és egyéb zavaró anyagoktól a biuret-reakcióban keletkező fehérje-réz komplexet Sephadex G-25 oszlopon is el lehet választani. Ezt követően a fehérje-réz komplexet H_2SO_4 – H_2O eleggyel roncsolják, meglúgosítják, majd a rezet dietil-ditiokarbamáttal kolorimetrikusan meghatározzák. Ez az eljárás azonos érzékenységgű a Lowry-féle módszerrel, és tízszer érzékenyebb a 280 nm-es UV abszorpció alapján.

Egy másik módszer szerint a Sephadex gélen szűréssel elkülönített fehérje-réz komplexből roncsolással felszabadított Cu^{2+} -ion-tartalmat a rézzel katalizált fenol-klóramin-T reakció alapján a 410 nm-en mért abszorpcióból számítják. Ez a rézmeghatározási módszer mintegy ezerszer érzékenyebb, mint a réz atomabszorpciós spektrofotometriás

meghatározása, a fehérjemeghatározás érzékenysége pedig ötszázszor nagyobb, mint a *Lowry*-féle eljárásé ($0,01\text{--}0,2\ \mu\text{g}/\text{cm}^3$ fehérje).

A *biuret-reakció* fényelnyelése a közeli ibolyántúli tartományban $330\ \text{nm}$ -en előnyösen mérhető, és itt a meghatározást nem zavarja a nukleinsavak vagy az ammóniumion jelenléte. A rézkomplex fényelnyelésének mérését $310\ \text{nm}$ -es hullámhosszon is javasolják, melynek során nukleinsavat nem tartalmazó oldatból $0,075\ \text{mg}/\text{cm}^3$ -nél kevesebb, nukleinsav jelenlétében pedig $0,15\text{--}3\ \text{mg}/\text{cm}^3$ fehérjét tudtak meghatározni. *Ellman* biuret-módszere $263\ \text{nm}$ -nél méri az abszorpciót, az eljárás érzékenysége $0,01\ \text{mg}/\text{cm}^3$, vagyis egy nagyságrenddel nagyobb, mint a látható tartományban mért abszorpció alapján meghatározható. Fehérjemeghatározást sok esetben közvetlenül a növényi vagy állati szövetkivonatból kell elvégezni. A kivonásra használt puffer vagy detergens zavarhatja a meghatározást, hisz ezek jelenlétében a biuret-reagens csapadékot ad a fehérjével. A csapadékot oldani lehet, pl. propilénglikolban, és a fényabszorpció ilyenkor $330\ \text{nm}$ hullámhosszon mérhető. A biokémiai reakciók során azonban igen gyakran használt TRIS-puffer (tris[hidroxi-metilamino-metán]) jelenléte nem kívánatos a fehérjemeghatározásnál, mert mind a biuret-, mind a *Lowry*-féle fehérjemeghatározást zavarja. A puffer nitrogéntartalma miatt a *Kjeldahl*-féle fehérjemeghatározás is nehézkes, ezért inkább a biuret kalibráló görbéket különféle TRIS-koncentrációkkal felvéve meghatározható, hogy a puffer az extinkciós értékeket mennyivel növeli meg.

A *biuret-reakció makrováltozatai jól használhatók különféle gabonaőrlemények fehérjetartalmának vizsgálatára* is. Ennek során az alkalis réz(II)-szulfát-oldat a fehérjének nemcsak reagense, hanem extrahálószer is. *Jennings* az alábbi módosított biuret-reagenssel vonta ki, illetve határozta meg a fehérjét.

$900\ \text{cm}^3$ vízben feloldott $2\ \text{g}$ kálium-nátrium-tartarátot és $15\ \text{cm}^3$ $10\ \text{M}$ kálium-hidroxidot, folyamatos keverés közben $30\ \text{cm}^3$ 4% -os réz-szulfát-oldatot adott hozzá, majd az oldatot desztillált vízzel $1\ \text{dm}^3$ -re egészítette ki. A fehérjemeghatározás során $500\ \text{mg}$ lisztet dugóval zárható extrakciós edénybe mért, ezt $2\ \text{cm}^3$ szén-tetrakloriddal megnedvesítette, majd $50\ \text{cm}^3$ módosított biuret-reagenst adott hozzá. Rázógépen hatvan percig rázatta, majd a szuszpenzió egy részét $3000\ \text{g-n}$ $10\text{--}15$ percig centrifugálta. A tiszta felülúszó fényelnyelését $550\ \text{nm}$ hullámhosszon mérte $1\ \text{cm}$ -es küvettában, a kalibráló görbét pedig a *Kjeldahl* nitrogénmeghatározás alapján szerkesztette meg. Búza- és

árpaőrleményekkel végzett vizsgálatokkal megállapították, hogy a *Kjeldahl* nitrogénértékek és az extinkció között igen szoros az összefüggés. Ezt a módszert többen módosították, elsősorban a biuret-reagens stabilitását célozva. A kálium-nátrium-tartarát helyett glicerint használtak, mások pedig finoman porított CuCO_3 alkalmazásával küszöbölték ki a reagens bomlékonyságát. Alkalikus vizes oldat helyett kálium-hidroxidra 0,1M-os, 60%-os izopropil-alkoholt használva a gabonaőrlemények festékanyagai kevésbé oldódnak ki, így ezek fényelnyelése a biuret-reakciót nem zavarja.

5.3.2.2. Lowry-módszer

A biokémiai analitikában a legelterjedtebb fehérjemeghatározás a *Lowry-* (*Folin-Lowry-*) féle eljárás, melynek alapja a fehérje biuret-reakciója alkalikus közegben Cu^{2+} -ionnal és a *Folin-Ciocalteu*-féle foszfor-molibdén-foszfor-wolfrámsav redukciója heteropoli-molibdén-kékké, a fehérjekötésben lévő aromás aminosavak rézion katalizálta oxidációja közben. A *Folin*-féle fenolreagenst az alábbiak szerint készítjük:

100 g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -et, 25 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -et feloldunk 700 cm^3 vízben, majd 50 cm^3 85%-os H_3PO_4 -at és 100 cm^3 tömény HCl-at adunk hozzá. Az oldatot kétliteres, normálciszolatos gömblombikban, hűtővel felszerelve, 10 órán át forraljuk, majd 150 g lítium-szulfátot, 50 cm^3 desztillált vizet és néhány csepp brómot adunk hozzá. 15 percig visszafolyó nélkül forraljuk, hogy a bróm feleslegét elűzzük, lehűlés után pedig desztillált vízzel 1 literre töltjük fel. Barna folyadéküvegbe szűrjük. Használat előtt 1M-os NaOH-dal fenolftalein-indikátor jelenlétében meghatározzuk az aciditását, a fehérjemeghatározáshoz pedig az előírt koncentrációra hígítjuk. A standard görbék elkészítése során különböző hígításokkal 0, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 és 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ koncentrációjú fehérjesorozatot állítunk elő bovin szérumalbumin frakcióból.

Az így előállított standardsorozat vagy a minta (mely optimális esetben 50–100 $\text{mg}/100\text{ cm}^3$ fehérjét tartalmaz) 0,1 cm^3 -éhez 0,1 cm^3 2 mólos NaOH-ot adunk, 100 °C-on 10 percig fűtőblokkba vagy vízfürdőbe helyezük, majd szobahőmérsékletre hűtjük. 1 cm^3 frissen készített reagenst adunk hozzá, mely 100:1:1 térfogatszázalékos arányban tartalmazza a 2% nátrium-karbonát, az 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - és a 2% kálium-nátrium-tartarát-oldatot. Az alkalikus réz-tartarát reagenst elkészíthetjük úgy is, hogy 1,25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -t és 3,375 g kálium-nátrium-tartarátot

oldunk 100 cm^3 desztillált vízben, majd ebből a törzsoldatból 1 cm^3 -t $2,5\%$ -os Na_2CO_3 -oldattal 100 cm^3 -re hígítunk. Az oldatot mindig frissen kell készíteni. Hagyjuk az oldatot szobahőmérsékleten 10 percig állni, majd adjunk hozzá $0,1\text{ cm}^3$ *Folin*-reagenst, intenzíven keverjük össze, majd tartjuk szobahőmérsékleten 30–60 percig, de az idő a 60 percet soha ne haladja meg. Mérjük az oldat abszorpcióját 750 nm -en akkor, ha a fehérjekoncentráció $500\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^3$ alatt volt, vagy 550 nm -en akkor, ha a fehérjekoncentráció 100 – $2000\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^3$ között volt. Szerkesszük meg az abszorbanciák alapján a kalibrációs görbét, mely már alkalmas az ismeretlen fehérjetartalmú minta fehérjetartalmának számítására. Ismeretlen fehérjetartalmú minta esetében 75 – $200\text{ }\mu\text{g}$ közötti fehérjét tartalmazó mintát 3 cm^3 $0,5\text{M}$ NaOH -ban oldunk, majd az oldatból 1 cm^3 -t pipetázunk egy körjeles kémcsőbe, 4 cm^3 alkalikus réz-tartarát reagenst adunk hozzá, összekeverjük, 10 percig állni hagyjuk, majd 1 cm^3 *Folin*-reagenst adunk hozzá erélyes keverés közben. A standard görbénél leírtaknak megfelelően szobahőmérsékleten állni hagyjuk, ha szükséges centrifugáljuk, ezt követően pedig mérjük az oldat fényelnyelését a fehérjetartalomtól függően 750 vagy 550 nm -en. Ha a méréseket a hitelesítő görbe lineáris tartományában végezzük, a meghatározás hibája ± 2 – 4% .

A *Lowry-féle fehérjemeghatározást az oldatban lévő idegen anyagok*, pufferek, detergensok, kelátképző anyagok, alkoholok, cukrok, poliszacharidok, pigmentek, nagyobb koncentrációban jelenlévő szulfhidrikel és szulfhidril-reagensok *erőteljesen zavarják*, és különleges eljárásokat kell alkalmazni a lipoproteinek fehérjetartalmának meghatározása során is. Megállapították, hogy különböző pufferek eltérő módon befolyásolják a *Lowry*-reakció érzékenységét, és csökkentik az érzékenységet a glicin, a glicil-glicin, a citrátok, a szukcinátok, a nátrium-dodecil-szulfát és a cukrok is. Ha ezek az anyagok állandó koncentrációban vannak jelen, akkor *zavaró hatásuk az azonos körülmények között készített vakoldattal kompenzálható*. Kimutatták, hogy a glicerin mind a *Lowry-féle fehérjemeghatározás* esetén, mind a biuret-reakció során lineárisan növeli a fényabszorpciót, mely zavaró hatás megfelelő referensoldattal kompenzálható. Vizsgálatok szerint a redukáló cukrok és a poliszacharidok közül nagyon sok reagál a *Folin*-reagenssel, és ezek a színreakciók nagymértékben zavarhatják a fehérjemeghatározást. Sokféle cukorral meghatározták az úgynevezett protein-egyenértéket, melyet a fehérjemeghatározás során figyelembe kell venni. Lipoproteidek és proteolipidek fehérjetartalmának meghatározása során, mivel ezek a vegyületek vizes közegben nehezen oldódnak, a kioldást $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on, egy éjszakán át

tartó lúgos kezeléssel, vagy 100 °C-on, 30 percen át végzett lúgos kezeléssel érik el. Egyes proteolipidek a lipidek eltávolítása után csapadékot is képezhetnek a *Lowry*-féle fehérjemeghatározás alkalmával, a lipoidok oxidációjakor képződő bomlástermékek pedig a *Folin*-reagenssel reagálnak, megnövelve a fehérje mennyiségét.

Amennyiben nem fehérjeoldatból, hanem precipitált fehérjéből kell a meghatározást elvégezni, akkor a precipitátumot 2 mólos NaOH-ban oldjuk, és 100 °C-on 10 percig hidrolizáljuk. Teljes sejtek vagy komplex biológiai anyagok esetében a mintákat megfelelő módon elő kell készíteni a fehérjemeghatározáshoz, mely magában foglalhat pl. perklórsavas kicsapást, melyet követően a fehérjecsapadék már alkalmas a *Lowry*-féle fehérjemeghatározásra. Egy másik eljárás szerint 1 cm³ fehérjetartalmú mintához 0,1 cm³ 72%-os triklór-ecetsavat adnak, majd 1000–3000 g között 30 percig végezett centrifugálással az oldatból elkülönítik a kicsapott fehérjét, mely most már alkalmas a *Lowry*-féle meghatározásra. Mivel a detergenssek, mint amilyen pl. a nátrium-dodecil-szulfát, gyakran jelen vannak azokban az oldatokban, amelyből fehérjemeghatározást kell végezni, ilyenkor a fehérje tökéletes kicsapására nemcsak triklór-ecetsavat, hanem foszfor-wolframsavat is alkalmaznak az alábbiak szerint:

1 cm³ fehérjetartalmú mintához hozzáadnak 0,2 cm³ 30 tömeg%-os triklór-ecetsav- és 6 tömeg%-os foszfor-wolframsav-oldatot, összekeverik, majd szobahőmérsékleten 20 percig állni hagyják, centrifugálják 4 °C-on, 2000 g-n, 30 percig, a felülúszót dekantálják és a kapott csapadékból határozzák meg a fehérjét. A reakció rendkívüli módon függ a pH-tól, ezért ügyelni kell arra, hogy a pH 10,0–10,5 között maradjon a meghatározás során. *A Folin-reagenssel való reakció ideje nem túlzottan kritikus, a reakció gyakorlatilag 10 perc alatt tökéletesen végbemegy, de a fényelnyelést lényegesen több órás várakozás sem befolyásolja.* Nagyon kell ügyelni viszont arra, hogy a *Folin*-reagens és a minta keveredése gyors és tökéletes legyen, ugyanis a reagens lúgos körülmények között instabil, és bomlása növelheti a meghatározás hibáját. Amint már szó volt róla, a *Lowry*-módszer hibája, hogy nagyon sok anyag, mint pl. pufferek, a drogok, a nukleinsavak és a cukrok zavarhatják a meghatározást. A zavaró hatások minimálisra csökkenthetők a minta hígításával úgy, hogy a fehérjekoncentráció még elegendő nagy legyen a hígítás után az optimális meghatározáshoz. A zavaró hatás kiküszöbölésére minden alkalommal zavaró anyagokat tartalmazó vakmintát kell készíteni. A detergenssek, a cukrok és az EDTA zavaró hatása kiküszöbölhető, ha a fehérje kicsapása során nátrium-dodecil-szulfátot is juttatunk a rendszerbe.

Ha a *Folin*-reagenst nem egyszerre, hanem két adagban adjuk a mintához, akkor az 20%-kal megnövelheti az érzékenységet. Ha három perccel a *Folin*-reagens adagolása után ditiotreitet teszünk a reakcióelegyhez, az érzékenység mintegy 50%-kal nő.

A *Lowry*-meghatározás során kapott *színes termék színintenzitása függ a fehérje aminosav-összetételétől*, ezért két különböző fehérje, amelyeknek koncentrációja 1 mg/cm^3 , a meghatározáskor különféle színintenzitást ad. Figyelembe kell venni azt, hogy a bovin szérumalbuminnal felvett standard görbe csak egy közelítő meghatározást ad a fehérje koncentrációjára. Az *abszolút értéket* bármilyen fehérjére ezzel a módszerrel csak *akkor lehet meghatározni, ha a kalibrációs görbe is ugyanaból a fehérjéből készül*, mint amit a mintából meg akarunk határozni. A fehérjetartalom pontosabb meghatározására csak az aminosav-analízis alkalmas.

5.3.3. A fehérjetartalom meghatározása festékkötéssel

A fehérjemolekula savanyú és bázisos csoportjai megfelelő kísérleti körülmények között a festék disszociált csoportjaival (legtöbbször szulfonsav csoportokkal) reakcióba lépnek, és velük oldhatatlan, színes csapadékot képeznek. A festékkötés mértékéből a fehérje mennyiségére lehet következtetni, ezért a módszer megfelelő körülmények biztosításával mennyiségi meghatározássá fejleszthető.

A szerves festékek közül előszeretettel alkalmazták fehérje meghatározására az *amidofekete 10B festéket* ($\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}_2\text{Na}_2$), mely savanyú közegben jól kötődik a fehérjéhez, melynek alapján a fehérje mennyisége meghatározható. Folyadékok fehérjetartalmának meghatározása során a fehérjét ecetsavas metil-alkoholban amidofeketével megfestik, majd a centrifugálással eltávolított, megfestett csapadékot nátrium-hidroxidban oldják és mérik a szín intenzitását. A fehérje festékkötéssel történő meghatározása során egyrészt tesztelték azt, hogy a festék hogyan kötődik a különböző fehérjékhez, másrészt különböző fehérjéket próbáltak ki a meghatározások során. Megállapították, hogy *a festékkötés kevésbé specifikus*, mint a *Lowry*-féle módszer, ugyanis a vizsgált kilenc különféle fehérje festékkötése nitrogénre számolva közel azonos volt. Az amidofeketét nemcsak folyadékban oldott fehérjék meghatározására, hanem különböző membránokon, illetve géleken elválasztott fehérjék festésére is használták. Megállapították, hogy az amidofekete abszorpciója a poliakrilamid-gélben lévő fehérjéhez $1,5 \text{ mg/cm}^3$ -ig lineáris.

A megkötött fehérje kvantitatíve festhető amidofeketével, és mennyisége denzitométerrel meghatározható. Az amidofeketén kívül a fehérje mennyiségi meghatározására használták még a *xilen-brillant-cianin G*, valamint az *orange G* és a *coomassie kék G 250* festékeket is.

Gabonaőrlemények fehérjetartalmának és fehérjeminőségének vizsgálatára az utóbbi években több gyors módszert is kidolgoztak. A festékkötési módszert a búzaliszt-frakciók fehérjei bázisos és savas csoportjainak, illetve ezek arányának meghatározására használták. A bázisos csoportok festékkötését orange G 0,1%-os oldatával, a savas csoportok festékkötését pedig a safranin O 0,2%-os oldatával végezték. A festékkötés mérésére indirekt módszert alkalmaztak, azaz *nem a megkötött festéket, hanem a festék feleslegét mérték* a festékoldat koncentrációjának csökkenéséből. Az orange G színét 472 nm-en, a safranin O színét pedig 452 nm-en mérték ötvenszeres hígításban. Ebből a módszerből egy fehérjemeghatározási módszert fejlesztettek ki, melynek lényege a következő:

600 mg liszthez 50 cm³-es polietilén centrifugacsőben 25 cm³ orange G festékoldatot adnak, melyet a következők szerint állítanak elő: 100 mg finoman porított festéket oldanak 100 cm³ vízben, melynek pH-ját 2,2-re állítják be. A festékadagolás után a dugóval lezárt centrifugacsöveket 15 percig rázzák, miközben a fehérje pozitív töltésű csoportjai és a festék negatív töltésű csoportjai között a reakció teljesen végbe megy. Az oldhatatlan fehérje–festék komplexet és a liszt egyéb nem oldódott komponenseit ötperces 4000 fordulaton végzett centrifugálással különítik el a reakcióba nem lépett festékoldattól, majd a felülúszó fényelnyelését 470 nm-en mérik. A festékkötés és a *Kjeldahl*-nitrogén közötti összefüggés erősen szignifikáns.

5.3.3.1. Bradford-módszer

Nagyon sok laboratóriumban elterjedt a fehérjék meghatározására a *Bradford-módszer*, mely a *coomassie kék G 250* festék és a fehérje közötti reakción alapul. Ez a módszer egyszerűbb, gyorsabb és érzékenyebb, mint a *Lowry*-módszer, ráadásul nem zavarják a minta előállítása során használt reagensek és az NPN anyagok sem. A részletes vizsgálatok megállapították, hogy a festék három különböző disszociált formában fordulhat elő, a funkciós csoportok pK_S-értékei 1,15; 1,82; 12,4. A savas oldatban a domináns formák vörös és zöld színűek, melyeknek fényelnyelési maximuma 470 és 650 nm-en van, a negatív töltésű kék

forma, amely a fehérjéhez kötődik, 590 nm-en mutat abszorpciós maximumot. *A fehérjék mennyiségi meghatározását a kék színű, negatív töltésű festékekkel lehet elvégezni*, ez úton a fényelnyelést 590 nm-en végzik. A festék az arginil- és lizil-oldalláncokhoz kötődik, mely a különböző fehérjék esetén az aminosav-tartalom függvényében különböző lehet. A módszer hátránya még az is, hogy más egyéb vegyületek jelenlétére is érzékeny. Többszöri módosítás után azonban elmondható, hogy a *Bradford*-módszer ma is *az egyik legnépszerűbb, és legszélesebb körben alkalmazott fehérjeanalitikai módszer*. Az eredeti módszer alkalmas 10–100 μg közötti fehérje mennyiségének mérésére. A belőle kifejlesztett mikromódszer pedig képes 1–10 μg közötti fehérjét mérni. Ez utóbbi mikromódszer rendkívül érzékeny, de érzékeny az egyéb zavaró hatásokkal szemben is. A meghatározás során az alábbi reagenseket használjuk:

Színreagens: 100 mg coomassie kék G 250-t oldunk 50 cm^3 95%-os etil-alkoholban, az oldatot 100 cm^3 85%-os foszforsavhoz keverjük, majd az egészet desztillált vízzel 1 dm^3 -re töltjük. A reagenst szűrőpapíron keresztül átszűrjük, és barna üvegben, szobahőmérsékleten tároljuk. Az így kapott oldat néhány héten keresztül stabil, bár némi kicsapódás történhet a tárolás alkalmával, amelyet használat előtt szűrővel el kell távolítani.

A fehérjestandard előállítása során szarvasmarha γ -globulint használunk, 1 mg/cm^3 koncentrációban, desztillált vízben oldva. A mikromódszer esetében a proteinstandardot 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ -es oldatból állítjuk elő. Ezeket a desztillált vízben oldott fehérjéket $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -on tárolhatjuk a felhasználásig. A meghatározáskor rendkívüli módon kell ügyelni a tisztaságra és arra, hogy az eszközök detergenst még nyomokban se tartalmazzanak. Kvarc küvettákat nem lehet alkalmazni, mivel a festék kötődik hozzájuk; az üvegeszközökhöz kötődött festéket pedig metanol oldással vagy detergensek segítségével el kell távolítani.

A standard módszer szerint 10–100 μg közötti fehérjének megfelelő szarvasmarha γ -globulin-oldatot pipetázunk 100 μl térfogatú kémcsövekbe. Amennyiben az ismeretlen minta fehérjekoncentrációjáról nincsenek információink, a hígításokat 10-szeres, 100-szoros, illetve 1000-szeres mennyiségben végezzük el a törzsoldatból. A kalibrációs görbe készítése során párhuzamosan 10, 20, 40, 60, 80 és 100 μl -t pipetázunk az 1 mg/cm^3 szarvasmarha γ -globulin standardoldatokból a kémcsövekbe, mindegyiket desztillált vízzel 100 μl -re egészítjük ki, és 100 μl desztillált vizet használunk a vakminta előállításához is. Mindegyik kémcsőhöz 5 cm^3 fehérjereagenst adunk, kerülve a felhabzást, óvatosan

összekeverjük, mert az rontja a reprodukálhatóságot. *A reakció nagyon gyorsan lejátsszódik*, ezért a standard, a vak és a minta fényelnyelését a reagens hozzáadását követően két perc múlva már mérhetjük, de a mérést egy órán belül mindenképpen el kell végezni. A standard görbe nem lineáris, a fényelnyelés függ az alkalmazott reagens fényelnyelésétől. Ebből következik, hogy minden egyes meghatározás alkalmával standardsorozatot és vakmintát is kell készíteni.

A standard módszer alkalmas 10–100 μg közötti fehérjemennyiségek mérésére. Az ebből kifejlesztett *mikromódszer* ennél lényegesen érzékenyebb, és különösen akkor hasznos, ha a meghatározáshoz igen kis mennyiségű fehérje áll rendelkezésre. A mikromódszer alkalmazása során 1–10 μg közötti fehérjemennyiségeket – maximum 100 μl ösztérfogatban – mérünk be 1,5 cm^3 térfogatú polietilén mikrocentrifugacsövekbe. Amennyiben az analizálandó minta közelítő fehérjetartalmát sem ismerjük, a mérést 10-szeres, 100-szoros és 1000-szeres hígítással is elvégezzük. A kalibrációs görbe készítésekor a 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ szarvasmarha γ -globulin standardoldatból mikrocentrifugacsövekbe bemérünk 10, 20, 40, 60, 80 és 100 μl oldatot, és desztillált vízzel mindegyiket 100 μl -re egészítjük ki. A vakmintához szintén 100 μl desztillált vizet mérünk be egy mikrocentrifugacsőbe. Mindegyik mintához hozzáadunk 1 cm^3 fehérjereagenst, a csöveket óvatosan, de alaposan összekeverjük. A proteinreagens hozzáadását követően 2 és 60 perc között mérjük az oldat fényelnyelését 595 nm-en.

A *Bradford*-meghatározást nem nagyon zavarják a biokémiai analitikában használt reagensek, ennek ellenére néhány vegyszer jelentős hatással lehet a vakpróba fényelnyelésére, illetve a fehérje és a festék kötődésére. *A legnagyobb problémát a detergensok és a különféle amfolitok okozzák*, melyeket gélfiltrálással vagy dialízissel el kell távolítani az oldatból, vagy a fehérjéket ki kell csapni, és a csapadékból kell végezni a meghatározást. Megoldást jelenthet az is, hogyha a vakpróba és a kalibrációs standardok is ugyanazokat a zavaró anyagokat tartalmazzák mint a minta. Bázikus közegben a festék anion formája dominál, ezért ilyenkor az abszorpció jelentős mértékben megnő.

A fehérjéhez kötött festék abszorpciós maximuma a kékszínű ionos formához viszonyítva 590 nm-ről 620 nm-re tolódik el. Célszerű lenne tehát itt mérni a fényelnyelést, ezt azonban már zavarja a zöld színű forma 650 nm-en bekövetkező abszorpciós maximuma. Ezért az érzékenység növelését és a zavaró hatást is figyelembe véve 595 nm a legjobb kompromisszum.

A festék nem kötődik sem a szabad argininhez, sem a lizinhez, sem a 3000 Da-nál kisebb molekulatömegű peptidekhez, ezért a peptidhormonokat és a biológiailag aktív, fontos *peptideket* ezzel a módszerrel nem lehet mérni. A Bradford-módszer érzékenysége a különféle fehérjék mérésekor igen eltérő. Példaként említendő, hogy amennyiben a tripszin relatív abszorbanciája 18, akkor a bovin szérumalbuminé 100, a citokróm-c-é 128, a hisztóné 130, a mielin bázikus fehérjéé pedig 139. A módszert sokféleképpen módosították azért, hogy ez a rendkívül eltérő változatosság mérséklődjék. Változtatták a festékoldat koncentrációját, a pH-t, de lényeges eredményeket nem értek el e tekintetben. A membránfehérjék mérésekor célszerűnek látszik a detergensnek teljes elhagyása, és a fehérjék kalcium-foszfáttal történő kicsapása. Befolyásolja a módszer érzékenységét a coomassie kék G 250 festék tisztasága, ezért azt csak nagyon jó minőségben, megbízható helyről szabad beszerezni. Jelentős hatással lehet a meghatározás pontosságára a standard kalibrációs görbéhez használt fehérje minősége. Ehhez legtöbbször a szarvasmarha szérumalbumint használják, mert ez relatíve olcsó és tiszta formában könnyen hozzá lehet jutni. A probléma ezzel az, hogy a fehérjének – Bradford-módszerrel vizsgálva – meglehetősen nagy a festékkötő kapacitása, ezért a legtöbb esetben az ismeretlen minta fehérjetartalmát – kalibrációs görbével végezve az értékelést – alulértékeli. A festékkötő kapacitásban mutatkozó különbségek miatt *a meghatározni kívánt fehérje festékkötő kapacitásának hasonlóknak kellene lenni ahhoz, mint amiből a standard kalibrációs görbét készítik.*

5.3.4. Egyéb módszerek a fehérjetartalom meghatározására

Fehérjeoldatok fehérjetartalmának mérésére az előzőekben ismertetett módszereken kívül alkalmasak lehetnek még a *turbidimetriás*, a *fluorometriás*, a *refraktometriás* és a *polarimetriás* eljárások is. Ezek a módszerek nemigen terjedtek el a gyakorlatban, azonban speciális problémák megoldására alkalmasak lehetnek. A turbidimetriás eljárások azon alapulnak, hogy az igen apró, lebegő részecskéket tartalmazó szuszpenziók, mint amilyenek a nagy hígításban kicsapott fehérjék, a rajtuk áthaladó fény egy részét szétszórják, az oldatot zavarossá teszik. A zavarosság mérése a *nefelometria*. A zavarosság kétféle módon mérhető: a turbidimetriás eljárás során mérhetjük a zavaros oldaton áthaladó fény intenzitását, illetve intenzitásának csökkenését a tiszta oldattal

szemben, az abszorpciós fotometria szabálya szerint. A zavarosság mérésének másik módja az, amikor a lebegő részecskék által szétszórt fényt egy meghatározott szögben mérjük, mely mérési elv hasonló a fluorimetriához. A zavarosság bizonyos határok között arányos a lebegő részecskék számával, illetve adott diszperzitásfok esetén a lebegő anyag koncentrációjával. A koncentráció a turbidimetriás mérés során csak empirikus kalibrációs görbe segítségével mérhető, amennyiben az összes kísérleti körülmény azonos.

Turbidimetriás fehérjemeghatározással jól követhető a fehérjék enzimes lebomlása. Hasonlóan lehet a zavarosságból következtetni a fehérjekicsapás koncentrációfüggésére is. A Zein-oldat koncentrációját úgy határozták meg, hogy 70%-os alkoholos fehérjeoldat 2 cm^3 -éhez 6 cm^3 1%-os NaCl-oldatot adtak, és 590 nm-en 60 perc után fotometriásan mérték a zavarosságot. Amennyiben a fehérjéből valamilyen kicsapószerrel zavaros oldatot sikerül létrehozni, akkor a turbidimetria az elválasztás alkalmával alkalmas lehet akár az egyes fehérjefrakciók detektálására is.

A *fluorometriás eljárások* alkalmazásánál a fehérjemeghatározásra két lehetőség adódik: a fehérjék kapcsolása fluoreszkáló vegyületekhez, illetve a fluoreszkáló vegyületek fluoreszcenciájának kioltása fehérje adagolásával. Az első módszer technikájának lényege, hogy a festékkötéses módszerekhez hasonlóan fluoreszkáló festéket kapcsolnak a fehérjéhez, és mérik az így kapott komplex fluoreszcenciáját 510 nm-en történő gerjesztés után 540 nm-en. A többféle fluoreszcenciás festék közül az *eozin* bizonyult a leghasználatóbbnak. Az eozinon kívül *fluoreszkarmint* is használtak fehérjék, peptidok, aminosavak és primer aminok meghatározására, a fluoreszkarmint ugyanis szobahőmérsékleten és vizes oldatban is reagál az aminocsoporttal. A gerjesztést 390 nm-en végezték, a kisugárzott fluoreszkáló fény intenzitását pedig 475 nm-en mérték. A reakció pH=4–10 közötti tartományban játszódik le, és segítségével 0,5 μg fehérje határozható meg. Ugyancsak érzékeny módszert dolgoztak ki a hisztinok meghatározására, melynek segítségével 0,2–0,4 μg , lizinben vagy argininben gazdag hisztint lehet meghatározni.

A *refraktometriás és a polarográfiás eljárások gyakorlati jelentősége elenyésző*. Talán említésre méltó az a tény, hogy egyes aminosavak, polipeptidok és fehérjék meghatározott pH-n kobalttartalmú pufferben oldva katalitikus reakcióba lépnek a csepegő Hg-elektroddal, így polarográfiásan mérhetők. A reakciót a fehérjék –SH csoportja adja. A módszerrel μg nagyságrendben lehet fehérjét meghatározni.

5.4. Élelmiszer-fehérjék vizsgálata elektroforézissel és izoelektromos fókuszálással

5.4.1. Az elektroforézis és analitikai alkalmazása

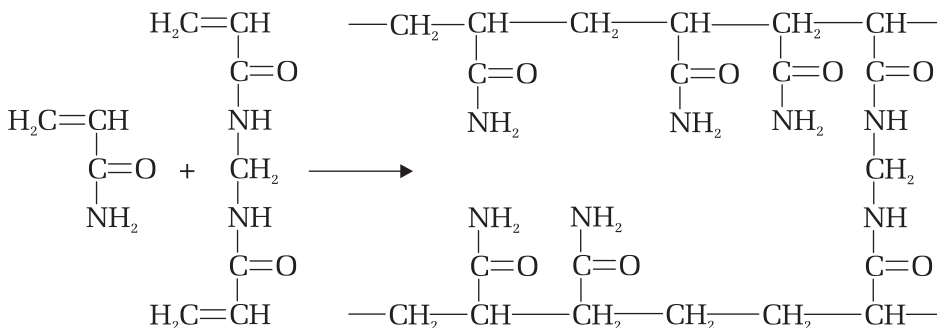
Az elektroforézis olyan elválasztási folyamat, amelyben *a szeparálandó komponensek elektromos erőterben különböző sebességgel vándorolnak*. A részecske vándorlási sebességét az elektrolitoldatban főképpen annak töltése és az elektromos térerő szabja meg. Az elválasztandó molekulának magának is lehet töltése, vagy a töltést eredményezheti a molekula felületére adszorbeálódott ion. A töltéssel rendelkező részecskéknek a közegben való mozgását a részecske átmérőjével és az oldat viszkozitásával arányos súrlódási ellenállás gátolja. A mozgást gátolhatja még az elektrolitoldat, melynek az elválasztandó anyag molekuláival ellentétes előjelű ionjai burokszerűen körülveszik a részecskéket. Ez az ionfelhő hidrátburkot vonz magához, mely gátolja a részecskék mozgását. A fékezőerő annál nagyobb, minél nagyobb a puffer ionerőssége, ezért a vizsgálandó molekula vándorlási sebessége elektromos erőterben az ionerősség növekedésével csökken.

Az *elektroforézis* valójában anyagkeverékek analitikai vagy preparatív elválasztására szolgáló eljárás, mely *az egyes komponensek elektroforetikus mozgékonyágának különbségén alapszik*. A mintaadagolás módja szerint lehet szakaszos vagy folyamatos üzemű, az elválasztáshoz alkalmazott közeg minősége szerint pedig megkülönböztethetünk szabad és szilárd hordozón végzett elektroforézist (a hordozó lehet papír, keményítő, agar, cellulóz-acetát, porózus üveg vagy poliakrilamid-gél). A használt feszültség nagysága alapján ismerünk kis-, közép- és nagyfeszültségű elválasztásokat.

Az analitikai eljárások közül a múlt század nyolcvanas éveiiig legelterjedtebb volt a papírelektroforézis, manapság azonban a poliakrilamid-gél elektroforézis (PAGE) szinte teljesen háttérbe szorította a többi módszert. A PAGE alkalmazásának legszembetűnőbb oka nagy felbontóképessége, hisz míg a papírelektroforézissel a szérumfehérjéket csak 5–7 frakcióra, addig a PAGE-sel akár 50–60 frakcióra is szét lehet választani. Fentiek miatt a papír-, a cellulóz-acetát-membrán-, a keményítő- és az agargél elektroforézises technikákkal nem foglalkozunk, röviden ismertetjük viszont a PAGE alapjait.

5.4.2. A poliakrilamid-gél elektroforézis (PAGE)

A poliakrilamid, az akrilamid és az N,N'-metilén-bisz-akrilamid (BIS) térhálós szerkezetű polimerizációs terméke; a térhálósító BIS a poliakrilamid-láncokba beépülve szabad funkciós csoportjaival, a szomszédos láncokkal is reagálni képes, az 5.5. ábra szerint.



5.5. ábra. Az akrilamid és a BIS reakciója

A hálószerkezet kialakulásával polimer gélgomolyagok keletkeznek, melyekben a poliakrilamid-láncok a maximális entrópiának megfelelően szabálytalan alakot vesznek fel. Az akrilamid- és a BIS-koncentráció, valamint a polimerizáció foka megszabja az átlagos pórusnagyságot, a pórusnagyság pedig megszabja az azokon még átszűrődő molekulák maximális tömegét.

A poliakrilamid-gél előnye a kémiai stabilitás és indifferencia, a nagyfokú transzparencia, a tág határokon belül megválasztható pórusnagyság, az adszorpció és az elektrooszmózis hiánya, és a legtöbb oldószerben való oldhatatlanság. Fentiek miatt a PAGE szinte valamennyi fehérje elválasztására és analizésére alkalmas; jól szeparálható vele mind a neutrális, mind a bázikus, mind a savanyú karakterű fehérjék, mert a poliakrilamid-gél teljes mértékben inert, nem változtatja meg az elválasztandó fehérjemolekulák natív tulajdonságait. Ha a gél és a puffer összetételét jól választjuk meg, bármilyen molekulatömegű, illetve tulajdonságú fehérjét a legjobb felbontóképességgel tudunk elválasztani.

A poliakrilamid-gél elektroforézis folyamata a következők szerint összegezhető. A szétválasztani kívánt fehérjekeverék a mintagélbe kerül, amely nagyporúsú, kis akrilamid-koncentrációjú gél. Az alatta levő

réteg a gyűjtő- vagy elosztógél szintén nagypórusú, benne koncentrá-
lódik az elektroforézis első fázisában az elválasztandó anyag. Az elvá-
lasztógél kisebb pórusú, melyben a fehérjemolekula-keverék frakciói-
ra szeparálódik. A gélekben különböző pufferoldatok vannak, melyek
a vezető-, illetve követőionokat tartalmazzák. A különböző összetéte-
lű gél- és elektródpufferok következtében a fehérjemolekulákkal együtt
kétféle ion vándorol az elektromos erőter hatására; a gélben lévő puffer
vezető ionjai, az ún. vezetőionok, és az elektródpufferből származó ún.
követőionok. Az elválasztás kezdetén a minta- és a gyűjtőgélben csak ve-
zőőionok találhatók, a követőionok pedig kizárólag az elektródpufferben
vannak. Az áram bekapcsolásakor a vezetőionok nagyobb mozgékony-
ságuk következtében a gyűjtőgélben a fehérjék és a követőionok előtt
mozognak, egy kisebb vezetőképességű zónát hagyva maguk mögött. Mi-
vel a vezetőképesség és az elektromos térerő fordítva arányos, a kisebb
vezetőképességű zóna nagyobb térerőt kap, ami a fehérjéket és a követő
ionokat felgyorsítja, melyek a vezetőionok mögött azonos sebességgel
vándorolnak. Amint a vándorló fehérjezóna a gyűjtő- és az elválasztó-
gél határára ér, megváltozik a pH és a pórusnagyság. Az elválasztógél
pH-jának hatására a követőionok disszociációja és így mozgékony-sága
többszörösére növekszik, ezáltal sebességük majdnem eléri a vezetőio-
nokét, meghaladja minden fehérjemolekula mozgékony-ságát, melynek
következtében a követőionok a fehérjék előtt, a vezetőionok mögött fog-
nak haladni.

A PAGE alapvető vegyületei az akrilamid és a bisz-akrilamid, a kata-
lizátorok, melyek a térhálós szerkezet kialakításáért felelősek, a különfé-
le detergensok, melyek a PAGE alkalmazási lehetőségeit tovább bővítik
és tökéletesítik, és a pufferoldatok, melyek az elválasztásnál az optimá-
lis pH-t és a különböző ionokat szolgáltatják. A különböző gélkészítési
technikák ismertetése nem tartozik szorosan a tárgyhoz, ezért ettől el-
tekintünk. Azt csak megemlítjük, hogy a korábban alkalmazott pálcika
alakú géleket a laptechnika szinte teljes egészében kiszorította, mert ez
utóbbi sok minta párhuzamos futtatására alkalmas, az elektroforézis fo-
lyamán keletkezett hő elvezetése biztosabb, kétdimenziós elválasztásra
is lehetőséget ad, a denzitometriás kiértékelés pontosabb, a dokumentá-
lás könnyebb és könnyen alkalmazható az autoradiográfiás módszer is.

5.4.2.1. *A fehérjeminták előkészítése, géltre vitele és az elektroforézis folyamata*

A mintafelvitel előtt meg kell határozni a vizsgálandó anyag fehérjetartalmát, hisz attól függően, hogy a minta hány komponenst tartalmaz, egy mintahelyre 10–100 μg fehérjét kell feljuttatni, annak ellenére, hogy egyetlen fehérje 0,1 μg mennyiségben is jól detektálható. 30–50 vagy több komponenst tartalmazó minta esetén 200–400 μg fehérjét kell a géltre felvinni. Biológiai folyadékokat a fehérjekoncentrációtól függő mennyiségben akár közvetlenül is a géltre lehet vinni, élelmiszer-fehérjék esetében azonban az analízist meg kell előznie jelentős mértékű tisztításnak. Az előkészítés során 10–100 μg fehérjét tartalmazó oldathoz 0,1 cm^3 puffert adunk, melyben előzőleg 0,1%-os metanol–ecetsav (9:1 arányban) oldott bróm-fenolkéket teszünk, mely mint jelzőfesték a frontvonal haladását mutatja az elektroforézis folyamán. Ebből a keverékből lehetőleg 10–20 μl anyagot rétegzünk egy-egy mintahelyre. Nagy ionerősségű oldatok esetében az elektroforézist megelőzően feltétlenül dializálni kell a hígított gyűjtőgéllal, vagy a hígított elektródpufferrel szemben.

A minta felvitele után indíthatjuk az elválasztást. Alkalikus pufferrendszerekben a fehérje, negatív töltésének következtében, az anód felé vándorol. Az egyenáramú áramforrást úgy kell megválasztani, hogy a feszültség és az áramerősség állandó kontroll alatt maradjon. A mintát kisebb áramerősség mellett koncentráljuk (1 mA/gél), majd 2–5 mA/gélre növelve végezzük a fehérjemolekulák szétválasztását. Minden eltérő gélméret és puffer esetében más az optimális feszültség és áramerősség, azt azonban figyelembe kell venni, hogy ha a feszültség és az áramerősség az optimálisnál kisebb, akkor az elválasztott zónák életlenek lesznek, ha viszont nagyobb, akkor a keletkezett hő rontja a szeparációt. A futtatást addig folytatjuk, amíg a jelzőfesték a gél szélétől 0,5–1 cm távolságra nem ér, amikor az áramforrást kikapcsoljuk, és a géleket kiszedjük. A géllapok eltávolítása a készülék konstrukciójától függ. Egyes esetekben vékony tűvel és vízszaggárral lehet eltávolítani, majd az elvált géllapot ajánlatos azonnal fixálóoldatot tartalmazó edénybe helyezni. A fixálás megakadályozza a fehérje kidiffundálását a gélből, és a festőoldatot is kíméli. Fixálás után a fehérjezónákat festéssel tesszük láthatóvá, majd sor kerülhet a fehérjefrakciók minőségi és mennyiségi kiértékelésére. Festésre leggyakrabban az amidofeketét vagy a coomassie kéket használjuk, melyek gélen megkötődő feleslegét mosással kell eltávolítani.

A proteinogram kiértékelése festés nélkül is megvalósítható az UV fényabszorpció segítségével, de alkalmas erre a fluorimetriás értékelés is a fluoreszcens festést követően. A gyakorlatban jobban elterjedt azonban a festett proteinogramok értékelése, melynek során a festékek a fehérjemolekulák szerkezeti sajátosságai miatt különböző módon kötődnek. Ezért a megfestett frakciók kvantitatíve csak ugyanazzal a fehérjével felvett kalibrációs görbe alapján értékelhetők. A mennyiségi értékelés követelménye a jó elválasztás, a denzitométer és az integrátor, illetve a számítógép szoftver. Ilyen esetben is rendkívüli óvatossággal kell eljárni, hisz a mennyiségi értékelést befolyásolhatja a csúcsok nem megfelelő elválása, és ha a detektor érzékenysége nem lineáris az abszorpcióval.

Az elkészült proteinogramot 7%-os ecetsavban hosszú ideig lehet tárolni a festés intenzitásának csökkenése nélkül. Géllapokat dehidratálással is lehet tartósítani.

5.4.2.2. Speciális alkalmazások az élelmiszer-fehérje kutatásban

Az élelmiszer-fehérjék analízisére a PAGE sikeresen alkalmazható, azonban figyelemmel kell lenni arra, hogy az elválasztással kapott frakciók száma nem mindig adja meg a mintában lévő különböző fehérjekomponensek valóságos számát. Ugyanaz a fehérje vagy enzim több csík formájában is megjelenhet a proteinogramon, mert az esetek egy részében különbség lehet az izomermolekulák méretében, melyet a töltésbeli különbség vagy a kisebb ligandumkötés okozhat, és a frakciók konformációja is különböző lehet. Előfordulhat azonban az is, hogy a frakciók heterogenitását az eljárás során elkövetett hiba okozza a puffer és a fehérjemolekulák közötti, valamint az egyes fehérjefrakciók közötti kölcsönhatások következtében. Így az adott fehérjemolekula részleges disszociációja következhet be, a fehérje aggregációja állhat elő, a konformációs izomerek közötti kapcsolódás jöhet létre, és a fehérjemolekulák közötti komplexképződés sem zárható ki az elválasztás folyamán.

A PAGE alkalmazható élelmiszer-fehérjék molekulatömegének meghatározására is. A fehérjék Na-dodecil-szulfáttal (SDS) való kezelése a molekulákat azonos töltésű random láncokká alakítja, mely az SDS gélelektroforézis molekulatömeg meghatározására történő alkalmazásának az alapja. A különféle módszerek a fehérjéket SDS-sel inkubálják, merkaptó-etanolal kezelik, majd detergenst tartalmazó gél- és pufferrendszert használnak, melynek során az *SDS-fehérjekomplex elektroforetikus vándorlása a molekulatömeggel lesz arányos.* A vizsgálandó

fehérje mozgékonyágát ismert molekulatömegű fehérje mozgékonyágával összehasonlítva, a molekulatömeg meghatározható. Kalibrációs görbe készítése céljából meghatározzuk különböző ismert molekulatömegű fehérjék mobilitását, majd rendszerint *a molekulatömeg logaritmusát a mobilitás függvényében ábrázolva* olyan *hitelesítő görbét kapunk*, melynek segítségével a vizsgált fehérje molekulatömege a relatív mobilitás alapján meghatározható.

A PAGE jól használható *enzimek specifikus kimutatására, elválasztására és mennyiségi meghatározására* is. Ezen túl a PAGE alkalmazható az élelmiszerfehérje-kutatásban, különféle fehérjék szétválasztására. A többkötetnyi alkalmazás közül kiemelkedő, hogy a PAGE-t alkalmazták a bab oldható fehérjéinek izolálására, közeli rokonságban lévő növények rokonsági fokának meghatározására, állati eredetű fehérjék (tej, tojás, hús) fehérjefrakcióinak elemzésére és az izomszövet oldható fehérjéinek jellemzésére. Az utóbbi időben olyan bonyolultnak tűnő feladatokat is sikerült a PAGE-val megvalósítani, mint a különböző fajú állatok tejének megkülönböztetése és a keverési arány meghatározása. Ennek során Vörös és mtsai. egyrészt a kancatej fehérjefrakciót tanulmányozták, másrészt módszert dolgoztak ki a kancatejhez hozzákevert tehéntej mennyiségének meghatározására. Az α_1 - és a β -kazein vizsgálatához 8%-os natív PAGE gélt használtak 4M karbamidtartalommal, a savófehérjék esetében pedig 14%-os PAGE gélt karbamid nélkül. A gél mérete mindkét esetben $80 \times 100 \times 1$ mm volt, az analízis során 15-ös fésűt alkalmaztak, és 10 mg/cm^3 -es hígítás után a felvitt mintamennyiség $4 \mu\text{l/slot}$ volt. A futtatáshoz TRIS-glicin-puffert használtak, a fixálást 12,5%-os triklór-ecetsavval, a festést 0,15%-os Serra-blue-G-vel végezték. A savófehérjék vizsgálatakor a 14%-os karbamidmentes natív PAGE-rendszerben nyolc egymástól jól elkülöníthető fehérjefrakciót találtak. Az α_1 -kazeinek és a β -kazeinek vizsgálata során 8%-os, 4M karbamidtartalmú PAGE gélrendszerben 16 fehérjekomponenst sikerült elkülöníteni. A 18 vizsgált kancatejminta közötti különbségek egyértelműen a genetikai polimorfizmus meglétét bizonyítják.

5.4.3. Különféle fehérjék szétválasztása és meghatározása izoelektromos fókuszálással

Az elektroforézis konstans pH-jú gélek és pufferek segítségével történik, ezzel szemben az izoelektromos fókuszáláshoz (IEF) olyan *pH-gradienst hozunk létre, amely a katódtól az anódig folyamatosan*

változik, így tulajdonképpen pH-gradiens segítségével végezzük az elektroforézist. A pH-gradiensben az egyes fehérjék töltésüknek megfelelően vagy a katód, vagy az anód irányába vándorolnak, ott azonban, ahol a pH az egyes molekulák izoelektromos pontjának megfelelő, megállnak, hisz ott töltéssel nem rendelkező, semleges molekulaként viselkednek. Összefoglalva tehát *a fehérjék abban a pontban fókuszálódnak, ahol a közeg pH-ja a fehérje pI-jével azonos*. A módszer kidolgozását az tetten lehetné, hogy előállították a vivő Ampholine-preparátumot, amely különböző poliamino- és polikarboxisavak keveréke, mellyel sikerült megvalósítani a folyamatosan változó pH-t, mely pH-gradiens a meghatározás során stabilis. Az alifás poliamino- és polikarboxisavak jól oldódnak vízben, pH-értékük különböző, az egyes komponensek pH-ja 3 és 10 között változik, de megfelelő módszerrel a pH-intervallum választható például 4 és 6, 5 és 8, 7 és 9 vagy 8 és 10 között. A vivő-amfoliteknek 280 nm-en van abszorpciója, ami kis fehérjekoncentráció esetében nagyobb hibát okozhat. Ha a fehérjetartalmat színreakcióval akarjuk meghatározni, akkor mindenképpen dialízist kell alkalmazni legalább 500-szoros térfogattal szemben, 72 órán át, az oldószert 10–12 óránként cserélve.

Az izoelektromos fókuszálást szacharóz gradienssel is kombinálhatjuk, melynek segítségével elsősorban *a fehérje izoelektromos pontját tudjuk megállapítani*. Napjainkban legnagyobb jelentősége a poliakrilamid-gélben végzett izoelektromos fókuszálásnak van, melynek segítségével többek között a tejfehérje genetikai variánsokat is szét lehet választani. Az izoelektromos fókuszálás alkalmas lehet arra is, hogy különféle fajok egymáshoz kevert, hasonló karakterű fehérjéit szét lehessen választani, és mennyiségüket meg lehessen határozni. Vörös és mtsai. arra vállalkoztak, hogy a drága kancatejhez hamisítási célból hozzákevert tehéntejet egyrészt kimutassák, másrészt annak mennyiségére közelítő információt kapjanak. A fehérjefrakciók elválasztását CA-IEF (+10 mg glicin)-rendszerben, $124 \times 258 \times 0,2$ mm gélen végezték, 0,5M H_3PO_4 anódpuffer és 0,5M NaOH katódpuffer alkalmazásával. A minta hígítása 10 mg/cm^3 , a mintafelvitel módja szűrőpapír, a felvitt mennyiség pedig $11 \mu\text{l/slot}$ volt. A fixálást 12,5%-os triklór-ecetsavval, a festést pedig 0,15%-os Serra-blue-G-vel végezték.

Az izoelektromos fókuszálással a kanca- és a tehéntejből készült elektroforetogramokat összehasonlítva feltűnő a két állatfaj tejfehérje szerkezetének különbsége, amely legmarkánsabban a tehéntej α_s -kazein komponenseinek helyzetével és azok intenzív tónusával jellemezhető.

A kancatej ugyanezen a helyen nem tartalmaz fehérjekomponenseket, ezért ha a hasonló körülmények között végzett IEF során a kancatej-mintában ebbe a tartományba eső fehérjék fordulnak elő, akkor biztosan állítható, hogy a kancatejet más, vélhetően tehéntejjel elegyítették. Ha az elektroforetogramról denzitogramot is készítünk, akkor a kontroll tej-minták felhasználásával az elegyítés mennyiségi arányára is kaphatunk információt.

5.5. A fehérjék oszlopkromatográfiája

A kromatográfia szorpción és deszorpción alapuló elválasztástechnikai módszer, melynek során az elválasztandó anyagok egy keskeny kezdeti zónáról különféle szorbenseken, folyadék- vagy gázáramlás hatására, eltérő sebességgel mozdulnak el. A fehérjeanalitikában és a preparatív elválasztástechnikában az oszlopkromatográfia kiemelkedő jelentőségű, melynek segítségével hasonló szerkezetű frakciók választhatók el egymástól, preparatív oszlopkromatográfiával pedig *egy-egy anyagen nagy tisztaságban izolálható*. Fehérjék szétválasztására és meghatározására mind a folyadék–szilárd, mind folyadék–folyadék kromatográfia elterjedt, melyek az elválasztást előidéző hatások alapján adszorpciós, megoszlásos és ioncserés elválasztásokra oszthatók. Mindhárom esetben követelmény, hogy az állófázis oldhatatlan legyen a mozgófázisban, az állófázis irreverzibilisen ne kösse meg az elválasztandó anyagokat, ne bontsa el azokat és ne lépjen reakcióba a mozgófázis komponenseivel. Az eljárás során az oszlopon az elválasztandó anyagok különböző erővel kötődnek, majd a mozgófázis áramoltatásával a kötődésük erősségétől függően deszorbeálódnak, az oszlop további részében pedig ismét az állófázisra adszorbeálódnak. Ez a folyamat folytatódik az oszlop teljes hosszában, melynek során jelentős eltolódások jönnek létre a szétválasztani kívánt komponensek között, melynek következtében az elválasztandó komponensek az oszlop végén különböző időpontban elkülönülve jelennek meg. Az eluált anyagot a fehérjeanalitikában általában UV-abszorpcióval határozzák meg; az *UV-abszorpció időbeni változását ábrázolva kapjuk a kromatogramot*, melynek segítségével az egyes komponensek azonosíthatók és mennyiségileg meghatározhatók.

5.5.1. A fehérjék vizsgálata adszorpciós oszlopkromatográfiával

Az adszorpciós kromatográfiában alkalmazott szorbensek közül csak kevés alkalmazható fehérjék elválasztására, mert ezen szorbensek *hidrofil aktív centrumain a kötődés adszorpcióval megy végbe*, kapacitásuk nagy molekulájú anyagokkal szemben viszonylag kicsi, így a fehérjék ezzel a módszerrel csak kis hatásokkal választhatók el. Az ilyen típusú kromatográfiás körülmények között a fehérjék denaturálódhatnak és biológiai aktivitásukat is elveszíthetik, ennek ellenére e módszer révén a fehérjék szétválasztására számos alkalmazást írtak le. Hidroxi-apatiton például elemezték az albumin- és a γ -globulin-frakciókat, a tojássárgája lipoprotein- és kromoprotein-frakcióit, meghatározták a lizozim és az ov-albumin mennyiségét, és szétválasztották a szérumprotein-frakciókat.

Ritkán ugyan alkalmazták adszorbensnek a fehérjeanalitikában az alumínium-oxidot, a cellulózt, a kaolint és a szilikagélt, azonban ezek jelentősége a gyakorlatban minimális.

5.5.2. A fehérjék vizsgálata megoszlásos oszlopkromatográfiával

A megoszlásos oszlopkromatográfia során *az elválasztás alapja az elválasztandó anyag ismételt ellenáramú megoszlása egy álló- és egy mozgófázis között*. Az állófázis egy szemcsés hordozóra felvitt nagy viszkozitású folyadék, a mozgófázis pedig vizes oldatok és szerves oldószerek különböző összetételű elegye. A fázisok közötti egyensúlyi koncentráció-megoszlás elsősorban a mozgófázis polaritásától függ, ezért a megoszlási hányados a mozgófázis összetételének változtatásával módosítható. A megoszlásos oszlopkromatográfia az adszorpciós oszlopkromatográfiához hasonlóan a fehérjekutatásban nem tudott igazán nagy jelentőségre szert tenni, melyet azokkal a bonyolult viszonyokkal lehet magyarázni, melyek az álló- és mozgófázis, valamint a fehérjék kölcsönhatása következtében kialakulnak.

5.5.3. A fehérjék vizsgálata ioncserés oszlopkromatográfiával

Az ioncserélő oszlopkromatográfia álló fázisa egy olyan ioncserélő anyag, amelynek mátrixához elektrolitos disszociációra képes csoportok kötődnek kovalens kötéssel. Azokat az ioncserélőket, amelyek mátrixán *a fix ion negatív töltésű savmaradék, kationcserélőknek, a pozitív töltésű fix iont* tartalmazókat pedig *anioncserélőknek* nevezzük. A fix ionok

ellenionjai ugyanolyan töltésű más ionokkal kicserélhetők. Az ioncserés kromatografálás során a szorbens ellenionjait először az oszlopra adagolt minta ionjai váltják fel, majd ezeket, töltéseik nagyságával ellenkező sorrendben, az eluáló pufferoldat ionjai fokozatosan kicserélik. A kicserélés, illetve elválasztás függ a kromatografálás hőmérsékletétől, valamint a mozgófázis ionkoncentrációjától és a pH-tól. Az ioncserélő szorbenseken a fehérjék főként Coulomb-féle erőkkel kötődnek, az elektrosztatikus kölcsönhatásokon kívül azonban apoláros adszorpcióval és hidrogénhidakkal való kötődéssel is számolhatunk. A nagy molekulatömegű fehérjék esetében a töltést nemcsak az őket alkotó aminosavak aránya határozza meg, hanem jelentősen befolyásolja azt az oldószer pH-ja is. Az izoelektromos pontnál kisebb pH-jú oldatban a fehérjemolekulák pozitív, nagyobb pH-jú oldatban pedig negatív töltésűek lesznek, ezért *a pozitív töltésű anyagok szorpciójához kationcserélő, a negatív töltésűekéhez pedig anioncserélő szorbenst kell alkalmazni*. Az izoelektromos pont felett és alatt egy-egy pH-tartományban a fehérjék mind kation-, mind anioncserélő gyantán kromatografálhatók, az izoelektromos pontban viszont az ikeriont nem köti meg sem a kation-, sem az anioncserélő szorbens. Fehérjék oszlopkromatográfiás elválasztásához ioncserélő műgyantákat, cellulóz alapú ioncserélőket vagy ioncserélő géleket alkalmaznak.

5.5.3.1. Elválasztás ioncserélő műgyantákon

A fehérjék ioncserés oszlopkromatográfiás vizsgálatakor ügyelni kell arra, hogy a nagy molekulatömegű, erősen differenciált térszerkezetű anyagok a szorpció következtében könnyen denaturálódhatnak, mások pedig az ioncserélő gyanta funkciós csoportjaira irreverzibilisen kötődhetnek. A feladat megoldásához szükséges optimális ioncserélő kiválasztását elősegíti, ha ismerjük az elválasztandó anyagok izoelektromos pontját, biológiailag aktív anyagok esetében pedig azt a pH-tartományt, melyben stabilitásukat nem veszítik el. A fehérjeanalitikában leggyakrabban divinil-benzollal különféle mértékben térhálósított szulfonált polisztirol, valamint polimetakrilsav műgyanták kerülnek felhasználásra. A kationcserélő műgyantákon kromatografálható fehérjék általában kisebb molekulatömegűek, és bázikus jellegűek. Szulfonált polisztirol műgyantán sikerült olyan fehérjéket szétválasztani, mint a *citokróm-c*, a *ribonukleáz*, a *dezoxiribonukleáz*, a *lizozim*, az *inzulin*, a *prolaktin*,

a *pektináz*, a *celluláz*, a *papain*, a növekedési hormon, a hisztinok, a hemoglobin, a *tripszinogén*, a *kimotripszinogén* és a *kimotripszin*. Nagy számú publikáció jelent meg a peptidek ioncserés oszlopkromatográfiás szétválasztásáról és meghatározásáról is. Vizsgálták egyes fehérjék enzimhasítás után kapott fragmenseinek mennyiségét is, és így ez az eljárás is hozzájárult a fehérjék elsődleges szerkezetének meghatározásához.

5.5.3.2. Elválasztás cellulózalapú ioncserélőkkel

Igen jó hatásfokkal használhatók fehérjék és peptidek elválasztására az erősen hidrophil, cellulózalapú ioncserélők és gél ioncserélők. Az ioncserélő cellulózszármazékok aktív csoportjai a cellulóz felületén helyezkednek el, de ezek mellett a cellulóz hidroxilcsoportjai is megkötik a bonyolult szerkezetű fehérjéket anélkül, hogy azok a szorpció következtében denaturálódnának. A leggyakrabban használt cellulózszármazékok a karboxi-, a metil- és a foszforilált-cellulóz kationcserélők, a dietil-amino-etil-, az amino-etil- és az epiklór-hidrinezett, valamint trietil-aminozott cellulóz anioncserélők.

Az ioncserélő cellulózszármazékok igen hamar elterjedtek, és nagy jelentőségre tettek szert a fehérjeanalitikában. Ezek az anyagok a cellulóz rostos szerkezete és a cellulózmolekula hidroxilcsoportjai miatt nagy mennyiségű vizet tudnak felvenni, ezért a duzzadt cellulóz tömege 7–10-szerese lehet a száraz cellulóz tömegének. A száraz ioncserélő cellulóz előkészítésének első lépése ezért a cellulóz hidratálása, majd az első eluáló pufferrel történő szuszpendálást követően a kromatografáló oszlopba való töltése. A szétválasztani kívánt fehérjeoldatot az oszlop felett lévő puffer alá rétegezhajjuk, vagy pedig az oszlop feletti puffer leengedése után az oszlop felszínére engedhajjuk a kromatografálandó oldatot. Ezt követően növekvő pH-jú és ionkoncentrációjú pufferekkel, gradiens elúcióval választjuk szét a frakciókat. Miután a fehérjefrakciók elhagyják az ioncserélő oszlopot, az oszlop töltetét 1M NaOH-dal regeneráljuk, a lúgot az oszlopról desztillált vízzel kimossuk, majd a következő elválasztás előtt az első puffer oldatával addig mossuk, amíg az oszlopról távozó pufferoldat pH-ja azonos nem lesz az eredeti pufferével.

Az ioncserélő cellulózok felhasználása fehérjék kromatografálására szinte áttekinthetetlenül bőséges. Az ioncserélő cellulóz és a pufferek összetételének változtatásával szinte valamennyi jelenleg ismert fehérje izolálása, a többi fehérjefrakciótól történő elválasztása és meghatározása megvalósítható.

5.5.3.3. Elválasztások ioncserélő gélekkel

A térhálósított dextránalapú és a poliakrilamid-alapú gélek mind ioncserélő, mind géliszűrő tulajdonsággal rendelkeznek, a kromatográfiás elválasztás során azonban mégis inkább az ioncsere kerül előtérbe. Az ioncserélő gélek különösen előnyösen alkalmazhatók biológiailag aktív, labilis anyagok elválasztására, illetve tisztítására. Alkalmazásuk során célszerű figyelembe venni mind az ioncserélőkre, mind a géliszűrőkre vonatkozó elveket és technikai megoldásokat.

5.5.4. A fehérjék vizsgálata egyéb kromatográfiás módszerekkel

A fehérjék szétválaszthatók és meghatározhatók affinitás-kromatográfiával, melynek során az állófázis olyan szorbens, amelynek oldhatatlan mátrixához kovalens kötésre képes gyök segítségével egy biológiailag aktív vegyület van kötve. Ez a mátrixhoz kötött bioszorbens-molekula a mozgófázisból származó biológiailag aktív vegyülettel reakcióba tud lépni. A bioszorbens által létrehozott reakció lehet egy reverzibilis kötés, vagy lehet egy olyan kémiai folyamat, melynek során a mozgófázisban lévő molekula kémiaiilag átalakul. A bioszorbensek kialakítására egyik leggyakrabban használt mátrix brómciános kezeléssel állítható elő agaróz szuszpenzióból, majd az iminocsoporthoz hozzákapcsolják a biológiailag aktív komponenst, ami legtöbbször fehérje. Ily módon *enzimeket lehet a szilárd hordozóhoz kapcsolni*, és az immobilizált enzimeket fel lehet használni fehérjék szétválasztására és meghatározására.

Az affinitás-kromatográfia mellett az elmúlt 20 évben rohamos lépésekkel fejlődött a *nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia*, mely ugyancsak *kiválóan alkalmas fehérjekomponensek szétválasztására és meghatározására*. A mozgófázis áramoltatása a kromatografálás meggyorsítása érdekében rendkívül nagy nyomáson történik, melynek során nő a hatékonyság, másrészt pedig felgyorsulnak az elválasztási folyamatok. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia további előnye az automatizálhatóság, melynek következtében a szubjektív hiba gyakorlatilag csak a mintaelőkészítésre korlátozódik.

5.6. A fehérjék gélkromatográfiája

5.6.1. A gélkromatográfia alapjai

A gélkromatográfia a molekulatömeg-különbségeken alapuló, egyik legelterjedtebb elválasztási módszer. A molekulaméret szerinti elválasztás jól illeszthető az előzőekben ismertetett kromatográfiás módszerekhez. A gélkromatográfiás elválasztás során a mozgó fázis valamilyen folyadék, a töltet pedig finom eloszlású gél, megfelelő pórusmérettel, ezért *a gél belsejébe csak azok a molekulák tudnak behatolni, amelyek mérete a gél pórusméreténél kisebb*. Amely molekulák behatolnak a gél szemcsék belsejébe, azok tovább maradnak az oszlopon, nagyobb oldószertérfogattal eluálódnak mint a gélbe behatolni képtelen, a gél pórusainál nagyobb molekulák. Mivel egy gél pórusai mindig inhomogének, a gélkromatográfia során a gél pórusainál kisebb és nagyobb molekulatömegű tartományba tartozó fehérjemolekulák egymástól elválaszthatók.

A kromatografálást háromdimenziós rácsot alkotó, térhálós szerkezetű géleken végzik. A térháló mechanikai stabilitást nyújt a gélnek, és a háromdimenziós térháló a gél pórusméretét is meghatározza. A gél mátrixának inertnek kell lennie, azon ioncsoportok nem, vagy csak kis mértékben lehetnek jelen. A gélnek mechanikailag és kémiaiilag stabilnak kell lenni, a gél és az elválasztani kívánt anyagok között legfeljebb gyenge, reverzibilis, hidrofób kölcsönhatások alakulhatnak ki. A gél szemcsemérete lehetőleg homogén legyen, hogy az eltérő méret miatt a részecskék közötti csatornák inhomogenitása ne következzen be. A kromatográfiás műveletekhez használt gélek kereskedelmi forgalomban kaphatók, és szinte minden elválasztáshoz megtalálható az optimális gél típus.

A gélkromatográfia legfőbb alkalmazási területei a gyors molekulatömeg-mérés, a preparatív csoportszeparálások a molekulatömeg alapján, az egyes csoportok preparatív frakcionálása, és a peptidok, valamint a fehérjék gélkromatográfiás tisztítása. Aminosavak is szétválaszthatók gélkromatográfiával, azonban e módszer pontossága, illetve hatékonysága meg sem közelíti az ioncserés oszlopkromatográfiás vagy a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás meghatározását.

5.7. A fehérjék rétegekromatográfiája

5.7.1. A rétegekromatográfia alapjai

A kromatográfiás módszerek közül a rétegekromatográfia a planáris módszerek csoportjába tartozik. Valójában egy „planáris” oszlopról van szó, ezért az oszlopmódszerek és a planáris módszerek között elvi alapokat tekintve gyakorlatilag alig van különbség. Az oszlopkromatográfia felbontóképessége ugyan jelentősen nagyobb, mint a rétegekromatográfiáé, ennek ellenére a rétegekromatográfiának számos előnye van az oszlopkromatográfiával szemben.

- A rétegekromatográfiával elválasztott vegyületek vizuálisan értékelhetők, a szétválasztott vegyületek kimutatására szelektív és specifikus színreakciók alkalmazhatók, így pár vegyület specifikusan kimutatható a sok komponens mellett.
- Oszlopkromatográfiás elválasztáskor egyes komponensek értékelhetetlenül, irreverzibilisen az oszlophoz kötődnek; rétegekromatográfiás elválasztáskor viszont a minta összes komponenséről áttekintést kapunk.
- A rétegekromatográfiában a kromatográfiás feltételek megváltoztatása rövid időt vesz igénybe, és fő előnye még az is, hogy a legtöbb rétegekromatográfiás módszer egyszerű, olcsó berendezésekkel, rövid idő alatt ad értékes adatokat néha bonyolult anyagkeverékek esetében is.

A rétegekromatográfiás analízis során a hordozók megválasztásával lehetőség van megoszlási, adszorpciós és ioncserés rétegekromatográfiás vizsgálatokra is. A *papírkromatográfia* manapság már háttérbe szorult, ezzel szemben rendkívüli módon elterjedtek a 0,25–0,50 mm vastag *kent rétegek*, melyeket megfelelő aktiválás után lehet analitikai célokra felhasználni. A kent rétegek mellett nagyon sok cég gyárt *kész réteglapokat*, melyek készítéséhez hordozólapnak üveglemezt és műanyag vagy alumíniumfóliát használnak. A kész réteglapok könnyen tárolhatók, darabolhatók, egyszerűen dokumentálhatók és egyenletes, homogén réteget adnak.

A vizsgálandó oldott anyagmintákat cseppenthetjük pontban vagy sávban, megfelelő mikropipettával vagy kapillárisal. A cseppentés során meleg levegővel a foltokat vagy sávokat beszárítjuk, mellyel a felcseppentett anyag mennyiségét széles határok közt változtathatjuk. A felcseppentés után a réteglapokat csiszolt fedelű futtatókádba állítjuk, melynek

az aljára töltjük a futtatószer-elegyet. Az oldószerelegy megfelelő távolságra jutása után a réteglapot a kádból kiemeljük, és a megszáradt rétegen a szétválasztott anyagokat saját színük, UV-fluoreszcenciájuk vagy megfelelő reagenssel való bepermetezés után, esetleg melegítéssel kombinálva, mutatjuk ki.

A rétegekromatográfiában végezhetünk kétdimenziós futtatást is, sőt az egyik dimenzióban rétegelektroforézist is alkalmazhatunk. A *kétdimenziós futtatással* a komponensek szétválását, beazonosítását és mennyiségi meghatározását javíthatjuk.

5.7.2. A rétegekromatográfia alkalmazása élelmiszer-fehérjék vizsgálatára

A fehérjéket gélrétegen, szerves és szervetlen alapú rétegeken, cellulózárétegen, esetleg ioncserélő rétegeken is elválaszthatjuk. Az ioncserélő vékony rétegen történő elválasztás inkább az aminosavak és a peptidek szétválasztására használható, míg a fehérjék elválasztására a gélréteg-kromatográfia a legalkalmasabb. A gélréteg készítésére általában a dextránalapú félszintetikus és az akrilamid-alapú szintetikus géleket használjuk. A gélrétegeket általában üveglapokon, 0,5 mm vastagságban, rétegen szerkezettel készítik. A kent rétegek 15–20 perces szabad levegőn történő állás után felhasználhatók kromatográfiás vizsgálatokhoz, illetve nedves kamrában hosszabb ideig tárolhatók, ha a mikroorganizmusoktól a réteget meg tudjuk védeni. A vizsgálandó fehérjemintából 1–5 μl -t viszünk a gélrétegre kapilláris vagy mikropipetta segítségével, és célszerű, ha a vizsgálati minta mellett ismert fehérjepreparátumot is futtatunk. A gélréteg-kromatográfiás futtatókamra egy olyan egyszerű berendezés, amely az üveglap 10–20 fokos dőlésével biztosítja az anyagok optimális vándorlási sebességét, a futtatókeverék pedig megegyezik a gélkromatográfiás elválasztásokhoz használt pufferrendszerekkel. A futtatás után a gélréteglapot a futtatókamrából kiemeljük, majd elvégezzük a lapok értékelését. A színes és fluoreszkáló anyagok esetén az értékelést közvetlenül végezhetjük, a gélrétegen szétválasztott fehérjék detektálására viszont a fehérjéket különböző módszerekkel megfestjük.

A gélréteg-kromatográfia alkalmazható peptidek és fehérjék molekulatömegének meghatározására, ugyanis *a fehérjék molekulatömegének logaritmus* és egy adott rétegen, azonos idő alatt *megtett távolság között szoros az összefüggés*. Ennek alapján ismert molekulatömegű fehérjék

futtatását követően megszerkesztett standardgörbe segítségével ismeretlen molekulatömegű fehérjék közelítő molekulatömege meghatározható.

A gélréteg-kromatográfia jelentős felhasználási területe a biológiai folyadékok fehérjeösszetételének meghatározása, továbbá a patológias fehérjék detektálása. Az ilyen bonyolult keverékek vizsgálata csak két-dimenziós módszerrel lehetséges, amikor is az első dimenzióban gélszűrést, a második dimenzióban pedig elektroforézist, illetve immundiffúziót célszerű használni. Gélréteg-kromatográfiával vizsgálhatók többek közt az enzimek is, melyek közül többet (pl. *tejsavdehidrogenáz*, *ornitin karbamoil transzferáz*, *glioxalát reduktáz*, *savanyú és lúgos foszfatáz*) gélkromatográfiával határoztak meg. A fehérjék elválasztására eredményesen használható a vékony gélrétegben végzett izoelektromos fókuszálás is, melyre általában poliakrilamid-gélt használnak. Ismeretes olyan módszer is, amellyel izoelektromos fókuszálás után az enzimek proteolitikus aktivitása is kimutatható.

A fehérjék elválasztására a folyadék–folyadék, valamint a folyadék–szilárd rétegekromatográfia a nagy molekulatömeg miatt nem igazán alkalmazható. Ugyan többen próbálkoztak cellulóz és szilikagél rétegen különféle fehérjepreparátumok és enzimek szétválasztására, a rétegekromatográfia mégis csak a lipoproteinek vizsgálatára használható a nemfehérje rész jó kromatografálhatósága miatt. Így például sikeresen megoldották a hiperlipidémiás betegek lipoproteinjeinek szétválasztását szilikagélen. Cellulózártégen hisztonfesték-komplexekeket és egyéb bázikus fehérjéket is szét sikerült választani.

5.8. Roncsolás nélküli fehérjemeghatározás

A *roncsolásmentes fehérjemeghatározási eljárások* közül leggyakrabban a közeli infravörös tartományban reflexión (NIR) és transzmisszió (NIT), ezen kívül N-aktiváción, illetve mágneses rezonancián (NMR) alapuló módszerekkel határozzák meg az élelmiszerek fehérjetartalmát.

Az *infravörös spektroszkópiát* kiterjedten használják élelmiszerek fehérjetartalmának meghatározására. A módszer pontossága talán még nem éri el a klasszikus és jól bevált módszereket, azonban a mintaelőkészítés és a mérés kivitelezésének egyszerűsége miatt az ilyen típusú módszerek további elterjedése várható a gyakorlatban. Az *infravörös spektroszkópia a molekulák rezgési és forgási állapotában bekövetkező változásokat méri*, hisz ezeket is a kvantumfeltételek határozzák meg,

ezért információt nyújtanak a szerkezetre. A rezgési energia változásait az infravörös fény elnyelése okozza, melynek hullámhossztartománya 2500–15 000 nm között van. A közeli infravörösben (NIR) működő készülékek az 1300–2400 nm, az infravörös (IR) transzmisszióban mérők pedig az 5700–9600 nm közötti tartományban működnek. Az infravörös spektroszkópia azonban praktikus okokból nem a hullámhosszal, hanem a hullámszámmal dolgozik, ami a centiméterben kifejezett hullámhossz reciproka. Ez az infravörös tartományra $600\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$.

A rezgési színekép a molekulán belüli atomok vagy atomcsoportok egymáshoz viszonyított rezgésének eredménye, melyek normál-, illetve csoportrezgések lehetnek. A *normálrezgés* lehet *vegyértékrezgés*, mely a két atom vegyértékkötése irányában történik, *deformációs rezgés*, mely a vegyértékszög változásaival jár, és *vázrezgés*, mely az egész vázra kiterjed. A *csoportrezgések* meghatározott funkciós csoportok rezgései, melyek alkalmasak lehetnek a mennyiségi meghatározásra. Az aminos és az iminocsoport, valamint a savamid-csoport (peptidkötés) infravörös elnyelési tartományai igen széles határt ölelnek fel ($1400\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$), melyek közül kiválasztható az a hullámszám, amely a legpontosabb információt adja a fehérje mennyiségi meghatározása során.

A NIR reflexiós módszert elsősorban gabonaátvételnél, illetve olajos magvak minősítéskor alkalmazzák. A *készüléket ismert fehérje-összetételű, aprított mintákkal kalibrálják*, és meghatározzák a fehérjére jellemző hullámhosszokon az optikai denzitás változása és a koncentráció közötti összefüggést. Ezen regressziós összefüggések lehetővé teszik ismeretlen minták fehérjetartalmának meghatározását akkor, ha a kalibrációt megfelelő anyagokkal végezték, és az ismeretlen minta fehérjetartalma a kalibrációs sor értékén belül esik. *Célszerű a kalibrációt minden élelmiszer-alapanyaggal külön-külön elvégezni*, és az ismeretlen minta analízisét a tulajdonságokban hozzá legközelebb eső kalibrációs összefüggésre vonatkoztatni. Korábban a NIR-technikát elsősorban gabonamagvak és különböző olajos magvak fehérjetartalmának meghatározására használták, ma azonban már bonyolultabb összetételű élelmiszereket, sőt a tejet is lehet minősíteni vele.

A *közeli infravörös tartományban transzmissziót* alkalmazó technikát (NIT) csak a közelmúltban fejlesztették ki, de máris több gyártó alkalmazza ezt az elvet a kifejlesztett készülékekben. A módszer *a mintán átmenő sugárzásból következtet a komponensek minőségére és a mennyiségére*, ami korábban nem tapasztalt pontosságot eredményezett. A monokromátor segítségével egy teljes spektrumot vesznek fel,

ami szintén növeli a pontosságot az egy-két hullámszámnál felvett adatokhoz képest. A módszer nem érzékeny a környezeti feltételekre, ezért szélsőséges körülmények között (pl. alacsony vagy magas hőmérséklet) is pontos eredményeket ad.

Amennyiben nemcsak mennyiségi analízist, hanem *szerkezetvizsgálatot is akarnak végezni*, akkor az infravörös spektrum felvételéhez a szilárd anyagot alkáli-halogenidekkel (NaCl, KBr) porrá őrölve pasztillákba préselik, folyadékok esetében pedig két nátrium-klorid ablak között vékony filmet képeznek. Az említett alkáli-halogenideknek nincs infravörös abszorpciója. Ezt követően felveszik az infravörös spektrumot a 400–4000 cm^{-1} hullámszám-tartományban, majd azonosítják a mérendő vegyületet a hullámszámokhoz rendelhető funkciós csoportok megállapításával. A funkciós csoportok számának és helyzetének spektrumból történő megállapítása után összeállítható az ismeretlen molekula szerkezeti képlete. Az infravörös spektroszkópia tehát használható ismeretlen szerves anyagok molekulaszervezetének megállapítására, illetve a funkciós csoportok alapján élelmiszerek összetételének meghatározására.

Az *N-aktivációs módszer* lényege, hogy a nitrogéntartalmú anyagokat gyors neutronokkal bombázzák, melynek következtében a neutronok energiájának hatására a kötésben lévő nitrogénatomok gerjesztődnek. Mivel az N-aktiválódási energia a nitrogénatomok mennyiségével arányos, így ennek mérése lehetővé teszi a nitrogéntartalmú anyagok mennyiségének meghatározását. A módszer elterjedését gátolja a speciális eszközök és berendezések magas ára, ezért csak ott üzemeltethető gazdaságosan, ahol nagyobb mintamennyiségekkel (1–2 kg) lehet dolgozni, és nagy mennyiségű mintát kell minősíteni.

A *mágneses rezonancia* (NMR) mérésen alapuló analizátorokat elsősorban a kis frekvenciájú (50–60 MHz) tartományban használják fehérjeanalízisre. A berendezés rendkívül gazdaságosan használható, és segítségével nemcsak a mennyiségi meghatározás végezhető el, hanem a kristályosodási tulajdonságokra, valamint a kötési módokra és energiákra is információt kaphatunk.

5.9. Élelmiszerek aminosav-tartalmának, valamint a fehérje aminosav-összetételének meghatározása

Az aminosavak ioncserés oszlopkromatográfiája lehetővé teszi, hogy egy fehérjeminta aminosav-összetételét vagy egy fiziológias oldatban jelenlévő szabad aminosavak mennyiségét igen nagy pontossággal meg tudjuk határozni. Alapvető kutatási eredményeket e területen Moore, Stein és Spackman munkacsoportja ért el, akik a Ruhemann által 1909-ben felfedezett, a *ninhidrin és az aminosavak közötti kvalitatív reakciót kvantitatív meghatározássá fejlesztették*, majd 1951-ben közölték az *aminosavak ioncserés oszlopkromatografálásának módszerét*. 1958-ban Moore, Stein és Spackman együtt publikálták az első *automatikus analizátor leírását és működési elvét*. E területen végzett munkásságukért, az elért eredményekért 1972-ben Nobel-díjat kaptak. A múlt század 60-as és 70-es éveiben az ioncserés oszlopkromatográfia elvén működő automatikus aminosav-analizátorok világszerte elterjedtek, a 80-as évektől pedig egyre jobban *tért hódítottak a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias módszerek*. Jelenleg még a legtöbb helyen ioncserés oszlopkromatográfiával (IEC) határozzák meg az aminosavakat, de a jövőben valószínűleg a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias (HPLC) módszerek – gyorsaságuknál és egyszerűségüknél fogva – ki fogják szorítani az egyéb módszereket. Jelenleg pontosság és reprodukálhatóság tekintetében az IEC még felülmúlja a HPLC-t.

5.9.1. A vizsgálati anyag előkészítése a meghatározás előtt

A vizsgálati anyagot a kromatografálásához elő kell készíteni. Az előkészítés függ attól, hogy egy tiszta fehérje, egy élelmiszer vagy egy premix aminosav-összetételét, esetleg egy fiziológias oldatban, szervkivonatban vagy fermentációs termékben lévő szabad aminosavak mennyiségét akarjuk-e meghatározni. Az aminosav-összetétel meghatározásakor a fehérjéket hidrolizálni, a fiziológias oldatokat, szervkivonatokat, tejet, vizeletet pedig deproteinizálni kell a szabad aminosavak meghatározása előtt.

A minta hidrolízise

A fehérjék és peptidek aminosav-összetételének megállapításához a polipeptidláncot alkotó aminosavakat kötéseikből az 5.6. ábra szerint fel kell szabadítani. A meghatározás során alkalmazott *hidrolízismódszereknek az alábbi követelményeknek kell megfelelni:*

- Legyen teljes a hidrolízis, tehát az összes aminosav váljon szabaddá még a legstabilabb peptidkötésekből is.
- A lehető legkisebb mértékben károsítsa az egyes aminosavakat. Amennyiben mégis bekövetkezik a károsodás, akkor az mind kvalitatíve, mind kvantitatíve konstans legyen, lehessen korrigálni vele az eredményeket, és azonos körülmények esetén azonos ismert termékek keletkezzenek, melyek koncentrációjából az eredeti aminosav-összetételre lehet következtetni.
- Az alkalmazott reagens ne hozzon létre mellékreakciókat, pl. új peptid- vagy egyéb kötéseket.

Hidrolízis előtt meg kell határozni a vizsgálati anyag szárazanyag- és nitrogéntartalmát, esetenként hamutartalmát is. Ezekre az adatokra a bemérés helyes megválasztása, a kísérőanyagok mennyiségének ismerete, azok mellékhatásainak kiküszöbölése, valamint az aminosav-meghatározásból adódó eredmény realitásának ellenőrzése szempontjából van szükség. Nagy mennyiségű vizet tartalmazó minták esetén – a bomlások megakadályozása miatt – a tárolást mélyhűtőben kell végezni. A fehérje hidrolízisekor a minta víztartalmát a hidrolizáló ágens koncentrációjának megállapításakor figyelembe kell venni. Nagy víztartalmú minták esetében célszerű a mintákat úgy megszáritani, hogy aminosav-összetételük a szárítás közben ne változzék. A szárítási módszerek közül legmegfelelőbb a liofilezés, melynek során a minta vízmentes része gyakorlatilag nem változik.

A fehérje teljes hidrolízisére leggyakrabban a *savas hidrolízismódszereket* alkalmazzák, a fehérje triptofántartalmának meghatározása során viszont rendszerint *lúggal hidrolizálják a fehérjét*. Enzimes hidrolízist az aminosav-meghatározáskor általában nem alkalmazunk, mivel az enzimek aminosav-tartalma a minta aminosav-összetételét megváltoztathatja. Ezek az enzimes eljárások a gyakorlatban nem terjedtek el, speciális analitikai eljárás esetén azonban lehetőség van alkalmazásukra.

állapotban sósavval 105 °C-on 22 órán át kezelve 40–60%-ban, szénhidrátok jelenlétében pedig teljesen elbomlik. A triptofán a sósavban oldott vagy a levegő oxigénjének hatására, valamint szénhidrátok, egyes aminosavak, piroszőlősav és nehézfémek katalizáló hatására huminná bomlik le. A triptofán az indolgyűrű felhasadásának következtében bomlik, a bomlási termékeket, azok összetételét, valamint a bomlás mechanizmusát és a triptofántartalom meghatározására kidolgozott módszereket a későbbiek során részletesen ismertetjük.

Az aszparagin- és a glutaminmolekuláról sósavas hidrolíziskor *lepszakad az amidgyök*, ennek során az aszparagin és glutamin aszparaginsavvá, glutaminsavvá és ammóniává alakul, melyek az ioncserélő oszlopról a mintában jelenlévő aszparaginsavval és glutaminsavval együtt eluálódnak. A hidrolízis elején felszabaduló ammónia az aszparagin és glutamin amidgyökéből származik, ennek mennyiségéből a fehérjében lévő aszparagin és glutamin mennyiségére lehet következtetni. A későbbiekben megjelenő ammónia az aminosavak bomlásából származik. A kromatográfálás során célszerű a hidrolízis alatt keletkezett ammónia mennyiségét is pontosan meghatározni, hisz ebből az aszparagin és a glutamin mennyiségére, a fehérje bomlására, igen magas ammóniatartalom esetén pedig a minta ammónia- vagy karbamidtartalmára tudunk következtetni, mely utóbbi szintén ammóniára bomlik a sósavas hidrolízis alatt.

Többen beszámoltak a két, alkoholos hidroxilcsoportot tartalmazó aminosav, *a treonin és a szerin hidrolízis közbeni elbomlásáról*, illetve átalakulásáról. A β -laktoglobulin aminosav-összetételének meghatározása során a szerin 11–14%-os, a treonin 5–7%-os bomlását tapasztalták a hidrolízis folyamán. A *papain* hidrolízisét tanulmányozva megállapították, hogy a treonin és a szerin bomlása az idővel lineáris, bár a lebomlási folyamatok metodikáját a különböző szerzők más és más módon ítélik meg. Szerin- és glutaminsav-veszteség a hidrolizátum sósavtalanítása közben is előfordulhat, amikor is a szerin hidroxilcsoportja és a két savas aminosav, az aszparaginsav és a glutaminsav karboxilcsoportja észterkötést létesítenek egymással.

A fehérjékben relatíve kis mennyiségben előforduló *három kéntartalmú aminosav*, a cisztin, a cisztein és a metionin, a sósavas hidrolízis során, különösen szénhidrátok jelenlétében *bomlanak, oxigén jelenlétében pedig különböző oxidációs származékok keletkeznek*. A ciszteinből a sósavas hidrolízis folyamán alanin és szerin, szénhidrátok jelenlétében glicin képződhet, oxigén jelenlétében pedig cisztein-szulfinsavvá,

majd cisztein-szulfonsavvá oxidálódik. A metionin nyomnyi oxigén jelenlétében metionin-szulfoxiddá, illetve metionin-szulfonná alakul, de elbomolhat homocisztinné, homociszteinné és glicinné is.

Az érzékeny aminosavak (triptofán, metionin, cisztein, cisztin, szerin, treonin) mellett a *tirozin*, a *glutaminsav*, az *aszparaginsav*, a *prolin* és az *arginin bomlásáról is beszámoltak*. Az előzőekkel szemben, az aminosav-meghatározások valin, izoleucin, esetleg leucin „vesztése” nem az elbomlásból vagy átalakulásból, hanem az elégtelen hidrolízisből adódik. Ugyanis bizonyos *valil és izoleucil kötések nagyon stabilisak*. A valin-valin kötések hidrolízise még 150 óra után sem teljes, és ugyancsak *rendkívül stabil az inzulinban előforduló izoleucin-valin kötés* is, amelyet csak 96 órás hidrolízissel sikerült teljes mértékben megbontani. Az irodalomban a fentiekben túl nagyon sok tanulmány jelent meg a hidrolízis közbeni bomlásra vonatkozóan, amelyek sokszor ellenmondó adatait vissza lehet vezetni az eltérő mintára, a különböző kísérleti feltételekre és körülményekre, és az alkalmazott módszerekre. Egy kísérletben az *ATP-transzfoszforiláz* aminosav-összetételének meghatározása során a fehérjét 110 °C-on, 20, 40, 70 és 140 órán keresztül hidrolizálták 6 mólos sósavval, majd az ioncserés oszlopkromatográfiás meghatározás eredményeiből az alábbi következtetéseket vonták le.

- A glutaminsav, a prolin és a fenil-alanin 20 órás hidrolízis során teljes mértékben felszabadulnak a peptidkötésből, és a 140 órás hidrolízis alatt sem szenvednek számottevő veszteséget.
- A valin és az izoleucin teljes hidrolíziséhez legalább 70 órára van szükség, további 70 órás hidrolízis alatt mennyiségük változatlan marad, tehát a valin és az izoleucin mennyisége nem változik a 140 órás hidrolízis során.
- A metionin, a lizin és az arginin teljes hidrolízisének optimális ideje 40–70 óra között van, bár a 20 órás hidrolízissel nyert értékek is a kísérleti hibák határain belül maradnak.
- Az ammónia gyors növekedése a hidrolízis idejének növelésével nagyobbbrészt a treonin és a szerin, kisebb részben más aminosavak elbomlásából adódik.
- Az aminosavak legnagyobb mennyiségét a valin, az izoleucin, a metionin, a lizin és az arginin kivételével a húsz órás hidrolízisekből kapták, a hidrolízis idejének növelésével mennyiségük folyamatosan csökkent.

- Végső megállapításuk az, hogy az aminosavaknak a mintában lévő tényleges mennyiségét a különböző ideig végzett hidrolízis értékeiből zéró időre való extrapolálással lehet meghatározni.

A hidrolízishez alkalmazott sósav mennyiségét mindig a minta összetétele határozza meg. A ribonukleáz aminosav-összetételének meghatározásakor 5 mg fehérjéhez 1 cm³ 6M HCl-at használtak, a hidrolízist 110 °C-on 22 és 70 óráig végezték. Többben a fehérje-sósav arányát a mintában lévő kísérőanyagok minőségétől és mennyiségétől függően 1:500–1:5000 között javasolják. A kísérőanyagok közül különös figyelmet kell szánni a szénhidrátoknak, ezek ugyanis az aminosavakkal *Maillard*-reakcióban humint, melanoidot és más egyéb termékeket képeznek. A sósavas hidrolízis közbeni *huminképződés*, valamint az azzal járó *aminosavbomlás a sósav arányának növelésével csökkenthető*. A szakirodalomban számos közlemény jelent meg a nagy mennyiségű kísérőanyag destruktív hatásának csökkentésére. Ez különösen akkor fontos, ha nem tiszta vagy tisztított fehérjék, hanem élelmiszerek aminosav-összetételét határozzuk meg. Ilyenkor az aránylag kis mennyiségben jelenlévő fehérje mellett nagy mennyiségű szénhidráttal, elsősorban keményítővel és cellulózzal kell számolni, amelyek a sósavas hidrolízis alatt glükózra bomolva elősegítik a *Maillard*-reakciót. A huminképződés kiküszöbölésére a 6 mólos sósavhoz fenolt, 1,4-bután-ditiolt, tioglikolsavat adtak, mellyel külön-külön csökkenteni tudták a huminképződést.

A tioglikolsavat, a merkapto-propionsavat, a merkapto-szukcinsavat és az oxálsavat ebben a sorrendben felváltva adagolva a 6 mólos sósavhoz, a huminképződést meg tudták akadályozni. Eredményes kísérleteket végeztek Na₂SO₃-tal, melyet 0,1%-ban alkalmazva, a huminképződést gátolni tudták. Ezekkel a módszerekkel nemcsak a huminképződést gátolták, hanem próbálkoztak ezeket a triptofán meghatározására is alkalmazni, több-kevesebb sikerrel. A kapott eredményeket a triptofánmeghatározás során ismertetjük.

A hidrolízis precíz, pontos kivitelezését Moore és Stein közölte először a szakirodalomban. A leírásukban szereplő módszer széles körben elterjedt, és szinte minden fehérjevizsgáló laboratóriumban alkalmazzák. E szerint a hidrolízishez 16×125 mm méretű, speciális kémcsövet használtak, melyet a használat előtt krómkénsavval kimostak, desztillált vízzel pedig többször kiöblítettek. A tisztítást egy HCl-val történő öblítéssel fejezték be, a visszamaradt sósavcseppeket pedig 100 °C-on végzett szárítással távolították el. A tiszta, száraz kémcsöveket zárt edényben tárolták, megakadályozva ezzel, hogy a laboratórium levegőjében lévő

ammónia a hidrolizáló cső falára ráakódják. A légszáraz vagy liofilezett fehérjéből 5 mg-ot mértek a Pyrex-kémcsőbe, majd 1 cm³ 6M sósavat adtak hozzá. A kémcső óvatos összerázását követően a kémcsövet a nyílástól 3 cm-rel fúvólánggal beszűkítették kb. 1 mm-es átmérőjűre, majd a kémcső nyílás alatti részét szárazjég–etanol hűtőelegybe merítették. Ha a minta megfagyott, a csöveket egy vákuumcsővel a vákuumpumpához csatlakoztatták, a rendszert 10 Pa nyomás alá evakuálták, a sósvan oldott levegő nyomainak eltávolítására. A mintát tartalmazó kémcsövet a hűtőkeverékből kivették, megvárták amíg a megfagyott oldat a szivattyú leállítását után lassan felenged. Amikor a viszkózus oldatban keletkezett buborékok felszálltak, a kémcsövet a hűtőfolyadékba azonnal visszahelyezték, és folytatták az evakuálást. A gáz eltávolítása közben a kémcsövet többször megrázták, hogy a gáz eltávolítását teljessé tegyék, majd az előző procedúrát még egyszer megismételve, az üvegcsövet leforrasztották. A hidrolízist 20 és 70 óráig 110±1 °C-on végezték. Mind az időtartamot, mind a hőmérsékletet precízen be kell tartani, mert mind az alacsonyabb, mind a magasabb hőmérséklet, mind a rövidebb, mind a hosszabb hidrolízisidő jelentős mértékben befolyásolhatja az aminosav-összetételt. A hidrolízis után a kémcsöveket szobahőmérsékletűre hűtötték, a cső falára tapadt folyadékcseppecskéket egy lassú forgású centrifugával eltávolították. Ha az aminosav-tartalmat azonnal nem határozták meg, a még leforrasztott csöveket 4 °C-on vagy mélyhűtőben tárolták. A -25 °C-on történő tárolás eredményesebb, mert ezen a hőmérsékleten a kémiai reakciók gyakorlatilag leállnak. A hidrolizátum feldolgozása során a kémcsövet a szűkület alatt üvegvágóval megkarcolták, a felső részt egy forró üvegbot hozzáérintésével lepattintották, az alsó részt pedig egy rövid vákuumcső segítségével 30°-os dőlésű rotációs desztillálóhoz csatlakoztatták. A sósvat víz-lég szivattyúval előidézett vákuumban, 40 °C-os vízfürdő segítségével mintegy 20 perc alatt eltávolították.

A Moore és Stein által kidolgozott optimálisnak nevezhető fehérjehidrolízis egyes laboratóriumokban esetenként nem valósítható meg, mert vagy nincs megfelelő üvegcső, vagy hiányzik a szárazjég, esetenként nem tudják a vákuumot 10 Pa alá csökkenteni. Ilyen esetekben a módszert módosítani kell, lehetőleg úgy, hogy a lehető legkisebb mértékben legyen kihatással az analízis eredményeire. Egyik megoldás lehet pl. az, hogy a hidrolíziscsövet a lezárás előtt nitrogénnel többször átöblítjük, az edénykében több ízben vákuumot állítunk elő, majd

ismételten nitrogénnel töltjük meg. A többszöri ismétlés után az edénykéket evakuált állapotban zárjuk le. Többen hangsúlyozzák az üvegben átdestillált sósav tisztaságának fontosságát, mert az oldatban lévő fémek a hidrolízis alatt több aminosav elbomlását katalizálják. Különösen a sósav vasszennyezetségeinek veszélyére hívják fel a figyelmet. Élelmiszerek aminosav-összetételének meghatározásakor, mivel ezek jelentős mértékben tartalmaznak kationokat, esetenként sokkal nagyobb koncentrációban, mint az analitikai tisztaságú sósavban visszamaradt fémszennyeződés, ezért ilyen minták analízisére a megbízható cégtől származó analitikai tisztaságú sósav desztillálás nélkül is felhasználható.

Jelentős hibaforrás lehet a sósavas hidrolízis utolsó lépése, a *sósav eltávolítása* is. A rotációs gyorsbepárló elterjedése előtt a hidrolizátumot P_2O_5 -ot és KOH-ot tartalmazó exszikkátorba helyezve, az exszikkátort $30\text{ }^\circ\text{C}$ -ra melegítve, annak evakuálásával távolították el a sósavat. Ez az eljárás hosszú időt vesz igénybe, melynek során a szerin és a treonin jelentős bomlást szenved, és a cisztin, a metionin, valamint a triptofán bomlása következtében új csúcsok jelenhetnek meg a kromatogramon. A sósav bepárlása során a glutaminsav karboxilcsoportja észterkötést létesíthet a szerinnel vagy a treoninnal, ezért a sósav gyors eltávolítása a hidrolizátumból, rotációs gyorsbepárlóval vagy liofilezéssel, alapvető fontosságú.

A sósavas hidrolízis technikai könnyítésére a hidrolízist n-butanolban oldott 6 mólos sósavban $145\pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ -on 4 óra hosszat végezve nem találtak jelentős eltéréseket a *Moore–Stein*-féle hidrolízishez képest. Élelmiszerek fehérjetartalmát 6 mólos sósavban 20 órán keresztül hidrolizálták, $137\text{ }^\circ\text{C}$ -on, melyet megelőzően a sósavon nitrogént buborékkoltattak. A nyitott üvegben történő hidrolízisek során, elsősorban a huminképződés megakadályozása céljából, nagyobb sósav mennyiségeket alkalmaztak. Az aminosav destrukció további csökkentésére a sósavas hidrolízis mellett különféle *szulfonsavas hidrolizáló ágenseket is alkalmaztak*. Így pl. használták a fehérje hidrolízisére a 3 mólos para-toluol-szulfonsavat, a 4 mólos metán-szulfonsavat és a 3 mólos merkapto-etán-szulfonsavat is. A szulfonsavas módszerek célja egyrészt az aminosav-destrukció visszaszorítása, másrészt a triptofántartalom meghatározása volt. Ezért ezeket a módszereket *A triptofántartalom meghatározása* című fejezetben ismertetjük részletesen.

A fehérjehidrolízis során fellépő oxidáció, különösen az oxidációra rendkívül érzékeny kéntartalmú aminosavak esetében okozhat jelentős hibát, hisz a cisztein és cisztin elsősorban cisztein-szulfinsavvá

és ciszteín-szulfonsavvá, a metionin pedig metionin-szulfoxiddá és metionin-szulfonná alakul, mely átalakulások csökkentik a kéntartalmú aminosavak kitermelését.

Az oxidációs hibák kiküszöbölésére *Hirs* dolgozott ki módszert, melynek lényege az, hogy a fehérje hidrolízise előtt a mintát perhangyasavval oxidálja, miközben a cisztin és ciszteín ciszteinsavvá, a metionin pedig metionin-szulfonná alakul.

A perhangyasav előállításánál során $4,5 \text{ cm}^3$ 80%-os hangyasavhoz $0,5 \text{ cm}^3$ 30%-os H_2O_2 -ot öntünk, intenzíven összekeverjük, majd az oldatot 3 percig $50 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tartjuk. A perhangyasavas oldatból 20 mg fehérjére $0,8 \text{ cm}^3$ -t adunk a mintához, majd 15 percig $50 \text{ }^\circ\text{C}$ -on melegítjük. A perhangyasavas oxidáció után a perhangyasav feleslegét liofilezéssel eltávolítjuk, ügyelve arra, hogy az nyomokban se maradjon vissza, mert a fehérjehidrolízis során az ampullák felrobbanhatnak. A perhangyasav eltávolítása után az oxidált fehérjét 6 mólos sósavval a szokásos módon hidrolizálják, majd a fehérjehidrolízis után a kéntartalmú aminosavak oxidált származékait ciszteinsav és metionin-szulfon formában határozzák meg. A perhangyasavas oxidáció közben a ciszteinen és a metioninon kívül a többi aminosav is különböző mértékben oxidálódik, tehát a kromatogramon ezek csúcsai nem értékelhetők.

Az előzőek alapján a *fehérjék sósavas hidrolízisére vonatkozó követelményeket* a következők szerint lehetne összefoglalni:

- A hidrolízishez bemérendő minta mennyiségét az szabja meg, hogy a vizsgálati anyagnak milyen kis mennyisége azonos összetételű még az egész anyaggal. Homogén fehérjékből mikroanalitikai mérlegen $1\text{--}5 \text{ mg}$ körüli mennyiséget mérünk be és $1\text{--}5 \text{ cm}^3$ 6M sósavat öntünk rá. Élelmiszerek esetében a minta fehérjetartalmától függően $20\text{--}200 \text{ mg}$ (magas zsírtartalmú mintáknál szükség szerint zsírtalanított) anyagot mérünk be, és a minta hidrolíziséhez $1000\text{--}5000$ -szeres mennyiségű 6M sósavat használunk.
- A hidrolízist 6M sósavval végezzük ($21,83$ vegyes%-os azeotrop oldat), amely lehetőség szerint ne tartalmazzon fémionokat.
- A hidrolízis előtt gondoskodni kell az oxigén teljes eltávolításáról, melyet a lefagyasztott folyadék feletti tér evakuálásával, vagy nitrogéngázzal történő átöblítéssel, vagy e kettő kombinációjával lehet elérni.
- A hidrolízis optimális hőmérséklete $110 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, amelynek ingadozása kerülendő, ugyanis alacsonyabb hőmérsékleten (105

°C) végzett hidrolíziseknél a peptidkötések felbomlása már nem kvantitatív, magasabb hőmérsékleten pedig az érzékenyebb aminosavak bomlásával lehet számolni.

- Amennyiben csak egy hidrolízis elvégzésére van lehetőségünk, akkor annak optimális ideje 110 °C-on 24 óra. Ha pontosabb vizsgálatokat szeretnénk végezni, akkor a hidrolízis alatti aminosavbomlások következtében adódó veszteségek korrekciójára a nulla órás hidrolízisidőre extrapolálunk a 20 és a 70 órás hidrolízisek eredményeiből.
- A hidrolízis edény anyagából aminosavakat károsító ionok – elsősorban vas – ne oldódjanak ki.
- Hidrolízis után a sósavat rotációs vákuumdesztillálóval vagy liofilezéssel távolítsuk el.
- A kéntartalmú aminosavakat az oxidációs veszteségek elkerülése érdekében oxidált formában, perhangyasavas oxidáció után határozzuk meg.
- A szulfonsavas hidrolízis módszerek nagyobb részét, valamint a lúgos hidrolízis módszereket a fehérje triptofántartalmának meghatározására dolgozták ki. E hidrolízisek során a triptofán melletti egyéb aminosavak károsodhatnak, ezért, különösen a lúgos hidrolízist követően, a triptofánon kívül más aminosavat nem határozunk meg.

Deproteinizálás

Fiziológiás oldatok, szövetnedvek, szervkivonatok, kóros vizelet, tej, emésztőnedvek szabadaminosav-tartalmának meghatározásakor az oldatot nemcsak az alakos elemektől, hanem az oldatban lévő *fehérjéktől és peptidektől is meg kell tisztítani*, mert ezek a kromatografálást nagymértékben zavarják. A fehérjék és peptidek a gyantát szennyezve egyrészt eltömik a gyantaoszlopot, melynek következtében megnő a gyantaoszlop ellenállása az áramló pufferekkel szemben, másrészt a gyanta funkciócsoportjain kötődve az aminosavak ioncseréjét gátolják. A különböző időben eluálódó ninhidrin-pozitív peptidek a kromatogramon kisebb csúcsokat adnak, amelyek a kromatogram értékelését zavarják. A különféle oldatok fehérjéktől és nagymolekulájú peptidektől való megtisztítását *kémiai anyagokkal való kicsapással, ioncserés kromatográfiával való tisztítással vagy ultraszűréssel* végezzük el. A kicsapással végzett

fehérjementesítéshez a szulfo-szalicilsavat, a wolframsavat, a pikrinsavat és a triklór-ecetsavat szokták alkalmazni. Három százalékos szulfo-szalicilsavval deproteinizált szérumból az aszparaginsav, a metionin-szulfon, a treonin és a szerin elválasztása romlik, nagyobb mennyiségű szulfo-szalicilsav alkalmazása pedig a kromatografálás során rosszabb feloldást eredményez. A szabad aminosavak meghatározásának pontossága lényegesen rosszabb, mint a fehérjehidrolízis után végzett analízisé, ugyanis ugyanabból a plazmából 3%-os szulfo-szalicilsavval végzett deproteinizálás után az aminosavak koncentrációjának variációs koefficiensei 1,5–22,2% között mozogtak.

1%-os pikrinsavas deproteinizálás során a triptofán teljes egészében tönkremegy, és maga az eljárás is eléggé körülményes. Pikrinsavval végezve a deproteinizálást, 5–48%-kal kisebb szabadaminosav-mennyiségeket kaptak, mint a szulfo-szalicilsavas deproteinizálás esetén. A triklór-ecetsavas deproteinizálásról megállapították, hogy a kicsapott fehérje mennyisége a reagens koncentrációjának növelésével nő. Jelentős aminosav-veszteség (1,5–50%) léphet fel a wolframsavas deproteinizálás során. A szabadaminosav-veszteség függ a fehérje relatív koncentrációjától, és a kicsapó anyagtól. Mind a négy módszernél számolni kell azzal, hogy a keletkező kolloidállapotú fehérjecsapadék nagy felületén az oldatban lévő poláros csoportokat is tartalmazó molekulákat, mint pl. amilyenek az aminosavak, megkötik, így a kémiai kicsapásnál mindenképpen jelentős mennyiségű szabadaminosav-veszteséggel kell számolni.

A vizsgálandó anyag *fehérjementesítését* hidrogén formában lévő *kationcserélő műgyanták segítségével* is elvégezhetjük. A szérumból végzett hét párhuzamos vizsgálat esetén az egyes aminosavakra a variációs koefficiensek 2,7–13,6% között alakultak.

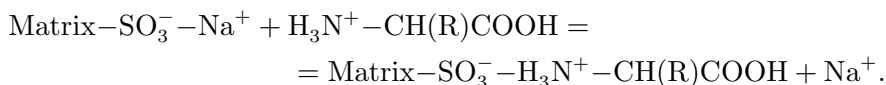
Az oldatok deproteinizálására a szabad aminosavak meghatározása során *a legalkalmasabb eljárás az ultraszűrés*. Előnye ennek az eljárásnak, hogy kontamináció következtében nincs aminosavveszteség, rövid ideig tart, nem kell tartani az aminosavak elbomlásától és az 1 cm³-nél kevesebb folyadék is ultraszűrhető. Az ultraszűrés egyszerűen kivitelezhető, a kromatografálást zavaró makromolekulák nagyságuknak megfelelő pórusú membránnal szűrhetők. Az utóbbi évtizedekben kitűnő minőségben és nagy választékban kaphatók olyan különféle pórusméretű membránok, amelyek a legkényesebb analitikai műveleteknek is eleget tesznek. Az ultraszűrés azért is rendkívül előnyös a szabad aminosavak meghatározása során, mert rendszerint csak nagyon kis térfogatú

anyag áll rendelkezésünkre, de a szabad aminosavak meghatározásához is csak kevés, rendszerint 1 cm^3 -nél kevesebb deproteinizált oldatra van szükség. Az ultraszűrést centrifugálással is kombinálhatjuk, amikor is centrifugacső-szűrőbetét segítségével mind a centrifugálás, mind az ultraszűrés előnyeit kihasználhatjuk. A centrifugálást maximum 2000 g-n végezve a tisztítandó oldatot az ultraszűrőn a centrifugális erő segítségével préseljük keresztül. A különféle ultraszűrő berendezések közül különös jelentőséggel bírnak azok a kis térfogatú készülékek, amelyek 20–100 μl fiziológiás oldatok deproteinizálására alkalmasak.

5.9.2. Az aminosavak meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával

Az aminosavak oszlopkromatográfiája

Az aminosavak ioncseréje nátrium- vagy lítiumformában lévő, divinil-benzollal 4–8%-ban térhálósított, szulfonát polisztirol műgyantán az alábbiak szerint megy végbe:



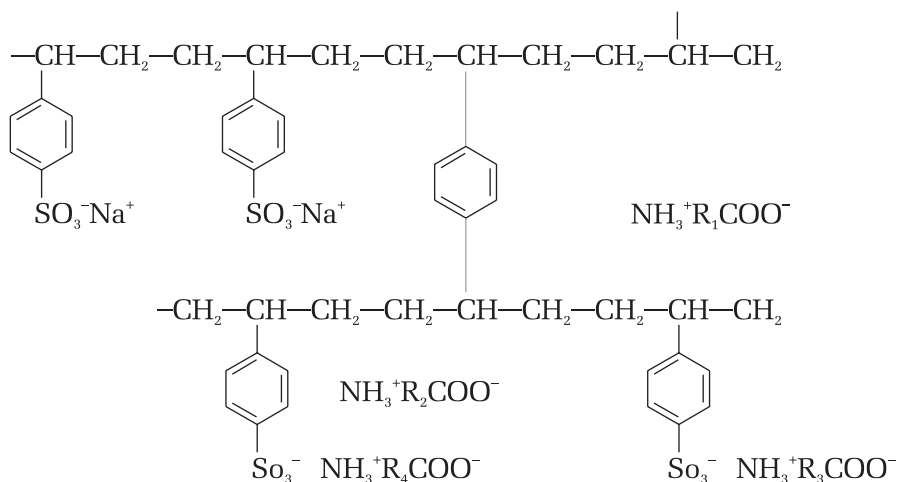
A reakcióegyenlet alapján az aminosavra felírható a megoszlási koefficiens:

$$a_{\text{aminosav}^+} = \frac{[\text{Matrix-SO}_3^- - \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH(R)COOH}]}{[\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH(R)COOH}]},$$

ahol:

$$\begin{aligned} [\text{Matrix-SO}_3^- - \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH(R)COOH}] &= \text{a gyantán megkötött} \\ &\quad \text{aminosav mennyisége,} \\ [\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH(R)COOH}] &= \text{a pufferben lévő aminosav} \\ &\quad \text{koncentrációja.} \end{aligned}$$

Az aminosavak különféle (*Coulomb*- és *Van der Waals*-féle) erőkkel kötődnek az ioncserélő műgyantához. Az ioncserélőn kötődött aminosav-molekulák szorpciója és deszorpciója folyamán különböző intenzitással jut érvényre az egyes aminosavak sajátos töltése, pK-ja, molekulatömege, oldalláncának összetétele (poláros vagy apoláros), és mindezeknek az adottságoknak az együttes következménye a deszorpció sorrendje. Az ioncsere az 5.7. ábra szerint megy végbe:



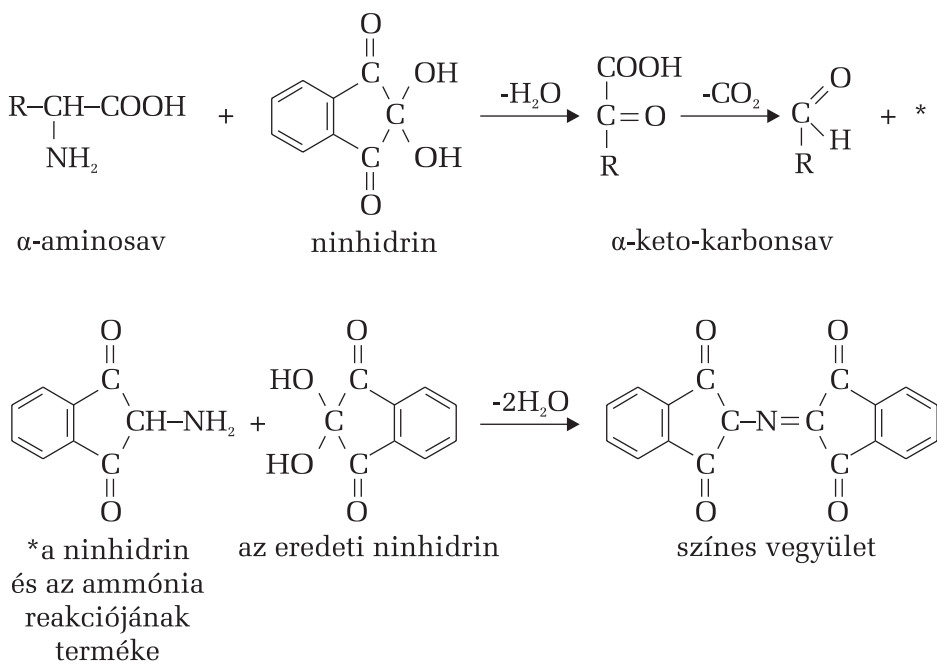
5.7. ábra. Az ioncsere mechanizmusa a műgyantán

Az aminosavak ioncserés kromatográfiai szétválasztása, illetve az elúció sorrendje a hőmérséklettel, az eluáló pufferek pH-jának, ionkoncentrációjának, esetleg szerves oldószer-tartalmának változtatásával befolyásolható. Az aminosavak mennyiségi meghatározását a ninhidrin-nel történt színreakció segítségével tudjuk elvégezni, melynek vázlatát, az aminosavakkal létrejött színes terméket, az 5.8. ábra tartalmazza.

Az aminosavak ioncserés kromatografálásához automatikus analízátorokat használunk, melyeknél az elúció, a ninhidrinreakció, a fotometrázás, a mért extinkció regisztrálása, a koncentráció kiszámítása automatizálva van.

A kromatografálás feltételei

Ugyan az aminosavak automatikus ioncserés oszlop-kromatográfiájának legkritikusabb lépése a meghatározandó anyag előkészítése, azaz a fehérje hidrolízise, a meghatározás pontossága függ a kromatografálás technikai feltételeitől. Az egyik legfontosabb tényező a pufferkészítéshez használt desztillált víz minősége. Mindenképpen törekedni kell igen jó minőségű, szerves és szervetlen anyagot nem tartalmazó, 0,05 μS vezetőképességű víz használatára, melyet desztillációval, ioncserével vagy ultraszűréssel, illetve ezek kombinációjával lehet előállítani. Ammóniatartalmú ivóvízből kiindulva úgy járunk el, hogy az egyszerű



5.8. ábra. Az aminosavak és a ninhidrin reakciója

desztillált vizet a második desztillálás előtt egy ioncserélő oszlopon engedjük át, majd az ionmentesített vizet másodszer is ledesztilláljuk. Egy aminosavanalitikai laboratórium elengedhetetlen kelléke egy igen pontos pH-mérő, hisz a pufferek pH-ja az elválasztást jelentős mértékben befolyásolja. Az aminosav-analizátor tartozéka még egy hűtőszekrény, amelyben a puffereket és az alkalmazott reagenseket 4–5 °C-on, a fehérje-hidrolizátumokat pedig –25 °C-on lehet tárolni. Szükség van ezen kívül még egy nagy pontosságú mikroanalitikai mérlegre, egy olajdiffúziós vákuumszivattyúra, egy liofilizáló készülékre és egy speciális szárítószekrényre, melynek hőmérsékletét ±1 °C-os ingadozással lehet beállítani. Mivel a pufferekbe nemcsak a desztillált vízzel kerülhet ammónia szennyezésként, hanem a levegőből is, ezért ügyelni kell arra, hogy a laboratóriumban az aminosav-analizátor mellett ne dolgozzanak ammóniával, és az ma már természetes, hogy dohányozni csak szigorúan az arra kijelölt helyen szabad. Az aminosavak oszlopkromatográfiás

meghatározása szigorú munkafegyelmet követel, mert csak a munkafegyelem és a metodikai előírások betartásával lehet a meghatározás hibáját a minimálisra csökkenteni.

Az ioncserélő oszlop készítése

Az aminosavak ioncserés oszlopkromatográfiáját 4–8%-ban divinilbenzollal térhálósított, szulfonált polisztirol műgyantán végezzük. A gyanta mátrixa a keresztkötésekkel térhálósított polisztirol, aktív csoportjai pedig a szulfonsavak, melyek lehetnek hidrogén-, nátrium- vagy lítium-formában. A kromatografálás minőségét befolyásolja a divinilbenzol koncentrációja, a gyanta szemcsemérete, illetve az oszlop mérete, melyről megállapítható, hogy minél kisebb az átmérő és minél hosszabb az oszlop, annál hatékonyabb a szétválasztás. A szferikus gyanták megjelenése lehetővé tette az oszlop hosszának rövidítését. Ma már az aminosavak kromatografálására olyan igen jó minőségű szulfonált polisztirol gyantákat hoznak forgalomba, melyek mérete rendkívül homogén (eltérés az átlagtól $\pm 10\%$). Ez azért fontos, mert a nagy méretkülönbségű gyantaszemcsékből álló oszlop felbontóképessége rossz, a treonin- és a szerincsuccok a kromatografálás során összerosódnak. Amennyiben nagy méretkülönbség van a gyantaszemcsék között, akkor a heterogén összetételű készítményt az oszlopba töltés előtt hidraulikus frakcionálással szeparálják. A gyantát általában már nátriumformában hozzák forgalomba, ha azonban nekünk kell a gyantát nátriumformába hozni, akkor Moore és Stein eljárása alapján az alábbiak szerint járunk el.

A nátriumformában felhasználásra kerülő gyantát hússzoros mennyiségű desztillált vízben szuszpendáljuk, és többször alaposan átkeverjük. 2–3 órai állás után a zavaros folyadékra a gyantáról leöntjük, majd ezt az eljárást mindaddig ismétljük, amíg a gyanta feletti folyadék tiszta nem lesz. A finomabb részekről így módon megtisztított gyantára négyszeres mennyiségű 4M HCl-at öntünk, majd többször jól felkeverjük. A sósavat Büchner-szűrőn eltávolítjuk a gyantából, a sósav maradékát desztillált vízzel kimossuk, majd a nedves gyantát négyszeres mennyiségű 2M NaOH-ban szuszpendálva, 2 órán át 60–90 °C-on melegítjük. Ezt követően a lúgot Büchner-szűrőn eltávolítjuk, maradékát pedig desztillált vízzel kimossuk. A nedves gyantát az első eluáló pufferral egyensúlyba hozzuk, majd kezdődhet a gyanta oszlopba történő betöltése.

Ugyanezt az eljárást alkalmazzuk akkor is, ha a gyanta elszennyeződött. Erőteljes szennyezéskor a gyantát az oszlopról kinyomjuk, 6M HNO_3 -val kimossuk, a nehézfémek eltávolítására EDTA-val kezeljük, majd az előzőek szerint nátriumformára hozzuk és visszatöltjük az oszlopba.

Pufferoldatok készítése

Moore és Stein a fehérje-hidrolizátumban lévő aminosavak szétválasztására nátrium-citrát-puffereket alkalmazott. A savanyú és semleges aminosavakat az általuk szerkesztett aminosav-analizátor 150 cm-es törmelékgyanta oszlopán 0,2M nátriumion-koncentrációjú, 3,25-ös és 4,25-ös pH-jú pufferekkel választották szét, a bázikus aminosavak elemzését pedig 15 cm-es oszlopon, 5,28-as pH-jú, 0,35M nátriumion-koncentrációjú pufferrel végezték. Fiziológiás oldatokból a bázikus aminosavakat 50 cm-es oszloppal, 0,38M nátriumion-koncentrációjú, 4,25-ös pH-jú citrát-pufferrel választották el. Szférikus gyanta használata esetén ugyanazokat a puffereket használhatjuk. A citrát-puffer nátriumion-koncentrációjának és pH-jának növelésével elérhető, hogy a savanyú és semleges aminosavak után a bázikus aminosavakat is egy 55 cm hosszú szférikus gyantaoszlopon eluálják. A különféle típusú feladatokhoz felhasználható *pufferek összetételét, a Kerese által készített összeállítás szerint, az 5.4. táblázat tartalmazza.*

- Az A, B és C oszlopban a kétoszlopos eljáráshoz a hagyományos *Moore és Stein*-féle pufferek találhatók.
- A D oszlop a *Moore és Stein* pufferének összetételét tünteti fel fiziológiás oldatok bázikus aminosavainak meghatározásához.
- Az E, F és G oszlop *Dévényi* puffereit foglalja magában az összes aminosav egyoszlopos eluálásához.
- A H oszlopban a fenil-alanin és a hisztidin gyors eluálásához,
- az I oszlopban a cisztin, a valin és a metionin gyors eluálásához,
- a K oszlopban pedig a lizin nagy sorozatban történő gyors meghatározásához szükséges pufferek összetétele található.

A ninhidrinoldat készítéséhez szükséges 3,7M nátrium-acetát puffer (pH=5,5) készítése során 2500 g kristályos nátrium-acetátot oldunk 3 dm³ desztillált vízben, hozzáadunk 445 cm³ ecetsavat, majd az oldatot desztillált vízzel 5 dm³-re egészítjük ki.

5.4. táblázat. Az aminosavak ioncserés oszlop-kromatográfiájához szükséges pufferoldatok összetétele

Puffer- oldatok	Oldó- puffer	A	B	C	D	E	F	G	H	I	K
pH	2,2 ± 0,3	3,25 ± 0,01	4,25 ± 0,02	5,28 ± 0,02	4,25 ± 0,02	3,28 ± 0,02	4,25 ± 0,01	6,00 ± 0,02	6,50 ± 0,02	3,15 ± 0,02	5,10 ± 0,02
Na ⁺ -koncent- ráció (M)	0,2	0,2	0,2	0,35	0,38	0,2	0,8	1,5	0,35	0,35	0,2
NaOH (97%) (g)	8,3	82,5	82,5	144,0	156,0	82,5	82,5	41,3	144,0	144,0	82,5
Citromsav, kristályos (g)	21,0	210,0	210,0	245,0	266,0	141,0	141,0	64,5	245,0	245,0	210,0
NaCl (g)							350,65	877,5			
HCl (38%) (cm ³)	16,0	106,5	47,0	68,0	152,0	123,2	83,6		8,8	882,0	
n-Kaprilsav (cm ³)	0,1	1,0	1,0	1,0	1,0				1,0	1,0	1,0
BRIJ-35, szilárd (g)	0,5	5,0	5,0	5,0	5,0	20,0	20,0	20,0	5,0	5,0	5,0
Tiodiglikol (cm ³)	20,0	50,0	50,0							50,0	
Etanol (cm ³)		250,0				600,0					
Végtérfogat (dm ³)	1,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

Néhány általános szabály a pufferek összetételéhez:

- Az n-kaprilsavval nagyon jó konzerválás érhető el. 0,1–1 cm³ kaprilsav 1–10 dm³ végtérfogatban az elválasztás hatékonyságát nem befolyásolja.
- Amennyiben a gyanta szemcsenagysága homogén, 2,5% etanol elegendő a treonin és a szerin izolálásához. 2,5%-nál nagyobb etil-alkohol-koncentráció a glicin és az alanin közötti elválasztást rontja, a cisztint közelíti az alaninhoz, sőt a cisztin az alaninnal együtt eluálódhat. Ezért ha pl. az oszlop szennyezettségének

következtében a csökkenő feloldóképesség miatt szükség van nagyobb etil-alkohol-koncentrációra, akkor célszerű az A-puffer pH-ját néhány századdal csökkenteni, ami egyrészt javítja a savas és a hidroxil-aminosavak elválasztását, a cisztint pedig a valin irányába tolja el.

- A pufferek pH-ját a puffer elkészítése után még egyszer ellenőrizni, és szükség szerint korrigálni kell, mert az oldatok nagy pufferkapacitása miatt csak huzamosabb idő alatt áll be a *Nernst*-egyensúly.
- A ninhidrinoldat készítéséhez felhasznált nátrium-acetát-puffer koncentrációját 3,7M-nál nagyobbra nem célszerű beállítani, mert a készülék kikapcsolása után a reaktorban (coil) kristályosodás indulhat meg, ami dugulást okozhat.
- Valamennyi pufferoldat készítéséhez csak analitikailag nagy tisztaságú, szakszerűen tárolt vegyszerek alkalmasak.

Spackman, *Stein* és *Moore* szerint a ninhidrinoldat készítésénél a következőket kell szem előtt tartani. Az oldószerül használt metil-celloszolv (etilénglikol-monometil-éter) levegőn kisebb-nagyobb mértékben peroxidálódik, ezért ha nem frissen beszerzett metil-celloszolvval dolgozunk, mindig meg kell győződni arról, hogy mennyi a metil-celloszolvunk peroxidtartalma.

A peroxidtartalom meghatározása során 3 cm³ metil-celloszolvhoz 3 cm³ 4%-os kálium-jodid-oldatot, 3 csepp 1M HCl-at és 1–2 cseppnyi keményítőoldatot adunk. A peroxid a KI-ot I₂-dá oxidálja, mely a keményítő hatására intenzív sötétkék színreakciót mutat. Gyenge színreakció esetén a metil-celloszolvot elegendő szilárd kálium-hidroxidról ledesztillálni, ha a metil-celloszolv erős jódreakciót ad, akkor kén-savas Fe(III)-szulfát-oldatról vákuumban desztilláljuk le. Ennek során 1000 cm³ metil-celloszolvhoz 20 cm³ 2M H₂SO₄-as 50 vegyes%-os Fe(II)-szulfát-oldatot adunk. A desztillálást 1,5 literes, kapilláris és hőmérővel ellátott, kombinált golyós-spirális hűtőhöz csatlakozó berendezésben végezzük. A metil-celloszolv előpárlatát előntjük, majd ezt követően a desztillálható metil-celloszolvot tartalmazó 1,5 dm³-es lombikot vízfürdővel melegítjük, a vákuumot pedig vízszugár-légszivattyúval hozzuk létre. A lombikba nyúló kapilláriscsövön keresztül nagy tisztaságú nitrogént buborékoltatunk a metil-celloszolvba. A metil-celloszolv a víznyomástól függően 65–70 °C-on kezd forrni. 100 cm³ előpárlat után a metil-celloszolvot folyamatosan desztilláljuk, melynek során mintegy 800 cm³ peroxidmentes metil-celloszolvot kapunk.

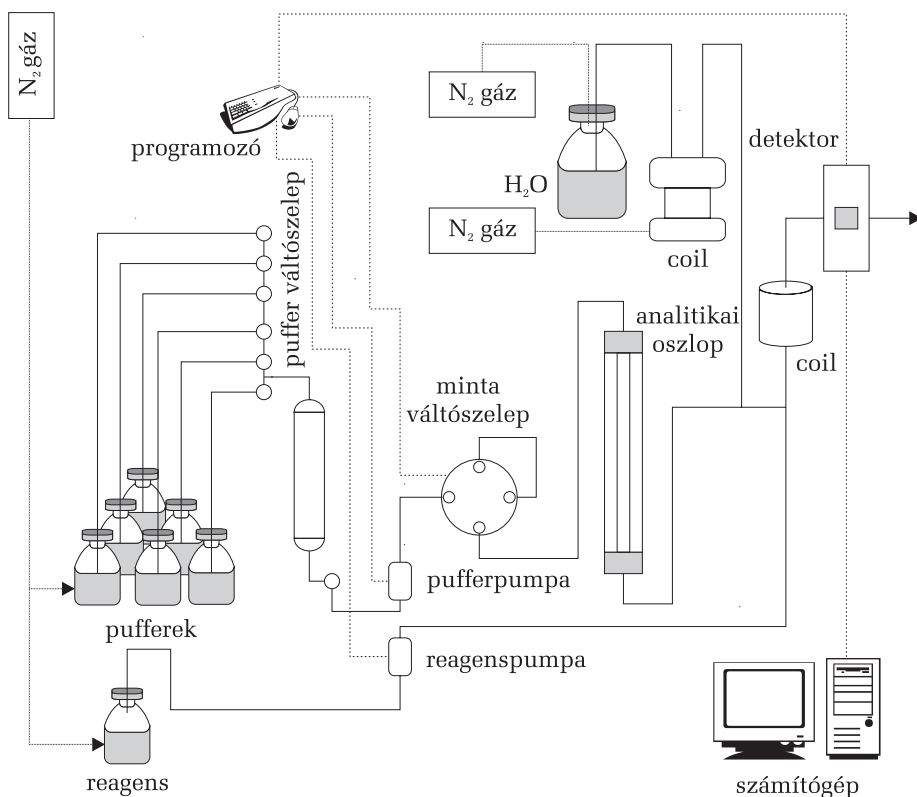
Az analitikai tisztaságú ninhidrin minőségi ellenőrzését metil-celloszolvval készült 1%-os oldata abszorpciójának mérésével végezzük spektrofotométerrel, 1 cm-es küvettában. A jó minőségű ninhidrin extinkciós értékei 430 nm-en 0,280, 460 nm-en 0,040, 570 nm-en pedig 0,006.

A ninhidrinoldat készítésekor 1500 cm³ peroxidmentes metil-celloszolvhoz 500 cm³ 3,7M, pH=5,5 nátrium-acetát-puffert adunk, majd az oldaton 20 percen keresztül nagy tisztaságú nitrogéngázt buborékoltatunk át. Ezt követően 40 g ninhidrint adunk hozzá, és nitrogén-átbuborékoltatás közben feloldjuk. A ninhidrin oldódása után 0,8 g SnCl₂ · 2H₂O-t adunk az oldathoz, melynek hatására a ninhidrinoldat halványsárga színe rumbarnává változik. Állás közben a ninhidrinoldatban esetleg képződött peroxid az ón-kloridot oxidálja, a ninhidrin helyett. A ninhidrinoldatot állandóan hűtve, nitrogénatmoszféra alatt tartjuk. A ninhidrinoldat öregedésével járó csökkent színeképzés elkerülésére számos módosító eljárást dolgoztak ki. A ninhidrinoldat készítéséhez használt metil-celloszolv idegméreg, ezért a nitrogén-átbuborékoltatást csak jól szellőző vegyifülkében szabad elvégezni. A ninhidrin oldószereként, a metil-celloszolv mellett, Moore a dimetil-szulfoxidot is használta, a gyakorlatban azonban ez az eljárás nem terjedt el.

Az aminosav-analizátor felépítése

A Spackman, Moore és Stein által publikált első automatikus aminosav-analizátor legfontosabb részei az ioncserélő gyantaoszlop, a puffereket és a ninhidrint szállító szivattyú és a kompenzográf. A különféle pufferek a pufferváltó szelepek segítségével, a pufferszivattyú hatására, a gyűjtőtömbbe kerülnek, majd a pufferpumpa a kromatografáló oszlopba nyomja azokat. A kromatografáló oszlopról távozó aminosavak oldata a keverőtömbben találkozik a ninhidrinszivattyú által, a ninhidrintartályból szállított ninhidrinoldattal. A ninhidrin és az aminosavak keveréke a forró vízbe merülő csőkígyóba kerül, ebben a reaktorban a ninhidrin és az aminosavak között végbemegy a színreakció, melynek intenzitását fotométer segítségével mérjük, és kromatogram formájában jelenítjük meg. A számszerű adatokat integrátorral vagy komputerrel kalkuláljuk. Az aminosav-analizátorokkal szemben támasztott főbb követelmények az alábbiak:

- A pumpák legyenek alkalmasak $100 \text{ cm}^3/\text{óra}$ pufferátfolyás biztosítására, a puffer és a ninhidrintovábbítás pedig folyamatos, lehetőleg pulzálásmentes legyen.
- Az automatikus aminosav-analizátor egyszerű, jól áttekinthető szerelésű legyen.
- A meghibásodott alkatrészeit könnyen lehessen kiszerezni.
- A meghatározáshoz szükséges pufferváltások programozhatók legyenek.
- A kromatográfálás hibája ne legyen nagyobb $\pm 3\%$ -nál.



5.9. ábra. Az aminosav-analizátor sematikus rajza

A különféle cégek által gyártott analizátorok automatizáltsága és programlehetősége különböző, ez azonban nem csökkenti a meghatározás pontosságát. Az aminosavak ioncserés kromatográfiája terén jártos szakember egy jó puffer- és ninhidrinszivattyú, ioncserélő gyanta,

kompenzográf, integrátor vagy komputer és egy jó szoftver birtokában már maga is elő tud állítani egy rutinfeladatokat ellátó automatikus aminosav-analizátort. A kereskedelemben kapható nagyszámú különböző típusú analizátorról azért nehéz áttekintést adni, mert a nagyobb műszergyártó cégek különböző műszerezettségű készülékeket hoznak forgalomba. Egy aminosav-analizátor elvi felépítését az 5.9. ábra mutatja.

Kromatografálás

Az elválasztandó aminosavakat olyan koncentrációban kell az ioncserélő oszlopra felvinni, hogy azokat az analizátor detektora lehetőség szerint az optimális mérési határokon belül mérje mind a hidrolizátumok, mind a szabad aminosavakat tartalmazó oldatok kromatografálása esetén. Az ioncserélő oszlopra adagolt *minta optimális pH-ja az aminosavak kötődése miatt pontosan 2,2*. A savtalanított, kiszáritott hidrolizátum oldására Moore és Stein az alábbiakat javasolja: 5 mg fehérjehidrolizátumot 0,5 cm³ vízben oldunk, majd az oldathoz 0,5 cm³ 0,2M Na-ionkoncentrációjú 6,5-es pH-jú nátrium-foszfát-puffert adunk. A közel semleges oldatban a levegőből ammónia gyakorlatilag nem oldódik be, az aminosavak bomlása következtében sem szaporodik fel ammónia, és négy órai állás alatt a kéntartalmú aminosavak sem oxidálódnak. A felhasználás előtt közvetlenül 0,06 cm³ 1M HCl hozzáadásával az oldat pH-ját 2-re csökkentjük, majd 5 cm³-es mérőlombikban 0,2M Na-ionkoncentrációjú, 2,2-es pH-jú citrátpufferrel 5 cm³-re töltjük.

A deproteinizált fiziológiai oldatok szabadaminosav-tartalmának meghatározásakor sósavval vagy 2,2 pH-jú 0,2M Na-ionkoncentrációjú citrátpufferrel viszik a szétválasztani kívánt komponenseket az ioncserélő oszlopra. Az oldott hidrolizátum gyakran zavaros, csapadékos, az ilyen hidrolizátumot nem lehet az ioncserélő oszlopra felvinni. A *hidrolizátumot* még hígítás előtt *célszerű szűrni*, és a hígított, *víziszta oldatot lehet csak az oszlopra betáplálni*. A megfelelő koncentrációra beállított *hidrolizátumot legcélszerűbb -25 °C alatti hőmérsékleten tárolni*, hisz a 4 °C-on tárolt hidrolizátumokban már 24 órás tárolás után lizinvesztés mérhető. Ez a tény erősen korlátozza a több napi kromatografáláshoz szükséges mintákat tartalmazó, drága mintaadagolók alkalmazását is. *Az automatikus mintaadagolás a standardizálás szempontjából viszont nagy jelentőségű*, hisz a hidrolizátum oszlopra adagolásának precizitása kihat a meghatározás végeredményére. Az oszlopra felvitt hidrolizátumot a korábbi készülékeknél nitrogénnel nyomták

az oszlopra, majd kétszer $1-1 \text{ cm}^3$ 2,2 pH-jú citrátpufferrel utánamos-ták. Az ioncserélő oszlop feletti teret az első eluáló pufferrel feltöltötték, majd a felső zárófejet a kromatografáló oszlopba illesztve megindították a kromatografálást. A mai modern készülékeknél a 2,2 pH-jú vizsgálati anyagokat speciális mintaváltó szelepek segítségével, kézzel vagy automatikusan vihetjük fel az ioncserélő oszlopra. Különböző térfogatú minták felvitelére kalibrált hurkok, illetve spirálok állnak rendelkezés-re, amelyekből a vizsgálati anyagot az első eluáló pufferrel nyomjuk az ioncserélő oszlopra.

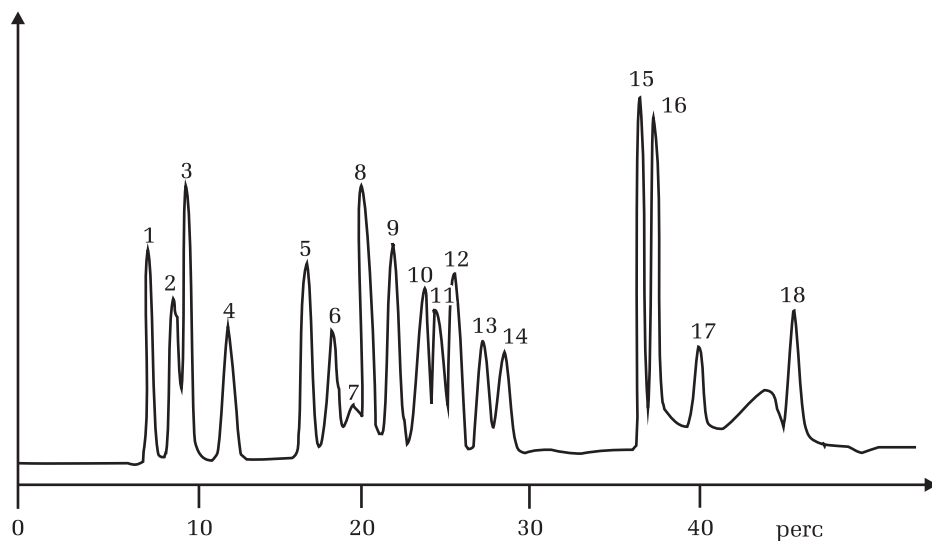
Az aminosavak kromatografálásának két módszere ismert:

- a kétoszlopos eljárás,
- és az egy oszlopon végzett teljes kromatografálás.

A múlt század 50-es éveinek végén, 60-as éveiben, illetve a 70-es évek elején használták a kétoszlopos módszert, de a 60-as évek végétől egyre inkább áttértek az egyoszlopos eljárásra. A hagyománytisztelet miatt röviden ismertetjük a kétoszlopos eljárás technikáját is.

A kétoszlopos eljárás volt az aminosav-analízis alapmódszere. Az eluátum hőmérsékletének, a pufferáramlás sebességének, az eluáló pufferek ionkoncentrációjának és pH-jának megfelelő változtatásával igen nagy felbontóképességet lehetett elérni az összes fehérjealkotó aminosav esetében. Az egyoszlopos eljárásnak rendkívüli előnye a kétoszlopos eljárással szemben, hogy nem kell két külön bemérést alkalmazni a rövid és a hosszú oszlopra, hanem mivel csak egyszer kell a mintát az oszlopra felvinni, a betáplálásból származó hiba minimálisra csökkenthető. Az egyoszlopos eljárásnál a kísérleti feltételek teljesen azonosak (bemérés, oszlop minősége, eluálás folyamatossága), és a kromatografálással járó munkák is nagymértékben leegyszerűsödnek. Mindkét eljárásnál olyan törvényszerűségek működnek, amelyek lehetővé teszik a két módszer együttes tárgyalását.

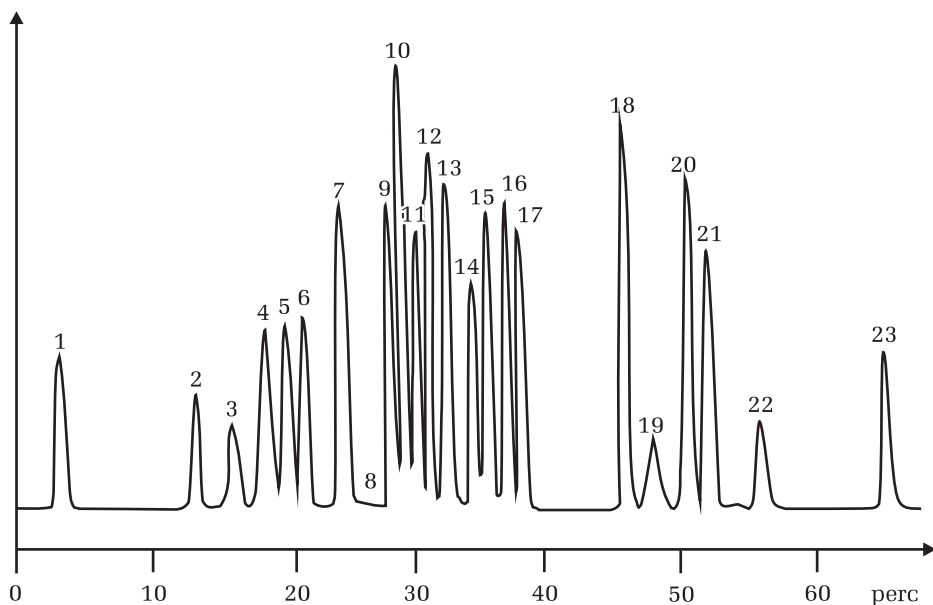
Az elválasztás élessége nagymértékben függ az első eluáló puffer pontosságától. 3,25-ös pH-nál a cisztin pontosan az alanin és a valin között középpont található a kromatogramon, nagyobb pH-jú pufferrel a cisztin előbb, az alaninhoz közelebb, kisebb pH-jú pufferrel később, a valin csúcshoz közel eluálódik. A cisztin kromatogramon elfoglalt helyéből a puffer pH-jára lehet következtetni. Az 5.10. ábra a fehérjealkotó aminosavak kromatogramját, az 5.11. ábra pedig a fehérjealkotó aminosavak perhangyasavas oxidáció utáni kromatogramját mutatja. A két kromatogram jobb összehasonlítása miatt az utóbbi ábra a kéntartalmú aminosavak oxidált és nem oxidált formáit is tartalmazza.



5.10. ábra. A fehérjealkotó aminosavak kromatogramja. A számokhoz tartozó aminosavak a következők: 1. aszparaginsav, 2. treonin, 3. szerin, 4. glutaminsav, 5. glicin, 6. alanin, 7. cisztin, 8. valin, 9. metionin, 10. izoleucin, 11. leucin, 12. norleucin belső standard, 13. tirozin, 14. fenil-alanin, 15. hisztidin, 16. lizin, 17. ammónia, 18. arginin

Az eluálás hőmérsékletének emelésével a kromatografáláshoz szükséges idő csökken, a hőmérséklet növelése azonban néha rontja a selektivitást. Az eluálópuffer átfolyási sebességének növelésével ugyancsak gyorsítani lehet az analízist. A pufferek átfolyási sebességét 60 cm³/óráról 120 cm³/óra-ra megnövelve az analízis idejét jelentős mértékben csökkenteni lehet, azonban az idő csökkentése növeli az analízis hibáját. Amennyiben növeljük az eluálópuffer átfolyási sebességét, akkor ezzel arányosan csökkentjük a reaktorban, illetve a stabil hosszúságú coilban a folyadék átfolyási idejét. Amennyiben a puffer átfolyási sebességét 65 cm³/óráról 80 cm³/óra-ra növeljük, akkor a ninhidrinoldat adagolását 32,5 cm³-ről 40 cm³/óra-ra kell növelni, melynek következtében a teflon coilban a folyadék átfolyási ideje 15 percről 12,2 percre csökken. A ninhidrinreakció tökéletes lefolyásához szükséges optimális idő ilyen mérvű csökkentése kihat az analízis eredményére.

Az egyoszlopos eljárásban az 55 cm-es oszlopon a savanyú és semleges aminosavak után nagyobb Na-ion-koncentrációjú és nagyobb pH-jú



5.11. ábra. A fehérjealkotó aminosavak kromatogramja perhangyasavas oxidáció után. A számokhoz tartozó aminosavak a következők: 1. ciszteinsav, 2. metionin-szulfoxid, 3. metionin-szulfon, 4. aszparaginsav, 5. treonin, 6. szerin, 7. glutaminsav, 8. prolin, 9. glicin, 10. alanin, 11. cisztin, 12. valin, 13. metionin, 14. izoleucin, 15. leucin, 16. tirozin, 17. fenil-alanin, 18. hisztidin, 19. triptofán, 20. ornitin, 21. lizin, 22. ammónia, 23. arginin

pufferrel kromatografáljuk a bázikus aminosavakat. A különböző eljárások során a nátriumion-koncentráció 0,35–1,2 mol/dm³ között, a pH pedig 5,28 és 6,45 között változhat.

A kromatogramok értékelése

Az ioncserélő oszlopról származó aminosavtartalmú oldat a ninhidrinnel a reaktor teflon csőspiráljában reagál, majd a színes oldat a fotométer átfolyó küvettáján halad át, a fotométer által érzékelt fényabszorpciót pedig a kompenzográf regisztrálja, melynek eredménye a kromatogram. Az elkészült kromatogram csúcsainak nagysága, illetve a csúcs alatti terület arányos az illető aminosav koncentrációjával, belőlük tehát az aminosavak mennyisége kiszámítható. Az aminosavak mennyiségének értékelése során megállapítjuk az egyes csúcsok

tényleges magasságát, kiszámítjuk a félmagassághoz tartozó csúcs szélességét, majd számítjuk a csúcs alatti területet a csúcs magasságának és a csúcs félmagasságánál mért szélesség összeszorozásával. Ezt követően az egyes csúcsok értékeinek megfelelő mennyiségeket a standard kromatogram megfelelő csúcsainak értékeihez viszonyítva kiszámoljuk az aminosav-mennyiségeket, általában mikromólban kifejezve, végül az aminosavakat az eredeti bemérésre vonatkoztatva, az eredeti minta aminosav-összetételét tömegszázalékban adjuk meg. Ha szükséges, az adatokat átszámoljuk fehérjére, illetve nitrogénre is megadjuk a vizsgált fehérje összetételét. Az adatokat

$$\frac{\text{g aminosav}}{100 \text{ g minta}} \quad \text{vagy} \quad \frac{\text{g aminosav}}{16,0 \text{ g nitrogén}}$$

egységben adjuk meg.

Korábban, megbízható aminosav-standardok hiányában, *a különböző aminosavakra színkonstansokat számoltunk*, majd a tényleges mennyiségek kiszámítására az ismert mennyiségben adagolt belső standard csúcsának értékét használtuk. A ninhidrinoldat öregedésének, valamint a kromatografálás egyéb technikai feltételeinek (puffer-, ninhidrinoldat adagolása, a fotométer lámpáinak öregedése, a kompenzográf működése) ellenőrzése céljából is célszerű a vizsgálati anyaggal együtt *belső standardot* adagolni az oszlopra, valamint időként teljes standard aminosavoldatot kromatografálni. Belső standard céljára az irodalomban számos javaslatot találni, melyek közül a norleucin bizonyult legalkalmasabbnak, mert csúcsa a kromatogramon a nagyon stabilis leucin után jelenik meg, és jelenléte a többi aminosav elválasztását nem zavarja.

A belső standard alkalmazása azért rendkívül előnyös, mert az aminosav-analitikában a színreakciót legáltalánosabban a ninhidrinreagenssel hozzák létre, a ninhidrin pedig érzékeny a fényre, a levegő oxigéntartalmára és a felhasznált vegyszerek tisztaságára. Az aminosavakkal létrehozott szín intenzitása az előző okok miatt csökken a ninhidrinoldat készítése óta eltelt idő függvényében. Ha nagyon pontosan akarjuk egy minta aminosav-összetételét meghatározni, akkor célszerű standardoldatot analizálni a minta előtt és a minta után, és a két standardból mintánk tényleges aminosav-összetételét pontosan kiszámíthatjuk. A gyakori kalibrációs standard futtatástól el lehet tekinteni belső standard alkalmazásával, mely mint az összes aminosav vonatkoztatási alapja, a ninhidrinnel létrejött színreakció-változásokat követi, mivel az ismert koncentrációjú belső standard analízise együtt történik

a többi aminosavval. A norleucin belső standardot azoknál az aminosav-analizátoroknál, illetve pufferrendszereknél, ahol az izoleucin-, leucin-, norleucin-elválás nem tökéletes, nem lehet alkalmazni, mert a norleucin az izoleucin után rosszul értékelhető ikercsúcsként jelenik meg a kromatogramon.

Ezen elválasztási nehézségek miatt *Csapó* és mtsai a *ciszteinsav belső standardként* történő alkalmazására tettek kísérletet. A ciszteinsav rendelkezik mindazon tulajdonságokkal, melyek jellemzői egy belső standardnak:

- A természetben nem fordul elő, műtermék.
- A ninhidrinnel 570 nm-en intenzív színreakciót ad.
- Elválása a többi aminosavétól jó, a többi aminosav elválását nem zavarja.
- Mint a cisztein végső oxidációs terméke, igen stabil vegyület.

A készüléket 10 standard aminosav-keverék futtatásával kalibrálták be ciszteinsavra, és minden aminosavra meghatározták a *ciszteinsav ekvivalens arányossági konstansokat* (CEAK), a standardoldat koncentrációjából, a bemérésből, a molekulatömegekből és a kapott csúcs alatti területekből a következő képlet segítségével:

$$CEAK = \frac{T_{\text{Cys-SO}_3\text{H}} \cdot MT_{\text{Cys-SO}_3\text{H}} \cdot \text{mg}_{\text{AS}}}{T_{\text{AS}} \cdot MT_{\text{AS}} \cdot \text{mg}_{\text{Cys-SO}_3\text{H}}}$$

ahol:

- $T_{\text{Cys-SO}_3\text{H}}$ = a ciszteinsav csúcs alatti területe,
- $MT_{\text{Cys-SO}_3\text{H}}$ = a ciszteinsav molekulatömege,
- T_{AS} = a kérdéses aminosav csúcs alatti területe,
- MT_{AS} = az aminosav molekulatömege.

A képletből mg_{AS} -ra történő átrendezés után számítható az ismeretlen aminosav mennyisége. A tíz kromatogram értékelése után számolt CEAK-ok szórása adja meg azt a hibát, mellyel az egyes aminosavakat meg lehet határozni. A hagyományos és a ciszteinsavas belső standardra történő vonatkoztatással kapott eredményeket összehasonlítva, a következőket állapították meg: a hagyományos értékelésnél az egyes aminosavak mennyisége csökken, míg a ciszteinsavas belső standarddal értékelve gyakorlatilag változatlan marad a ninhidrinkészítés után eltelt idő függvényében. Az előzőeket összefoglalva megállapítható, hogy belső standard alkalmazásával a ninhidrin bomlásából, a fotométerlámpa megváltozott fényerősségéből, a fotocella minőségéből és az erősítőrendszer állapotából adódó hibákat, mivel a változások a belső standardra

ugyanúgy hatnak, mint a meghatározni kívánt aminosavakra, ki lehet küszöbölni.

Speciális kromatográfiai technikák

Fiziológiás oldatok szabadaminosav-tartalmának meghatározása. Fehérjehidrolizátumok kromatografálása már évtizedek óta a rutineljárá-
sok közé tartozik, ezzel szemben a fiziológiás oldatok, szövetkivonatok,
vér, vizelet, tej kromatografálása szabad aminosav és egyéb ninhidrin-
pozitív vegyületek meghatározására *az előkészítő műveletek bonyolult-
sága miatt még ma is nehéz feladatot* jelent az analitikusok számára.
A leggyakoribb probléma a zavaró anyagok eltávolítása, melyek a legtöbb
esetben kisebb-nagyobb molekulatömegű fehérjék; élelmiszerek analízi-
sekor pedig esetenként nagy koncentrációban jelenlévő ásványi anyagok.
A fehérjétől különböző fehérjekicsapó szerekkel lehet megszabadul-
nunk, az ásványi anyagokat pedig csapadék formájában, dialízissel vagy
ultraszűréssel lehet a mintából eltávolítani. Mind a fehérjék, mind az ás-
ványi anyagok csapadék formában történő eltávolításakor potenciális
veszélyforrás az, hogy a szabad aminosavak egy része adszorbeálódhat
a csapadék felületén, mely a meghatározás pontosságát ronthatja.

A fehérjealkotó aminosavak mellett jelenlévő egyéb ninhidrin-
pozitív csúcsok a beazonosítást nehezzé teszik, és speciális problémát
jelent a savas és a hidroxil-aminosavak mellett az aszparagin és a gluta-
min szelektív elválasztása. A szelektív elválasztást általában elősegíti:

- ha az eluálást alacsonyabb hőmérséklettől indítjuk,
- ha a savas aminosavakat eluáló puffer pH-ját csökkentjük,
- ha a puffer átfolyási sebességét csökkentjük,
- ha a bázikus aminosavak kromatografálásához kisebb pH-jú puf-
fert és hosszabb gyantaoszlopot alkalmazunk, és
- ha Na-pufferek helyett Li-puffereket használunk.

*A Li-pufferes eljárások alkalmazásával rendkívül jó elválasztást le-
het elérni.* A Na-pufferekről Li-pufferekre történő átállást az alábbiak
szerint kell végrehajtani: A Na-formában lévő gyantát 6M salétromsav-
val mossuk, 0,3M Li-hidroxiddal Li-formába hozzuk, majd elvégezzük
az ekvibrálást az első Li-pufferrel. A minta oldására és oszlopra vitelé-
re célszerű pH=2,2, 0,3M Li-citrát-puffert használni, az eluálás pH=2,80,
0,3M Li-citrát-pufferrel kezdődik 39 °C-on, majd 70 perc múlva pH=4,10,
1,2M Li-citrát-pufferrel folytatódik 60 °C-on. Ezzel a pufferrendszerrel
az eluálás mintegy 450 percig tart, de ennek eredményeként mintegy

100 ninhidrin-pozitív vegyületet lehet azonosítani, illetve meghatározni. Az 5.5. táblázat a növényi extraktumból, a plazmából, a vizeletből és egyéb fiziológiás anyagokból *nagyobb koncentrációban* kimutatható, az 5.6. táblázat pedig az *igen kis koncentrációban* előforduló aminosavakat, azok származékait és egyéb ninhidrin-pozitív vegyületeket mutatja az ioncserélő oszlopról történő elúció sorrendjében.

5.5. táblázat. *A növényi extraktumból, a plazmából, a vizeletből és egyéb fiziológiás anyagokból kimutatható, nagyobb koncentrációban előforduló aminosavak, azok származékai és egyéb ninhidrin-pozitív vegyületek*

1. Ciszteinsav	20. Metionin
2. Taurin	21. Isoleucin
3. Karbamid	22. Leucin
4. Hidroxi-prolin	23. Fenil-alanin
5. Aszparaginsav	24. β -amino-vajsav
6. Treonin	25. Etanol-amin
7. Szerin	26. γ -amino-vajsav
8. Glutamin	27. Ammónia
9. Szarkozin	28. Hidroxi-lizin
10. Glutaminsav	29. Allo-hidroxi-lizin
11. Prolin	30. Ornitin
12. Citrullin	31. Lizin
13. Glicin	32. 1-metil-hisztidin
14. Alanin	33. Anszerin
15. α -amino-izovajsav	34. Hisztidin
16. Glükózamin	35. 3-metil-hisztidin
17. Valin	36. Karnozin
18. Homocitrullin	37. Triptofán
19. Cisztin	38. Arginin

5.6. táblázat. *A növényi extraktumból, a plazmából, a vizeletből és egyéb fiziológiás anyagokból kimutatható ritka aminosavak, azok származékai és egyéb ninhidrin-pozitív vegyületek*

1. Penicillaminsav	5. Homociszteinsav
2. O-foszfo-4-hidroxi-prolin	6. Cisztein-szulfinsav
3. O-foszfo-szerin	7. Gliceril-foszforil-amino- etanol
4. O-foszfo-treonin	

8. Glükózamin-6-foszfát
9. O-foszfo-etanol-amin
10. Levulinsav
11. Treo- β -hidroxi-aszparaginsav
12. Eritro- β -hidroxi-aszparaginsav
13. 3-hidroxi-prolin
14. Glükózaminsav
15. O-foszfo-hidroxi-lizin
16. Metionin-szulfoxid
17. Etionin-szulfoxid
18. Metionin-szulfon
19. β -metil-aszparaginsav
20. Allo-3-hidroxi-prolin
21. Allo-4-hidroxi-prolin
22. Tioprolin
23. 2-tio-hisztidin
24. Allo-treonin
25. Etionin-szulfon
26. Aszparagin
27. 2-amino-3-ureido-propionsav
28. α -metil-szerin
29. Muraminsav
30. Homoszerin
31. Glutation- δ -metilészter
32. Glutation- δ -etilészter
33. α -metil-glutaminsav
34. Izolvaltín
35. S-metil-cisztein
36. Fenilin
37. Fenilinsav
38. Penicillin-amin
39. β -2-tienil-szerin
40. 2-amino-adipinsav
41. Alanil-aszparagin
42. Mezo-lantionin
43. Form-imino-glicin
44. Glicil-aszparagin
45. S-etil-cisztein
46. Glutation
47. Mezo-lantionin
48. Glicil-szerin
49. Izoszerin
50. Allil-glicin
51. α -amino-n-vajsav
52. Treo- β -fenil-szerin
53. Glutamil-glutaminsav
54. Izovalin
55. Mannózamin
56. Galaktózamin
57. Pipekolinsav
58. Glicil-glicil-glicil-glicin
59. Mezo-cisztin
60. Glutaminsav-hidrazid
61. α -amino-pimelinsav
62. Glicil-szarkozin
63. Alanil-glicil-glicerín
64. Alanil-alanin
65. 3,5-dinitro-tirozin
66. α -metil-metionin
67. Fenil-glicin
68. Alanil-anhidrid
69. Djenkolinsav
70. α -amino-n-valeriánsav
71. Norvalin
72. Glicil-glicin
73. Cisztation
74. α -fenil- α -alanin
75. Allo-izoleucin
76. Glicil-glicil-glicin
77. Glicil-alanin
78. Metionin-szulfoximin
79. α, ϵ -diamino-pimelinsav
80. 2-metil-leucin
81. Etionin
82. Norleucin

- | | |
|--|--|
| 83. 3,4-dihidroxi-fenil-alanin (DOPA) | 114. Glikamin (metil-amin) |
| 84. β -2-tienil-alanin | 115. α -amino-kaprilsav |
| 85. α -hidroxi- δ -amino-valeriánsav | 116. Glicil-fenil-alanin |
| 86. Aminociklopentán-karboxilsav | 117. Alanil-fenil-alanin |
| 87. Alanil-valin | 118. 2,4-diamino-vajsav |
| 88. Meta-tirozin | 119. Alamin (etil-amin) |
| 89. α -amino- β -hidroxi-vajsav | 120. δ -amino-n-valeriánsav |
| 90. Glicil-valin | 121. 2,3-diamino-propionsav |
| 91. Orto-fluoro-fenil-alanin | 122. α -amino- δ -fenil-vajsav |
| 92. Meta-fluoro-fenil-alanin | 123. 2-amino-vajsav |
| 93. Izoglutamin | 124. 5-hidroxi-triptofán |
| 94. Alanil-metionin | 125. Kineurenin |
| 95. Orto-tirozin | 126. Fenil-alanil-glicin |
| 96. Leucil-glicin | 127. β -fenil- β -alanin |
| 97. Leucil-glicil-glicin | 128. 3-amino-tirozin |
| 98. para-fluoro-fenil-alanin | 129. 6-hidroxi-triptofán |
| 99. Alanil-norvalin | 130. δ -amino-levulinsav |
| 100. Glicil-norvalin | 131. Leucil-tirozin |
| 101. Alanil-leucin | 132. Glicil-dehidro-fenil-alanin |
| 102. Glicil-etionin | 133. 4-amino-fenil-glicin |
| 103. δ -amino-levulinsav-metilészter | 134. Homokarnozin |
| 104. Homocisztin | 135. 4-hidroxi-triptofán |
| 105. Glicil-leucin | 136. 3-jódtirozin |
| 106. Arginin-szukcinát | 137. Kanavanin |
| 107. Alanil-norleucin | 138. 2-amino-3-guanidino-propionsav |
| 108. Glicil-norleucin | 139. ϵ -amino-n-kaprónsav |
| 109. Alaninol (2-amino-1-propanol) | 140. 2-amino-4-guanidino-vajsav |
| 110. Glicin-amid | 141. 3,5-dibróm-tirozin |
| 111. Glicil-metionin | 142. Leucin-amid |
| 112. β -amino-n-vajsav | 143. Homocisztein-tiolakton |
| 113. Glicil-tirozin | 144. 3,5-dijód-tirozin |
| | 145. 5-metil-triptofán |
| | 146. Glicil-triptofán |
| | 147. Homoarginin |

Rövidített meghatározások néhány aminosav elemzésére. Az esetek egy részében nincs szükségünk az összes aminosav meghatározására,

hisz pár aminosavon kívül más nem érdekel bennünket. Anyag, idő és energiatakarékosság miatt olyan módosított *gyors programokat dolgoztak ki*, melyekkel a teljes aminosavmeghatározás helyett csupán a minta egy-egy, számunkra fontos aminosavát határozzuk meg. A kívánt feladatot az ioncserélő gyantaoszlop méretének, a pufferek ionkoncentrációjának és pH-jának, valamint a kromatografálás hőmérsékletének megfelelő megváltoztatásával lehet elérni. A gyors módszerek közül legismertebbek a fenilketonuria, valamint a hipervalinémia és a leucinózis diagnosztizálására kidolgozott gyors eljárások, az étel- és ital-, a fehérje- és növény-nemesítési kutatásban pedig nagy jelentőséggel bírnak a metionin és a lizin együttes gyors meghatározására, valamint nagyszámú minta lizin- és cisztintartalmának gyors meghatározására kidolgozott eljárások.

A *fenilketonuria diagnosztizálása* során a fenil-alanin mennyiségét 22 cm-es gyantaoszlopon, 0,35M, pH=5,28 vagy pH=6,50-es Na-citrát-pufferrel mérik. A fiziológiás oldatot 57 °C-on elemezve a fenil-alanin a tirozin és a hisztidin között eluálódik, mennyisége 20 perc alatt meghatározható. A hipervalinémia és a leucinózis diagnosztizálásához a valint és a leucint kell gyorsan meghatározni. A gyantaoszlop mérete itt is 22 cm, az eluálópuffer 0,35M, pH=3,15-ös nátrium-citrát, az eluálás hőmérséklete pedig 57 °C. 80 cm³/óra pufferátfolyási sebességet alkalmazva, a cisztin a 42. percben, a valin a 50. percben, a metionin a 60. percben, az izoleucin a 75. percben, a leucin pedig a 82. percben jelenik meg.

Az étel- és ital-fehérje-kutatásban, továbbá a növény-nemesítésben óriási jelentősége volt a *metionin és a lizin gyors meghatározásának*. A különféle gyors eluálási lehetőségek közül *Dévényi és mtsai.* módszere terjedt el leginkább, mellyel rövid idő alatt nagyszámú minta tesztelhető metioninra, illetve lizinre. Az általuk kidolgozott módszer bármilyen, két programváltást lehetővé tevő aminosav-analizátorral végrehajtható. A meghatározás során 14 cm-es gyantaoszlopot alkalmaztak, az eluálópufferek pedig a következők voltak:

- 0,2M nátrium-citrát-puffer, pH=3,28, 0–25 percig,
- 0,8M nátrium-citrát-puffer, pH=4,25, 25–62 percig,
- 0,2M nátrium-hidroxid, 62–65 percig,
- 0,2M nátrium-citrát-puffer, pH=3,28, 65–75 percig.

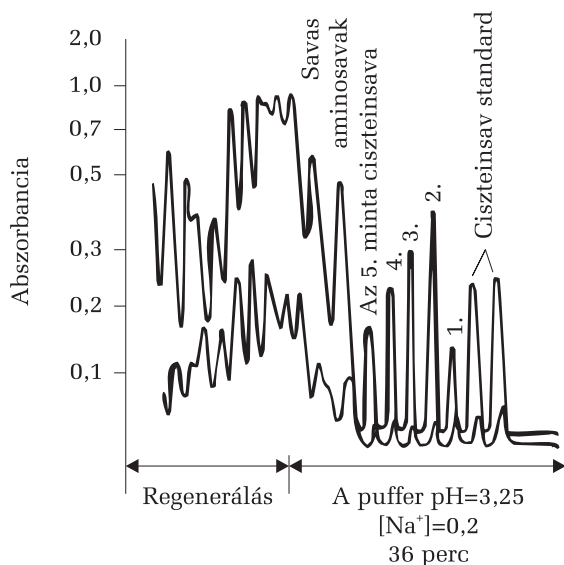
Különös jelentőségű ez a program a mezőgazdasági kutatómunkában, a növénynevelésben, az élelmiszerek minősítésében, hisz segítségével nagyszámú minta rövid idő alatt tesztelhető a két legfontosabb esszenciális aminosavra.

Nagyszámú minta lizintartalmának gyors meghatározására Villegas és mtsai. közöltek módszert. Az eljárás során három 9 cm hosszú, 8%-ban térhálósított, szulfonált polisztirol műgyantával töltött oszlopot alkalmaztak; az eluáló puffer 0,2M, pH=5,10 nátrium-citrát volt, az eluálást 40 °C-on 68 cm³/óra átfolyási sebesség mellett végezték. Az első hidrolizátumot az első oszlopba nyomták, majd 1–1 cm³ pufferrel háromszor utánaöblítették. Ezt követően 3,5 percig az eluálópuffert nyomták az oszlopra, majd 3,5 perc elteltével az eluálást megszakítva, a második minta hidrolizátumát vitték fel az oszlopra, és ismét 3,5 perces eluálás következett. A harmadik minta hidrolizátumának az első oszlopra való bevitele után az oszlop eluálását a 3. hisztidin csúcsig folytatták, majd 0,2M nátrium-hidroxiddal az oszlopot regenerálva, ezt követően ekvilibrálva folytatták a meghatározást. Az első oszlop regenerálása és ekvilibrálása alatt a második oszlop feltöltése történt, majd ennek analízise alatt a harmadik oszlopot készítették elő kromatografálásra. E módszerrel egy nap alatt mintegy 36 db minta lizintartalmát tudták meghatározni.

Kis fehérje- és cisztintartalmú anyagoknál a meghatározás metodikai nehézségein túl még azzal is számolni kell, hogy a cisztintartalom a fehérjehidrolízis során végbemenő bomlás és oxidáció miatt a valóságosnál lényegesen kisebb lesz. Mivel a metionin oxidációja és elbomlása a hidrolízis során a cisztinhez viszonyítva nem számottevő, ezért *csak a cisztin meghatározására Csapó és mtsai. egy gyors és termelékeny módszert dolgoztak ki*, mely a cisztinmeghatározás pontosságát a többi aminosavéval azonos szintre emeli, a módszer termelékenysége pedig 10–15-szerese a hagyományos módon végzett meghatározásnak. A meghatározás a következő módon történik.

A zsírtalanított vizsgálandó anyaghoz (kb. 20 mg fehérjére) 0,8 cm³ frissen készített perhangyasavat adnak, majd az oxidációt 15 percen keresztül 50 °C-on végzik. A –40 °C-on végzett liofilezéssel az oxidációt leállítják, illetve eltávolítják a mintából a perhangyasavat. A 6M HCl-as hidrolízist követően, a hidrolizátum feldolgozása után, az LKB 4101 automatikus aminosav-analizátor mintaadagoló berendezésének segítségével, az áramlási paraméterek lényeges megváltoztatása nélkül, egymás után 3 percenként öt mintát adagolnak az ioncserélő oszlopra. Az öt minta ciszteinsavvá oxidálódott cisztinje a pH=3,25-ös, 0,2M

nátrium-citráttal eluálva folyamatosan, 3 percenként egymás után jelenik meg a kromatogramon, majd az 5. minta ciszteinsava után jelenik meg az első minta aszparaginsava. Ekkor az analízist megszakítják, majd az ioncserélő oszlop regenerálását és ekvilibrálását követően folytatják a cisztinmeghatározást. Az 5.12. ábra egy tipikus kromatogramot mutat a cisztintartalom gyors meghatározására, perhangyasavas oxidációt követően.



5.12. ábra. Cisztintartalom meghatározása perhangyasavas oxidációval és gyorsított betáplálással

Három percről kettő percre csökkentve a mintabevitelek közötti időt, 5 helyett 7 minta ciszteinsav-tartalmát lehet meghatározni, bár a csúcsok elválása egymástól kissé romlik. A módszer hatékonyságát fokozni lehet a puffer pH-jának csökkentésével, ilyenkor ugyanis megnő a ciszteinsav és az aszparaginsav közötti hely, és így több minta ciszteinsav-tartalmának meghatározására van lehetőség. Ilyen kromatográfiai feltételek mellett a ciszteinsav csúcsa éles, hegyes, könnyen értékelhető, ezért a meghatározás pontossága lényegesen nagyobb, mint a cisztin-formában történő meghatározásé. Meghatározva hagyományos módon és az általuk kidolgozott gyors módszerrel a kukorica, a tejpor, a szója és a húsliszt cisztintartalmát, megállapították, hogy az oxidált mintából végzett cisztinmeghatározás mintegy 35–40%-kal nagyobb eredményt

adott a hagyományoshoz viszonyítva. Mintánként is jelentős eltéréseket kaptak a cisztinvesztésben a hagyományos módszerhez viszonyítva, ezért nagyszámú adat birtokában sem tudnak olyan szorzófaktort javasolni, melyek alkalmazásával korrektebb eredményeket lehetne kapni. Ha szeretnénk pontosan megismerni a minta cisztintartalmát, akkor a cisztint a perhangyasavas oxidációt követő többszöri betáplálással (gyors módszerrel) minden esetben meg kell határozni.

A cisztintartalom meghatározásánál alkalmazott gyorsított betáplálást alkalmazták *Csapó és mtsai. szintetikus aminosav-kiegészítők metionin-, illetve lizintartalmának meghatározására* is. Az elmúlt években egyre több saját takarmánykeverővel rendelkező mezőgazdasági nagyüzem kéri a különböző helyekről beszerzett aminosav-kiegészítők, koncentrátumok és szintetikus aminosavak minőségének ellenőrzését. A legnagyobb igény a DL-metionin és az L-lizin-meghatározására mutatkozott. Fentiek miatt a szintetikus metionin- és lizinkészítmények analízisére, azok pontos metionin- és lizintartalmának meghatározására gyors ioncserés oszlopkromatográfias és fotometriás eljárásokat dolgoztak ki (a fotometriás módszerek ismertetésére a vonatkozó fejezetben kerül sor).

A *szintetikus metioninkiegészítők metionintartalmának meghatározása során*, a várható metionintartalomtól függően, 5–10 mg anyagot oxidáltak – *Hirs* módszere szerint – perhangyasavval, majd az oxidált és perhangyasav-mentesített mintákat 2,2 pH-jú nátrium-citrát-pufferben oldották fel. Az így előállított 2,2 pH-jú metionin-szulfon-oldatból 5 percenkénti egymás utáni időközökkel 5 db mintát tápláltak be egy automatikus aminosav-analizátor ioncserélő oszlopára. Normális minta esetében, amely az összes fehérjeépítő aminosavat tartalmazza, a metionin-szulfon az aszparaginsav és a treonin között jelenik meg a kromatogramon, de ebben az esetben, mivel csak a metionin-szulfon van jelen a mintában, az öt minta metionin-szulfonná oxidálódott metioninja 5 perces időközökkel, egymás után jelenik meg a kromatogramon. Öt mintánál többet nem célszerű az ioncserélő oszlop felvinni, mert a jelenlévő szennyező anyagok az oszlopon feldúsulnak, és rontják a metionin-szulfon csúcsok szeparálódását. Az ötödik metionin-szulfon csúcs megjelenését követően az analízist megszakítják, majd az ioncserélő oszlop regenerálása és ekvilibrálása után folytatható a metionin-szulfon meghatározása. Mivel a metionin-szulfon a savas aminosavak körül jelenik meg a kromatogramon, az analízist pH=3,25, 0,2M nátrium-citrát pufferrel

végzik. 10 párhuzamos vizsgálat alapján megállapítható, hogy a szórásszázalék kettő alatt marad, ami a módszer megbízhatóságát mutatja.

A *szintetikus lizinkiegészítők lizintartalmát* a cisztein és a metionin gyors meghatározásánál leírtak szerinti kromatográfiás technikával *gyorsított betáplálással határozták* meg. A várható lizintartalomtól függően 5–10 mg lizinkiegészítőt mértek be egy 25 cm³-es mérőlombikba, és pH=2,2 citrát-pufferben feloldották, Filtrak 3,88-as szűrőpapíron szűrték, majd az így kapott lizinoldatból 25-szörös citrát-pufferrel hígítottak, 5 db mintát ötpercenkénti egymás utáni időközökkel betápláltak egy automatikus aminosav-analizátor ioncserélő oszlopára. Mivel a lizin normál minta esetén, amely az összes fehérjeépítő aminosavat tartalmazza, a hisztidin és az ammónia között jelenik meg a kromatogramon, ezért az analízist pH=6-os, 0,8M nátrium-citrát pufferrel végezték. Mivel csak lizin van jelen a mintában, az öt minta lizinje egymás után jelenik meg a kromatogramon. Öt mintánál többet nem célszerű az ioncserélő oszlopra felvinni, mert a jelenlévő egyéb szennyező anyagok az oszlopon feldúsulnak, és rontják a lizincsúcsok szeparálódását. Ha az 5. lizincsúcs megjelenik, az analízist megszakítják, az ioncserélő oszlopot 0,4M NaOH-dal regenerálják, és az eluáló pufferrel történő ekvilibrálás után folytatható a lizinmeghatározás. A módszer pontossága és reprodukálhatósága megegyezik az ioncserés oszlopkromatográfiás aminosav-meghatározással.

5.9.3. A triptofántartalom meghatározása

A triptofán bomlásának kinetikája

A fehérjék savas hidrolízisének tárgyalása során kiemeltük, hogy a triptofán tisztán sósavval kezelve 105 °C-on, 22 óra alatt, 40–60%-ban, szénhidrátok jelenlétében pedig teljesen lebomlik. A triptofán nemcsak a levegőben oldott oxigén, hanem szénhidrátok, szerin, cisztein, piro-szőlősav, cink és még sok más egyéb anyag jelenlétében is huminná bomlik le. *A szabad triptofán hő hatására bekövetkező bomlási reakcióit* Cuq és Friedman tanulmányozták igen részletesen. Megállapították, hogy a triptofán a levegő oxigénjének hatására szabad peroxidgyökké alakul, majd a továbbiakban quinazolinná, hexahidro-pirrol-indollá, valamint N-formil-kinureninné alakulhat. Ez utóbbi kinureninné, majd egy reakcióban anilinné és β -oxo-alaninná, egy másik reakcióban pedig orto-keto-anilinné és alanin szabad gyökké alakul.

Aldehid hatására a triptofánból 2-acilszármazékon keresztül dihidro- β -karbolin, majd β -karbolin keletkezhet. Megállapították, hogy a triptofán triptaminná és indol-3-piroszólósavvá alakulhat, e két vegyületből pedig kondenzációval (indolil-metil)tetrahidro- β -karbolin keletkezhet.

Cuq és Cheftel a triptofán bomlásának kinetikáját tanulmányozták levegő, illetve oxigén jelenlétében különböző hőmérsékleteken és különböző ideig végzett kezelés hatására. 90 °C-on 24 óra alatt sem levegő, sem oxigén jelenlétében nem tapasztaltak számottevő bomlást. 125 °C-on azonban oxigén jelenlétében a triptofán 80%-a, levegő jelenlétében pedig 45%-a, 140 °C-on oxigén jelenlétében 95%-a, levegő jelenlétében pedig 80%-a elbomlott. Ugyanők vizsgálták a triptofán metanos oldata fluoreszcens spektrumának változását a hőkezelés során. Míg a kezeletlen triptofán spektruma egységes 280–300, illetve 610–630 nm közötti hullámhossztartományban, addig a hőkezelt triptofán bomlástermékei a látható és ultraibolya tartományban szinte mindenütt mutatnak kisebb-nagyobb abszorpciós maximumot. Ebből is látszik, hogy *a triptofán meghatározása meglehetősen bonyolult, nehéz feladat*, hisz a triptofán érzékeny a savra, a hőre, a fényre és az oxidációs behatásokra, ezért a fehérje triptofántartalmának meghatározásával több-kevesebb eredménnyel nagyon sokan kísérleteztek. Próbálkoztak fehérjehidrolízis nélkül a fehérje triptofántartalmát meghatározni valamilyen színreakció segítségével, próbálták a fehérjét savval, illetve lúggal hidrolizálni, majd a hidrolizátumban lévő triptofánt ioncserés oszlopkromatográfiával, illetve fotometriásan meghatározni.

A triptofántartalom meghatározása fehérjehidrolízissel

A triptofántartalom meghatározása savas hidrolízissel. A triptofán savas hidrolízisével elsőként *Freedlender* és *Haber* foglalkozott, akik a triptofán bomlásának kiküszöbölésére a 6M HCl-hoz 0,5% 1,4-butánditiolt adtak, melynek következtében a triptofánt 80%-nál nagyobb kitermeléssel kapták vissza. *Matsubara* és *Sasaki* 2–4% tioglikolsavat adtak a 4M HCl-hoz, és ezt követően vákuumban végzett hidrolízissel, szénhidrát távollétében, a triptofán 82–86%-át nyerték vissza. Vizsgálataik szerint a 2%-nál kisebb koncentrációban jelenlévő tioglikolsav nem védi meg a triptofánt a hidrolízis folyamán, 4% felett pedig a tioglikolsav már némileg csökkenti a triptofán és az összes többi aminosav kitermelését, 2–4% közötti koncentráció-tartományban viszont a tioglikolsav,

a prolin és a cisztin kivételével, nincs hatással a többi aminosav kitermelésére. A prolin a cisztinből a redukáló közegben keletkezett ciszteinnel szennyeződhet. A nagy koncentrációban jelenlévő tioglikolsav a ciszteinsav és az aszparaginsav között egy intenzív, a karboximetil-cisztein helyén pedig egy kicsiny ninhidrin-pozitív csúcsot ad. *James a 6M HCl-hoz felváltva tioglikolsavat, merkapto-propionsavat, merkapto-szukcinsavat és oxálsavat adagolva* tudta a triptofán bomlását, illetve a huminképződést meggátolni. A hidrolizátumhoz hozzáadott glükóz jelenlétében a tioglikolsav védőhatása a triptofánra hatástalannak bizonyult. *Gruen és Nichols a 3-(3-indolil)-propionsav kis mennyiségét a 6M sósavhoz adva,* részben meg tudták akadályozni a triptofán bomlását a hidrolízis folyamán. *Liu és Chang 0,2% 3-(2-amino-etil)-indol (triptamin) tartalmú 3M para-toluol-szulfonsavval hidrolizálták a fehérjét* vákuumban 110 °C-on, 22, 48 és 72 óráig. A szulfonsavat nátrium-hidroxiddal közömbösítették, majd a minta aliquot részét bepárlás nélkül, a megfelelő hígítás után, kromatografálták. Szénhidrátok távollétében a különböző idejű hidrolízisek eredményeit nulla időre extrapolálva, a triptofánt 90%-nál jobb hatásfokkal kapták vissza.

Liu a továbbiakban a para-toluol-szulfonsav helyett 4M metán-szulfonsavval hidrolizálta a fehérjét 115 °C-on. Szénhidrát távollétében végzett hidrolízis után a triptofánt 90%-nál nagyobb mértékben nyerte vissza. Az eljárás hátránya az, hogy a metán-szulfonsavat nem lehet a sósavhoz hasonlóan ledesztillálni, azt nátrium-hidroxiddal közömbösíteni kell, és a hígítás után némelyik aminosav a meghatározási pontosság szempontjából igen lényeges alsó határ közelébe kerül. Említést érdemel még az is, hogy a valin- és izoleucin-kötések még a 125 °C-on 24 órán át végzett hidrolízis után sem szakadnak fel teljes mértékben kötéseikből.

Penke és mtsai. a fehérje triptofántartalmának meghatározására a 3M merkapto-etán-szulfonsavval hidrolizálták a vizsgálati anyagot. A fehérje triptofántartalmát 110 °C-on végzett 22 órás hidrolízis után öt analízis átlagában 95,4%-ban nyerték vissza, bár a szerzők módszerüket nem alkalmazták nagy szénhidrát-tartalmú minták triptofántartalmának meghatározására. A módszer igen nagy előnye, hogy a redukáló közeg miatt az oxidációra hajlamos aminosavak (pl. metionin) nagyobb kitermelést adnak a 6M HCl-val végzett hidrolízishez képest. A módszer hátránya, hogy a fehérje cisztintartalma a redukció következtében ciszteinné alakul át, és ez az átalakulás magas cisztintartalmú minták esetében jelentet különösebb gondot, hisz a prolinnal együtt eluálva meghamisítja annak meghatározását.

Csapó és mtsai. is 3M merkapto-etán-szulfonsavval, de magas hőmérsékleten (160, 170, 180 °C) és rövid ideig (30–60 perc) hidrolizálták a fehérjét, melynek során a triptofán kitermelése az összes savas módszerrel összehasonlítva a legmagasabb, és ugyanez elmondható volt a metionintartalomra is. Ez az egyetlen módszer a triptofán racemizációjának tanulmányozására is, hisz lúgos körülmények között végzett hidrolízisnél a triptofán racemizációja teljes mértékben végbemegy.

A felsorolt eljárások egyrészt a fehérjehidrolízis közben fellépő aminosav-destrukciót kívánták csökkenteni, másrészt a triptofántartalom meghatározását kívánták megoldani. A közölt eredmények csak a leírt metodikai feltételek igen pontos betartásával (hőmérséklet, vákuum, oxigénhiány, időtartam, nulla időre történő extrapolálás), és a megadott körülmények között (szénhidrát távolléte) érhetőek el. Ezért *Liu* szerint csakis *alkalikus hidrolízissel lehet a triptofántartalmat kvantitatíve meghatározni.*

A triptofántartalom meghatározása lúgos hidrolízissel. Amint az előzőekből is kitűnik, *a fehérjék savas hidrolízise alatt a triptofántartalom, különösen szénhidrátok jelenlétében, teljes mértékben elbomlik.* A triptofán szabad és kötött formában is egészen labilis a fém-, a hidrogén- és a hidroxidionok jelenlétében. A bomlási folyamatok magasabb hőmérsékleten különösen felgyorsulnak, ezért a triptofánt, annak ellenére, hogy élelmiszerek nagy részét kitevő gabonamagvak második limitáló aminosava, és táplálkozási szempontból igen fontos lenne mennyiségének ismerete, a többi aminosavval együtt a hagyományos kromatográfiai módszerekkel rendszerint nem lehet meghatározni.

A szakirodalomban a fehérjék lúgos hidrolízisére számos változat található. *A fehérjék bárium-hidroxidos hidrolízisét először Homer* alkalmazta a triptofántartalom meghatározására. *Jorpes 5M NaOH-dal hidrolizálta a fehérjét, és a triptofánt 78–98%-ban kapta vissza. Greene és Black a bárium-hidroxidos hidrolízist követően mikrobiológiai módszerrel alkalmazott a triptofántartalom meghatározására. A módszer nem vált be, mert a lúgos hidrolízis során a triptofán racemizálódott, és a mikroorganizmusok csupán az L-triptofánt tudták hasznosítani, a D-változat felhasználására csak korlátozottan voltak képesek. Mikrobiológia módszerrel a triptofántartalmat 15–30%-kal kevesebbnek mérték, mint amit a kémiai meghatározás eredményeiből várni lehetett. Höller nátrium-hidroxiddal hidrolizálva a fehérjét megállapította, hogy mind a szabad,*

mind a peptidkötésben lévő triptofán részben elbomlik a bázikus hidrolízis alatt. *Shizuko-Isole* és *Dreeze* szerint a hidrolízist nitrogénatmoszféra alatt végezve meg lehet akadályozni a szabad triptofán elbomlását, de az eljárás nem hatásos keményítő jelenlétében. A nátrium-hidroxid helyett hidrolizáló ágensként bárium-hidroxidot alkalmazva, *Dreeze* szerint a hidrolízis gyorsabb lesz, és a triptofán még keményítő jelenlétében sem bomlik le. További előnye a bárium-hidroxidos hidrolízisnek az, hogy könnyű a hidrolizátum semlegesítése, és a báriumot könnyen el lehet távolítani az oldatból, ami különösen mikrobiológiai meghatározás esetén igen fontos. A bárium-hidroxidos hidrolízis hátránya a triptofán racemizációja, ami a mikrobiológiai meghatározásoknál problémát okoz, ha viszont a hidrolízist követően kémiai módszerrel történik a meghatározás, a racemizáció semmilyen gondot nem okoz.

A *Miller* által kidolgozott hidrolízismódszer során a báriumot bárium-szulfát alakban távolítják el az oldatból, melynek során a csapadék triptofán-adszorpciója minimális, és ezzel a módszerrel a gabonafélék és élelmiszerek triptofántartalmát igen nagy biztonsággal meg tudták határozni. *Warner* vizsgálatai szerint a nátrium-hidroxidos hidrolízis lassúbb, mint a bárium-hidroxidos, és a nátriumot sokkal nehezebb a rendszerből eltávolítani, mint a báriumot. Ennek ellenére többen a nátrium-hidroxidos hidrolízismódszert előnyben részesítették a fehérje triptofántartalmának meghatározásakor. Így pl. *Simova* 4M nátrium-hidroxiddal 135 °C-on, 2 órán át és 6M bárium-hidroxiddal hidrolizálva a fehérjét, a két módszer között lényeges különbségeket nem tudott megállapítani.

Dévényi és *mtsai.* is 4M nátrium-hidroxiddal hidrolizálták a fehérjét, majd a sósavval történő közömbösítés után a hidrolizátumot közvetlenül kromatografálták. Az eljárás során 5 mg peptidet, fehérjét, illetve ennek megfelelő vizsgálati anyagot 2 cm³ 4M NaOH-dal oldottak, nitrogént buborékolattak keresztül a rendszeren, majd a fehérjét 5 órán át 105 °C-on hidrolizálták. *Hugli* és *Moore* a nátrium-hidroxidhoz részlegesen hidrolizált keményítőt adva, 110 °C-on, 16 órán át hidrolizálva a kukorica- és búzafehérjét, a triptofántartalmat 100 ±3%-ban kapták vissza. Az eljárás során 0,1–0,5 μmol triptofán/cm³ koncentrációjú fehérjeoldatból 0,1 cm³-t mértek be a hidrolízishez. 0,1 cm³ fehérjeoldathoz 0,5 cm³ 5M NaOH-ot, 5 μl 1%-os oktán-1-olt tartalmazó toluolos-oldatot, és ha a minta nem tartalmazott keményítőt, akkor még 25 mg részlegesen hidrolizált keményítőt mértek be egy 12×50 mm-es polipropilén

centrifugacsőbe. Légszáraz anyag hidrolízise esetén a várható triptofán-tartalom alapján történt a bemérés (0,01–0,05 μmol triptofán), ehhez 0,1 cm^3 vizet, 0,5 cm^3 5M NaOH-ot, az 1%-os oktán-1-ol toluolos-oldatból 0,5 μl -t és a minta keményítőtartalma szerint csökkentett mennyiségű keményítőt mértek be. A polipropilén csövet szárazjég–aceton hűtőkeverékben lehűtve megfelelő nagyságú üvegcsőbe helyezték, az üvegcsövet vákuumszivattyúhoz csatlakoztatták, evakuálták, majd leforrasztották. A hidrolízis-hőmérséklet és -időtartam hatását vizsgálva megállapították, hogy a meghatározás során:

- 16 óráig 110 °C-on hidrolizálva a fehérjét a triptofán 63%-a,
- 48 óráig 110 °C-on hidrolizálva a fehérjét a triptofán 93%-a,
- 48 óráig 135 °C-on hidrolizálva a fehérjét a triptofán 97%-a mérhető vissza.

A mérési eredményekből világosan látszik, hogy *a lúgos hidrolízis optimális idejét nem lehet minden fehérjére, valamint élelmiszerre egységesen megszabni*, ezért a meghatározás alkalmával legalább kétféle ideig célszerű a fehérjét hidrolizálni.

Oelshlegel és mtsai. szintén bázikus hidrolízist alkalmaztak a fehérje triptofántartalmának meghatározására, azonban a módszert túlzottan időigényesnek találták. A fehérje hidrolízisekor 12×50 mm polipropilén centrifugacsőbe mérik a kb. 50 mg fehérjét tartalmazó mintát, 15 cm^3 6M nátrium-hidroxidot és 0,3 cm^3 tiodiglikolt adnak hozzá. A folyadékot négy percen keresztül nagy tisztaságú nitrogént buborékoltatnak át, majd a centrifugacsövet egy olyan speciális üvegedénybe helyezik, melyet víz-sugárszivattyúhoz csatlakoztatva evakuálni lehet, majd ezt követően egy csappal légmentesen le lehet zárni. A hidrolízist lezárt készülékben 120 °C-on 20 óra alatt végzik. A kihűlt készülékből kiemelt centrifugacsőbe a hűtött hidrolizátumhoz annyi tömény sósavat adnak, hogy annak pH-ja 9 legyen. Az oldatot szűrik, majd 0,1M, pH=9 tetraborát pufferrel 50 cm^3 -re egészítik ki; a triptofánmeghatározást ebből az oldatból végzik. Az eljárás rendkívüli előnye, hogy a polipropilén centrifugacsőből a lúg nem old ki a triptofán bomlását elősegítő anyagokat. Kísérleteik eredményeképpen megállapították: mivel a bázikus hidrolízis folyamán több aminosav (különösen az arginin) lebomlik, a hidrolizátum nem alkalmas az összes aminosav meghatározására.

A lúgos hidrolízis körélményeit Noltmann és mtsai. nagyon alaposan tanulmányozták. Ennek során 10 mg fehérjére 1,26 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ -et és 1,45 cm^3 vizet mértek be egy kémcsőbe. A bárium-hidroxid szobahőmérsékleten nem oldódott fel, azonban a hidrolízis hőmérsékletén,

110 °C-on bekövetkezett a teljes oldódás. A bemérést követően a kémcső tartalmát megfagyasztották, majd a kémcsövet vákuum alatt leforrasztották, hogy megakadályozzák a triptofán hidrolízis közbeni oxidatív lebomlását. A hidrolízist 110 °C-on 50 és 70 óráig végezték, majd a hidrolizátumot lefagyasztották, a csöveket a fagyasztás után felnyitották, majd szobahőmérsékletűre melegítve a hidrolizátumot, egy 100 cm³-es műanyag centrifugacsőbe öntötték, a kémcsövet pedig 10 cm³ meleg desztillált vízzel kiöblítették. Ezután 10 percig szén-dioxidot áramoltattak a folyadékba állandó rázogatózás közben, majd a képződő bárium-karbonát csapadékot lecentrifugálták, és 5–5 cm³ szobahőmérsékletű vízzel háromszor kimosták. Az egyesített hidrolizátumot és mosófolyadékokat 30 °C-on rotációs gyorsbepárlón 1 cm³-re párolták be. Ezt követően egy 50 cm³-es *Erlenmeyer*-lombikba szűrték át, a szűrőt 5–7 cm³ vízzel mosták, majd az oldatot fagyaszttva szárították. A száraz hidrolizátumot 5 cm³ 2,2 pH-jú 0,2M nátrium-citrát pufferben oldották a felhasználás előtt. A leucint a lúgos hidrolízis közben is stabilnak találták, ami lehetőséget adott arra, hogy a leucint a savas és a lúgos hidrolizátumból külön-külön meghatározva megkapják a bárium-karbonát csapadékon és az üvegszűrő pórusaiban bekövetkezett adszorpciós veszteséget. Az így kapott leucinértékekből a triptofán korrekcióját is elvégezték. Az összehasonlító vizsgálatokban a bemért triptofán 83%-át, a leucinnak pedig 85%-át nyerték vissza. Véleményük szerint a triptofánbomlás kinetikájának ismeretében a fehérjék triptofántartalma közelítőleg meghatározható.

A fehérjék bárium-hidroxidos hidrolízisére vonatkozó követelményeket az alábbiak szerint összegezték:

- 10 mg fehérjéhez 1,26 g Ba(OH)₂ · 8 H₂O-t és 1,45 cm³ vizet mérnek száraz vizsgálati minta esetén.
- A hidrolízishez olyan eszközöket kell használni, amelyekből nem keletkezhet a hidrolízis folyamán bárium-szilikát, vagy nem oldódhat ki olyan anyag, mely a triptofán bomlását meggyorsítaná.
- A hidrolízist 110 °C-on 16 és 48 órán át célszerű végezni.

A triptofánvesztés kiszámítására a lúgos hidrolízisből is el kell végezni a neutrális aminosavak meghatározását, ugyanis a két kromatografálásnál kapott leucin mennyiségéből a triptofánvesztés megállapítható.

Áttekintve a rendelkezésre álló szakirodalmat, úgy tűnik, hogy *a triptofántartalom meghatározásakor a legcélravezetőbbnek a bárium-hidroxidos hidrolízis látszik*, hisz itt a hidrolízis relatíve gyorsan lejátsszódik, és a báriumot a nátriumnál lényegesen könnyebben el lehet

távolítani. Valószínűleg a bárium szulfát alakban történő eltávolítása célravezetőbb, hisz a bárium nátrium-szulfáttal történő kicsapása semleges oldatból nem okoz triptofán-adszorpciót.

A triptofántartalom meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával

A bárium-hidroxiddal, esetleg a 4M nátrium-hidroxiddal végzett fehérjehidrolízist követően a 2 cm³ hidrolizátumhoz *Dévényi* előírásai szerint hozzáadunk 3 cm³ 0,2M nátrium-citrát (pH=3,28) puffert és 1 cm³ 37%-os HCl-at. A hidrolizátum aliquotját megfelelő hígítás után, vagy hígítás nélkül közvetlenül az aminosav-analizátor ioncserélő oszlopára visszük. Az oszlop kalibrálására a fentiek alapján kezelt triptofán-törzsoldatot használjuk. A meghatározás során a következő eljárást alkalmazzuk:

- Gyantatöltet magassága: 14 cm.
- Puffer: 1,5M nátrium-citrát, pH=6,0.
- Puffer átfolyási sebesség 100 cm³/óra.
- Ninhidrin átfolyási sebesség 50 cm³/óra.

Az alkalmazott feltételek szerint az arginin a 16. perc elteltével jelenik meg a kromatogramon, ezt követően az arginintől és a többi aminosavtól jól elválóan jelentkezik a triptofán, majd 24 perc alatt a meghatározás befejeződik. Tekintettel az eluáló puffer magas nátriumion-koncentrációjára és pH-jára, regenerálás és ekvibrálás nem szükséges, ezért a triptofán-csúcs megjelenését követően az analízis további mintákkal folytatható.

A triptofántartalom meghatározása fotometriával

A szabad vagy peptidkötésben lévő triptofán több vegyülettel színes terméket képez, így pl. a *para-toluol-szulfonsavval*, a *para-dimetil-amino-benzaldehiddel* és az *N-bróm-szukcinimiddel* lejátszódó reakciók képezik a triptofán fotometriás meghatározásának az alapját, melynek során a kvantitatív meghatározásnál kapott színt hasonlítják a jól ismert koncentrációjú standard színéhez, ami rendszerint szabad triptofánból áll.

Néhányan rámutattak arra, hogy a szabad és a peptidkötésben lévő triptofán nem ad azonos intenzitású színt az előbbi reagensekkel, és

a triptofánszármazékok, mint az N-acetil- és az N-benzoil-triptofán, erősebb színt adnak a para-toluol-szulfonsavval, mint a szabad triptofán. A peptidkötésben lévő triptofán intenzívebb színt ad a para-dimetil-amino-benzaldehiddel (DAB), mint a szabad triptofán, és további nehézségeket okoz a módszerek alkalmazásánál az is, hogy a fehérjék – különösen gabonamagvak és élelmiszerek – rosszul oldódnak, és a reagens nem kívánatos színreakcióba lép a vizsgált anyag nem fehérjeszerű frakcióival. Érdekes módszert közölnek a hús triptofántartalmának meghatározására fehérjehidrolízis nélkül *Rékásiné* és *mtsai*. A módszer elve, hogy a triptofán para-dimetil-amino-benzaldehiddel 9,5M kénsavas közegben színtelen kondenzációs terméket képez, mely nátrium-nitrit hatására kék színű gyületté oxidálódik.

Az eljárás során 10 mg homogenizált, esetleg szárított izommintát 20 cm³-es csiszolt üvegdugós kémcsőbe mérnek, majd hozzáadnak 20 cm³ frissen készített reagenst, mely 30 mg DAB-ot tartalmaz 10 cm³ 9,5M kénsavban oldva. A kémcsövet összerázás nélkül 16–17 órán át, 20–25 °C-on sötétben állni hagyják, majd hozzáadnak 0,1 cm³ frissen készített 0,045%-os nátrium-nitrit-oldatot. Az intenzív összerázást követően a kék színű oldatot zsugorított üvegszűrőn, vákuumban szűrik, és az extinkciót 590 nm-en mérik. A triptofántartalmat a vakpróba és a triptofán standardok extinkciójának figyelembevételével, kalibrációs görbe alapján számolják.

A vizsgált fehérje hidrolízisével a helyzet egyszerűsödik, hisz a triptofán oldatba megy, és színe hasonlóan határozható meg, mint a standard sorozatnál. Az enzimatis hidrolízist nem találták megfelelőnek a triptofán meghatározására, mert egyrészt a hidrolízis nem tökéletes, másrészt az enzim triptofántartalma is hozzájárul a vizsgált minta triptofántartalmához. Mások a *pronáz* és a *papain* proteolitikus enzimek alkalmazásával, a para-dimetil-amino-benzaldehides módszerrel, különböző élelmiszerek triptofántartalmát igen pontosan tudták meghatározni.

A fotometriás módszerek közül a n-bróm-szukcinimides meghatározás nem terjedt el a gyakorlatban, és ugyanez elmondható a jégec-vas(III)-klorid reagenssel létrehozott színreakcióra is. Ez utóbbi esetében a keletkezett vörös színű oldatot 545 nm-en fotometrálva gabonamagvak triptofántartalmát határozták meg. A *para-dimetil-amino-benzaldehides módszert* viszont *többen alkalmazták* mind a hidrolizálatlan fehérje, mind a hidrolizátum triptofántartalmának meghatározására. A reagens és a triptofán közötti kék színreakciót gabonafélék, valamint hús és húskészítmények triptofántartalmának meghatározására alkalmazták.

A módszer egészen jól alkalmazható magas triptofántartalom esetében, gabonaféléknél azonban korlátozottan használható, mert a gabonafélék igen lassan oldódnak a kénsavban, és a kapott zavaros oldat hibás értékeket ad a triptofánra.

Érdekes módszert közölnek a triptofán fotometriás meghatározására *Basha* és *Roberts*, akik a triptofánt nátrium-nitrítal oxidálták, majd az oxidált terméket *N-1(naftil)-etilén-diamino-dihidro-kloriddal* reagáltatták, majd a kapott bíbor-rózsaszín anyagot 550 nm-en fotometrálták. A fényabszorpciót nem zavarják a szénhidrátok, az aminosavak, a sók és számos olyan komponens, ami a hidrolizátumban előfordul. A reakciót számos indolszármazék – mint amilyen pl. az indol-3-ecetsav is – adja. A peptidkötésben lévő triptofán kevésbé reaktív mint a szabad állapotban lévő, ezért a fehérjét a színreakció előtt mindenképpen hidrolizálni kell.

A fehérje *indolcsoportja az ultraibolya tartományban fényelnyelést mutat*, ami ugyancsak felhasználható mennyiségének meghatározására. Oldható fehérjék esetében az UV abszorpciót 280–288 nm-en mérik. Az ultraibolya fényelnyelés a bármely módszerrel oldatba vitt fehérje, valamint a hidrolizátum fényelnyelésének mérésére is alkalmas. Némi különbség tapasztalható az ultraibolya tartományba mért fényabszorpció alapján, és a színreagenssel létrehozott színes vegyület látható fény tartományban végzett abszorpciója alapján meghatározott triptofántartalom között. A szakirodalom eredményeit értékelve, a triptofán fotometriás meghatározásának követelményeit az alábbiak szerint lehet összegezni:

- A szabad és a peptidkötésben lévő triptofán eltérő színintenzitást ad a legtöbb, a triptofán fotometriás meghatározására használt reagenssel. Az eltérő színintenzitás, valamint a fehérjék nehéz oldódása miatt a fotometrálist hidrolizált mintából célszerű végezni.
- Mivel az enzim hidrolízis nem bontja szét tökéletesen a peptidkötéseket, és az enzim saját triptofántartalma is zavarja a minta triptofántartalmának meghatározását, a fehérje hidrolízisét legcélszerűbb bárium-hidroxiddal végezni. A hidrolizátum báriummentesítését, a triptofánvesztések elkerülése miatt, a semlegesített hidrolizátum nátrium-szulfátos kezelésével kell elvégezni.
- A fotometriás meghatározást legcélszerűbb a para-dimetil-amino-benzaldehides színreakcióval végezni, de szükség esetén szóba jöhet az ecetsav és a glioxál vagy az *n-1(naftil)-etilén-diamino-dihidro-klorid* és a triptofán között létrejött szín fotometrálása is.

5.9.4. A kéntartalmú aminosavak meghatározása

A kéntartalmú aminosavak meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával

A fehérje szerkezetének kialakításában igen fontos szerepet töltenek be a kéntartalmú aminosavak, a cisztin, a cisztein és a metionin. *A cisztin és a cisztein a fehérje hidrolízise során, különösen szénhidrátok jelenlétében bomlik, oxigén jelenlétében pedig elsősorban cisztein-szulfinsavvá és ciszteinsavvá oxidálódik.* A kéntartalmú aminosavak hidrolízis közbeni bomlására már a múlt század 30–40-es éveiben rámutattak, sőt rájöttek arra is, hogy a ciszteinből a hidrolízis alkalmával alanin és szerin, szénhidrátok jelenlétében pedig glicin képződhet. *A metionin nyomnyi oxigén jelenlétében metionin-szulfoxiddá alakul, de lebomolhat homociszteinné, homocisztinné és glicinné is.* A cisztein elbomlását segíti a jelenlévő szabad triptofán is, hisz a triptofán cisztein jelenlétében huminná bomlik le.

A cisztin diszulfidhidakkal köti össze a peptidláncokat, melyek redukcióval, oxidációval és hidrolízissel bonthatók meg. A hidrolízis a cisztin különféle nehezen azonosítható átalakulásához vezet, redukcióval pedig egy molekula cisztinből két molekula cisztein keletkezik. Erőteljes oxidáció hatására egy molekula cisztinből két molekula ciszteinsav keletkezik, miközben a molekulában lévő metionin metionin-szulfoxiddá, majd metionin-szulfonná alakul át. A cisztein elbomolhat a hidrolizátum feldolgozása és beszárítása közben, és többen beszámolnak növényi eredetű élelmiszerek savas hidrolízise alatt lejátszódnó metionin-veszteségről is. Többen közölnek módszereket merkaptó-etanol vagy tioglikolsav használatáról a savas hidrolízis során a kéntartalmú aminosavak oxidációjának megelőzésére.

Mivel igen sokan bizonyították a cisztin és a metionin hidrolízis alatti oxidációját, és mert a két aminosav végső oxidációs származéka, a metionin-szulfon és ciszteinsav igen stabil vegyület, magától adódott a lehetőség a két kéntartalmú aminosav oxidált formában történő meghatározására. Az oxidációhoz olyan oxidálószer kellett választani, mely a kéntartalmú aminosavakat teljes mértékben átalakítja, de az összes többi aminosavat nem károsítja. 1942-ben alkalmazták először a perhangyasavat kéntartalmú aminosavak oxidációjára, és ekkor tanulmányozták először a perhangyasavas oxidáció reakciókörülményeit is. Schramm

és mtsai. javaslatára terjedt el széleskörűen a perhangyasav a kéntartalmú aminosavak oxidációjára az aminosav-analitikában. Hirs 1956-ban a ribonukleáz aminosav-összetételének meghatározásánál *a kéntartalmú aminosavakat nagy pontossággal meg tudta határozni a perhangyasavas oxidációt követően metionin-szulfon, illetve ciszteinsav alakban*. A kéntartalmú aminosavak meghatározásának módszerét végül Moore és Stein tökéletesítették, és tették rutinszerűen alkalmazhatóvá. A módszer kritikus pontja – amennyiben nemcsak a kéntartalmú aminosavakat, hanem az összes aminosavat az oxidált mintából kívánjuk meghatározni – a *túl-oxidáció* és annak *megakadályozása*. A túloxidáció megakadályozására először a hidrogén-bromid alkalmazását javasolták, majd az oxidáció leállítására kipróbálták a nátrium-szulfidot is. Az első módszer a cisztinre jól reprodukálható, a metioninra viszont reprodukálhatatlan eredményeket adott. A második módszernél olyan treonin- és szerinszármazékok keletkeztek, melyek a ciszteinsav helyén megjelenve annak kiértékelését akadályozták. Ezt a problémát később úgy oldották meg, hogy a nátrium-piroszulfidot használták a perhangyasav eltávolítására.

Berner egy tanulmányában a növényi fehérjék cisztin- és metionintartalmát vizsgálta a perhangyasavas oxidációt követően, ciszteinsav és metionin-szulfon alakban. Vizsgálta az oxidáció idejének hatását a cisztin- és metionintartalomra, és összehasonlította az oxidált és a nem oxidált mintákból kapott eredményeket. A 15, 20 és 25 percig tartó oxidáció után kapott értékeket összehasonlítva megállapította, hogy a 15 percig 50 °C-on perhangyasavval végzett oxidáció elégséges arra, hogy a cisztin ciszteinsavvá, a metionin pedig metionin-szulfonná alakuljon. Az oxidált alakban történő meghatározás eredményeit összehasonlította olyan 6M HCl-as hidrolízissel kapott eredményekkel, amikor előzetes oxidációt nem végeztek, és a sósavat analitikai nitrogénnel átbuborékkoltatták, illetve nitrogénnel nem kezelték. *A legalacsonyabb cisztin és metionin eredményt a kezeletlen sósavas hidrolízis adta, de a nitrogénnel átbuborékkoltatott sósav is mintegy 20–50%-kal kevesebbet adott a metioninra és a cisztinre, mint oxidált formában meghatározva*. Több növényi fehérje aminosav-összetételét vizsgálva arra a megállapításra jutott, hogy a metionin-tartalomban nincs lényeges különbség attól függően, hogy metionin (nitrogénnel kezelt sósav) vagy metionin-szulfon alakban történik-e a meghatározás, *az oxidált formában meghatározott cisztin ellenben a minták átlagában 45%-kal többnek bizonyult a nem oxidált formában meghatározotthoz képest*.

Dove és *Frenay* a tejpor kéntartalmú aminosavait perhangyasavas oxidációt követően vizsgálva megállapították, hogy vákuumban történt hidrolíziskor, levegő teljes kizárásával, a metionin nem különbözik lényegesen az oxidált vagy nem oxidált mintákból meghatározva, a *cisztin* viszont 40%-kal kevesebbnek adódhat nem oxidált formában, mint perhangyasavas oxidációt követő ciszteinsav-alakban történő meghatározás után. *Simova* a kéntartalmú aminosavakat és a treonint a perhangyasavas oxidációt követő hidrolizátumból határozta meg. Az 5% hidrogénperoxidot tartalmazó hangyasavval 0 °C-on végezve az oxidációt, majd 3 órán át 145 °C-on hidrolizálva a fehérjét, a treonin mennyisége a perhangyasavas oxidáció körülményei között gyakorlatilag változatlan maradt a nem oxidált mintából történt meghatározáshoz képest.

Liu S-szulfocisztein alakban határozta meg a fehérjék *cisztin-* és *ciszteintartalmát*. A *ciszteintartalmú* fehérjehidrolizátumot ditioeritrolal redukálták, majd Na-tetratióttal kezelték. A kvantitatív reakcióban keletkezett S-szulfociszteint aminosav-analizátorral határozták meg. E módszer alkalmazásával a hisztidin 3-karboxi-metil-hisztidinné alakul, amelyet ilyen alakban lehet meghatározni. *Cole* és *mtsai.* a humán hemoglobin *ciszteintartalmát* S-karboximetil-cisztein alakban határozták meg az alábbi eljárás szerint:

1–2 μmol hemoglobint oldottak 3 cm^3 0,2M lauril-szulfát-oldatban, melyhez 0,6 cm^3 5%-os jódecetsavat adtak. A reakcióelegy pH-ját 9-re állították be, majd 25 °C-on játszották le a reakciót. Ezt követően 40–50 órán át vízzel szemben dializálták, majd a karboxi-metil-származékot 110 °C-on 22 és 70 órán át 6M HCl-val hidrolizálták. Módszerüket a perhangyasavas oxidációval ciszteinsav alakban történő meghatározáshoz hasonlítva, a hemoglobin *ciszteintartalmában* lényeges különbséget nem kaptak. A jódecetsav és a cisztein, valamint a *cisztin* reakcióját vizsgálva megállapították, hogy 6 órás reakcióidő elegendő az S-karboximetil-cisztein kialakulásához. Hosszabb reakcióidő a lizin, a metionin és a hisztidin alkilálását vonja maga után, ami ezen aminosavak mérési eredményeit megghamisíthatja.

Noltmann és *mtsai.* az *ATP kreatin-transzfoszforiláz* *ciszteintartalmát* S-karboximetil-cisztein alakban, perhangyasavas oxidáció után ciszteinsav formában, és savas hidrolízist követően, levegőn visszaoxidálva, *cisztin* alakban is meghatározták. A legnagyobb értékeket ciszteinsav alakban mérve, valamint S-karboximetil-cisztein és a maradék cisztein összegeként kapták; mindkettő mintegy 10–20%-kal magasabb volt

a cisztin alakban mért meghatározáshoz képest. Ezt követően a cisztintartalmat meghatározták még p-merkuri-benzoáttal történő titrálással, és a szulhidrilcsoportok ezüstkomplexeinek amperometrikus titrálásával is.

Csapó és mtsai. 3M merkpto-etán-szulfonsavval 125 °C-on, 24 órán át és magas hőmérsékleten (160, 170, 180 °C), rövid ideig (30–60 perc) hidrolizálták a fehérjét, melyet követően a redukáló közegnek megfelelően az összes hidrolízismódszer közül a legnagyobb kitermelést kapták a metioninra (ill. triptofánra). Cisztint ezzel a módszerrel nem tudtak meghatározni, mert a cisztin ciszteinné redukálódva a prolinnal együtt eluált a normál, ioncserés oszlopkromatográfiás aminosav-analízis körülményei között. Ajánlanak ugyan speciális puffereket a cisztein és a prolin elválasztására, de így a módszer nehézkessé válik, és nem javasolható a ciszt(e)intartalom meghatározására, annak ellenére, hogy a metioninra az összes hidrolízismódszer közül a legjobbnak bizonyult.

A kéntartalmú aminosavak meghatározására végzett vizsgálatokat összegezve kitűnik, hogy mind a cisztin, mind a metionin hajlamos a hidrolízis közbeni bomlásra, más vegyületekké történő átalakulásra, és ez az átalakulás szénhidrátok jelenlétében még fokozottabban jelentkezik. A vizsgálatok szerint *a cisztin sokkal hajlamosabb a nyomnyi mennyiségben jelenlévő oxigénnel történő reakcióra, mint a metionin.* Növényi és állati eredetű fehérjék aminosav-összetételének meghatározásánál arra az eredményre jutottak, hogy ha a hidrolízis vákuumban, vagy a 6M HCl megfelelő nitrogénezetése után végzik, akkor a minták metionintartalma nem különbözik lényegesen attól függően, hogy metionin vagy metionin-szulfon alakban történik-e a meghatározás. Ezzel szemben mind a növényi, mind az állati eredetű fehérjék aminosav-összetételének meghatározásánál azt állapították meg, hogy az oxidált mintákból a cisztin, ciszteinsav alakban meghatározva, mintegy 40–45%-kal többnek adódik a nem oxidált, cisztin formában meghatározotthoz képest. Nem sokkal jobb a helyzet akkor sem, ha a hidrolizáló ágenshez redukálóanyag hozzáadásával kívánjuk megakadályozni a két kéntartalmú aminosav oxidációját, vagy ha redukálószer (merkpto-etán-szulfonsav) alkalmazunk hidrolizáló ágensként. Ekkor ugyanis a cisztin már nyomnyi redukálóanyag jelenlétében részben vagy teljesen ciszteinné alakul, és ha a hidrolízis végén vagy a hidrolizátum oszlopra juttatása előtt nem történik meg a cisztein visszaoxidálása cisztinné, akkor egyrészt csökken a cisztinkitermelés, másrészt a keletkezett cisztein – különösen magas

cisztintartalmú minták esetében – meghamisíthatja a prolin mérési eredményeit, mert a cisztein a prolin helyén jelenik meg a kromatogramon. Nagyobb mennyiségű redukálószer hozzáadása esetén, vagy ha a minta tartalmaz redukáló anyagot, vagy ha a hidrolizáló ágens tartalmaz redukáló csoportot, mint pl. a merkaptó-etán-szulfonsavas hidrolízis esetén, a minta cisztintartalma kvantitatíve átalakul ciszteinné. Ennek visszaoxidálása cisztinné megkívánja a redukálószer eltávolítását, manipulációs veszteséget okozhat, és nehéz az oxidációt úgy végrehajtani, hogy az megálljon a cisztinnél, és ne oxidálja a metionint és a jelenlévő cisztint. Különböző szerzőknek cisztintartalomra végzett összehasonlító vizsgálataiból kiderül, hogy a ciszteinsav formában történő meghatározás mintegy 10–15%-kal nagyobb értéket ad a cisztintartalomra, mint a cisztin alakban történő meghatározás levegővel való visszaoxidálás után, vagy S-karboximetil-cisztein alakban meghatározva. A módszereket illetően tehát *a kéntartalmú aminosavakra a legegyszerűbben kivitelezhetőnek és talán legpontosabbnak a perhangyasavas oxidációt követő ciszteinsav, illetve metionin-szulfon alakban történő meghatározás mondható.*

A kéntartalmú aminosavak fotometriás meghatározása

Az aminosavak ioncserés oszlopkromatográfiája, valamint nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás meghatározása az utóbbi időben olyan rohamosan fejlődött, ami nemcsak a pontosságot növelte, de az aminosav-analízis idejét is lecsökkentette. Ennek ellenére egy teljes program még ma is fél-, másfél órát vesz igénybe. Egy rövid program a cisztin és metionin meghatározása 30–45 percig tart, így egy 8 órás munkanap alatt automatikus mintaadagoló hiányában maximum nyolc minta analízisét lehet elvégezni. A fotometriás eljárások igen nagy előnye az ioncserés oszlopkromatográfiához, illetve a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiához viszonyítva az, hogy nem igényel igen drága célműszert, a mérést gyorsan, többszöri ismétléssel el lehet végezni, és kellő gyakorlatot követően egy technikus egy nap alatt 80–100 minta metionin-, cisztein- (esetlen triptofán- vagy lizin-) tartalmát is meg tudja határozni. További előnye a módszernek, hogy ha csak egy vagy két aminosav meghatározása szükséges a mintából, és a többi aminosav nem bír különösebb jelentőséggel, akkor a fotometriás módszerrel csak a kívánt aminosavat határozzuk meg. Erről az oldalról tekintve a dolgokat,

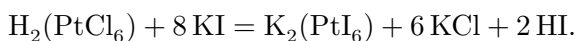
az IEC és a HPLC egy-két kívánt aminosav meghatározására túlságosan időigényes és drága.

A metionintartalom fotometriás meghatározása

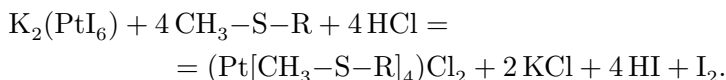
A metionin fotometriás meghatározására meglehetősen kevés módszer használható a gyakorlati analitikában. A nitroprusszid-nátriumos módszer nem nagyon érzékeny a metioninra, és a színreakciót a hisztidin és a triptofán jelenléte is zavarja. A zavaró hatást a glicin feleslegben történő adagolásával ki lehet küszöbölni, és a módszert automatikussá lehet fejleszteni. A metionin nátrium-nitrittel és trinátrium-pentacianoaminoferráttal ecetsavas közegben reagál, mely reakciót a cisztin és a cisztein nem zavarja, a hisztidin zavarását pedig pH=1,5-ös glicinpufferrel ki lehet küszöbölni. A módszer érzékenysége itt sem túl nagy, ennek ellenére a színreakcióra alapozva egy átfolyós rendszerű automatikus meghatározást dolgoztak ki.

A papírkromatográfiás elválasztás során köztudottan platina-jodid-tartalmú reagensekkel hívták elő a kéntartalmú aminosavakat. A periódusos rendszer *platinacsoportjának fémjei* (platina, palládium) *színes komplex jodidokat képeznek, melyek szerves szulfidokkal, vagy merkapto-vegyületekkel, mint amilyen pl. a metionin és a cisztein, elszíntelenednek* a kéntartalmú vegyületeknek, mint ligandumnak, a platínával vagy palládiummal képzett komplexei révén. Hasonlóan reagál a metionin és a cisztein a palládium-fenazino-triazo-komplexszel a színintenzitás csökkenése mellett. *Holz* leírása szerint a *platina-jodid komplex elszíntelenedési reakciója* az alábbiak szerint megy végbe:

A színreagens előállítás:



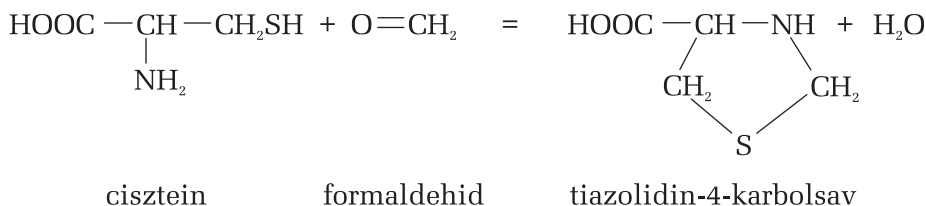
A komplexképződés metioninnal:



Pt-metionin színtelen komplex

A cisztein hatása a platinakompleyre lényegesen kisebb, mint a metioniné. A cisztein minimális zavarásának kiküszöbölésére a ciszteint feleslegben adott formaldehiddel lekötötték, amikor az alábbi egyenlet szerint tiazolidin-4-karbonsav keletkezett.

A cisztein maszkírozása:



5.13. ábra. A cisztein maszkírozása

A narancsszínű platina-jodid elszíntelenedésén alapuló módszert *Holz* átfolyós rendszerű, automatikus metioninmeghatározási módszerré dolgozta át. A meghatározás során a színes reagensoldat a metionintartalommal arányosan színtelenedik el, mely 5–15 mm-es küvettában 490 nm-nél mérhető. Javaslatá szerint célszerűbb a vizsgált fehérjét enzimatikusan hidrolizálni, mert a savas hidrolízisnél nagymérvű metionin- és cisztinvesztéssel kell számolni. Az oxidált minta hidrolízise után a fotometriás eljárást nem lehet alkalmazni, mert a ciszteinsav és a metioninszulfon nem adja az ismertetett színreakciót. Mivel az enzimátikus hidrolízisnél a minták gyakran sárga vagy barna színűek, a minták vakértékeit külön sorozatban meg kell határozni, ahol a színreagenst desztillált vízzel helyettesítjük. *Holz* több párhuzamos méréssel meghatározta az őszi rozs, a takarmánybab és az őszi búza metionintartalmát, melynek során a variációs koefficiens 0,25%-tól 1,55%-ig változott, a meghatározások átlagában pedig 0,71% volt.

A cisztintartalom fotometriás meghatározása

A cisztin és a cisztein fotometriás meghatározásánál a cisztint a legtöbb esetben redukcióval ciszteinné kell átalakítani. Ehhez az átalakításhoz szulfitot, nátrium-bórhidridet vagy merkaptó-etanolt használtak. *Cleland* vezette be a cisztin redukójára a *ditioeritritet* (eritro-2,3-dihidroxi-1,4-ditiolbután) és a *ditiotreit* (treo-2,3-dihidroxi-1,4-ditiolbután). A ditioeritrittel (DTE) és a ditiotreittel (DTT) végzett redukció előnye az, hogy egy ciklikus diszulfid képződése miatt a *Cleland*-reagens oxidált formája kerül előtérbe, és az a reakcióegyensúlyt a cisztein oldalára tolja el. A DTE és DTT alacsony redoxpotenciálja miatt, a merkaptó-etanollal ellentétben, csak kis reagensfelesleg szükséges, hogy a cisztin teljes redukciója végbemenjen.

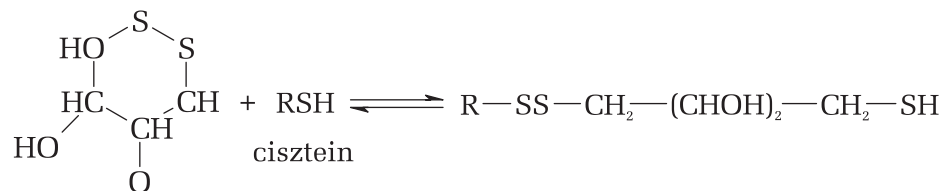
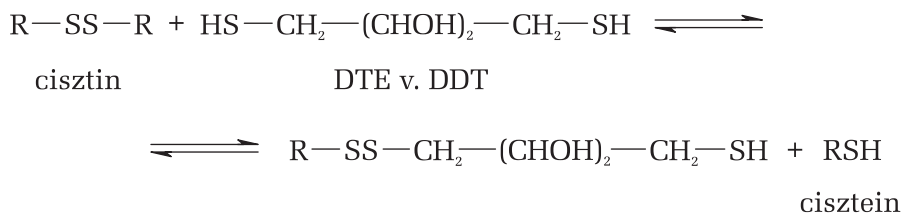
A cisztein fotometriás meghatározására több módszert dolgoztak ki. Meghatározták a ciszteint a ninhidrin és a cisztein között ecetsavas-sósavas közegben 100 °C-on, 6–10 perc alatt létrejött színes vegyület 570 nm-en végzett fotometráálásával. Az egyéb természetben előforduló aminosavak mellett lehet mérni a noradrenalin-bitartarátból kálium-ferri-cianiddal történő oxidálással előállított noradrenokrom vegyület színtelenedését 411 nm-en. Színreakciót hoztak létre a cisztein, valamint a brucin és a kálium-perszulfát 50%-os kénsavas oldata segítségével is, melyet követően a cisztein mennyiségét 625 nm-en mérték fotometráálással. Használható a cisztein meghatározására a naftokinon-4-nátrium-szulfonát és a cisztein között létrejött reakcióban keletkezett színes termék, mely 520 nm-en mutat fényelnyelési maximumot. Alkalmas még a ciszteinnel színreakciót létrehozni a nátrium-nitrit, a szulfanil-amid és az n-1-naftil-etilén-diamin. Ezeknek hatására a ciszteinből nitro-izo-cisztein keletkezik, melynek fényelnyelését 650 nm-en mérik.

A cisztein színes vegyületet képez még a tiofluoreszeinrel, az 5,5'-ditio-bis-(2-nitro-benzoészav)-val, a 2-vinil-kinolinnal és a 4,4'-bis-dimetilamino-difenilkarbinollal is. Említést tesznek még a cisztein nitrilo-triecsészav-vas(III)-kloriddal és az 1,10-fenantrolinnal lejátszódo reakcióiról, melyek ugyancsak alkalmasak a cisztein meghatározására.

Holz, Ellman módszerét tartotta legalkalmasabbnak a cisztein automatizált meghatározására. A ciszteint Cleland-módszere szerint DTE-vel vagy DTT-vel ciszteinné redukálta, a feleslegben lévő redukálószer pedig nátrium-arsenittel kötötte meg. A DTE-vel, valamint a DTT-vel való redukció és az Ellman-reagenssel történő meghatározás is tiol-diszulfid cserén alapszik, ezért a cisztein-, illetve ciszteinn meghatározási módszer specifikus, és más aminosavak nem zavarják. A cisztein-, valamint a ciszteinn meghatározás vázlatja az 5.14. ábrán látható.

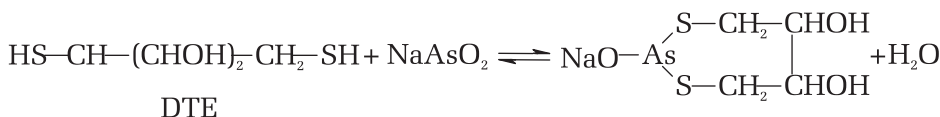
A vizsgálatok szerint a DTE és a DTT redukálóképessége azonosnak tekinthető, mivel a cisztein- és a ciszteinn-színintenzitások mindegyik vegyülettel azonosak voltak. A ciszteinn redukációjára 10–12 perc reakcióidőt javasolnak, bár néhányan a 30 perces időt tartják megfelelőnek. A ciszteinn tartalmú minták ciszteinn meghatározási eredményei redukálószer hozzáadása nélkül lényegesen alacsonyabbnak bizonyultak, mert a cisztein érzékeny az oxigénre, és a tárolás során részben ciszteinné oxidálódik. Redukálószer hozzáadása nélkül az oxidálódott cisztein nem vesz részt a reakcióban, így a meghatározás alacsonyabb ciszteinnértékhez vezet. Különbödo élelmiszerek, gabonák ciszteinn- és ciszteinn tartalmát meghatározva, a variációs koefficienseket 0,32%-nak találták, melynek

A cisztin redukciója:

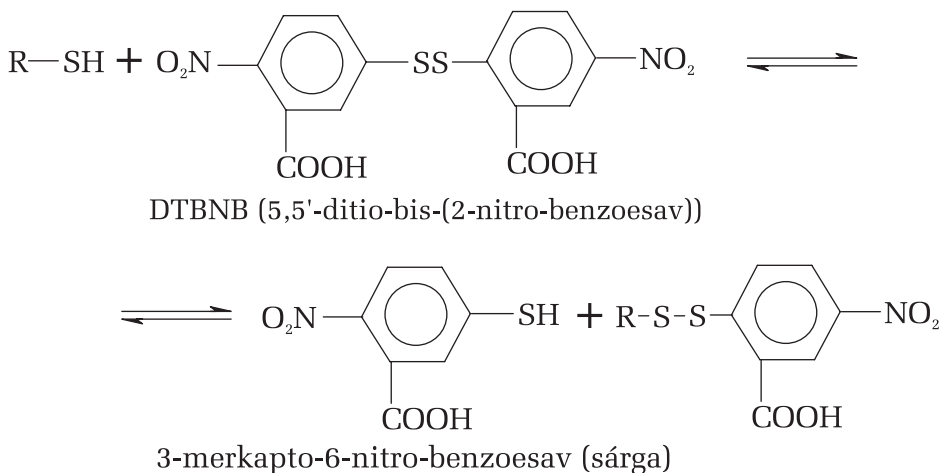


4,5-dihidroxi-o-dition

A feleslegben lévő redukálószer megkötése:



A cisztein meghatározása:

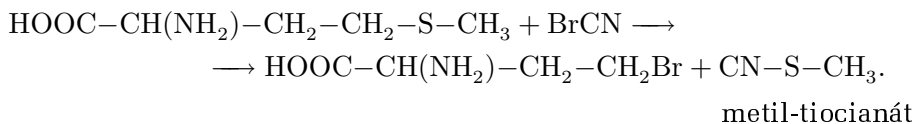


5.14. ábra. A cisztin-, illetve ciszteinmeghatározás vázlatja

alapján a fotometriás módszer alkalmas élelmiszerek cisztintartalmának nagy sorozatban történő meghatározására.

*A metionintartalom meghatározása gázkromatográfiával
brómciános hasítás után*

A metionin *szelektíven hidrolizálatlan mintából is meghatározható* a metionin tioéter csoportjának *brómciános hasítása után* felszabaduló metil-tiocianát gázkromatográfiás analízise után. A reakció az alábbiak szerint megy végbe:



A reakcióban csak a metioninnal ekvivalens *metil-tiocianát* keletkezik, mert a metionin oxidációs termékei a brómciánnal nem reagálnak.

A brómciános hasításhoz 2 cm³ térfogatú, jól zárható edénykébe 100 mg lisztfinomságú száraz mintát mérünk, majd 1 cm³ 70%-os 50 µg etil-tiocianátot tartalmazó hangyasavat és 2 mg brómciánt adunk hozzá. A reakcióelegyet vegyifülkében 105 °C-on egy óráig hőkezeljük, és ezt követően a minta kész a metil-tiocianát gázkromatográfiás mérésére. A metil- és az etil-tiocianát szétválasztását és meghatározását 2 m hosszú és 2 mm belső átmérőjű oszlopon Chromosorb W-AW töltettel, 8% dietilén-glikoladipát és 1% trimersav stacionárius fázissal választjuk szét, nitrogén gázáramban, lángionizációs detektálással. Hasonló módon állítjuk elő a 0,3–0,5 µmol tartományú metionin standardokat is.

A kromatogramon a feleslegben maradt brómcián csúcsát követi a metil-tiocianát, majd az etil-tiocianát belső standard. A metil-tiocianát és az etil-tiocianát alatti csúcsok területéből a metil-tiocianát mennyisége a következő összefüggés szerint számítható ki:

$$m_{\text{MetSCN}} = f \cdot m_{\text{EtSCN}} \frac{A_{\text{MetSCN}}}{A_{\text{EtSCN}}},$$

ahol:

m_{MetSCN} = a metil-tiocianát mennyisége (mol),

m_{EtSCN} = az etil-tiocianát mennyisége (mol),

A_{MetSCN} = a metil-tiocianát csúcs alatti területe,

A_{EtSCN} = az etil-tiocianát csúcs alatti területe,

f = a detektor relatív érzékenységből adódó arányossági faktor, amely standardok futtatása alapján számítható ki.

A módszer jól reprodukálható, a fehérjehordozók szokásos kísérőanyagai a brómciános hasítást nem zavarják. A metionin-szulfoxid és a metionin-szulfon a brómciánnal nem reagál, ezért a perhangyasavas oxidációt követő metionin-szulfon alakban aminosav-analizátorral meghatározott metionintartalomhoz képest ez a módszer kisebb eredményt produkál. Valójában ezzel *a módszerrel a hasznosítható metionintartalmat tudjuk meghatározni.*

5.9.5. Az aminosavak meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia elterjedése az 1960-as évek végén, a 70-es évek elején kezdődött. A módszer kidolgozása során megfelelő pumpával megvalósították a kolonnán magas nyomáson történő folyadékáramlást, a kolonnán kilépő komponensek detektálására pedig *rendkívül érzékeny detektorokat fejlesztettek ki.* Ezek segítségével a módszer alkalmassá vált a fehérjealkotó aminosavak szétválasztására és mennyiségi meghatározására. A kidolgozott módszerek többsége *fordított fázisú kromatográfiát* alkalmaz, melynek során a mozgó fázis polaritása nagyobb, mint az álló fázisé. A fordított fázisú kromatográfiában álló fázisként általában egy hidrofób, oktadecil- (C18) vagy oktil- (C8) csoportokkal borított töltetet, és poláris mozgó fázist használnak. Az aminosavak HPLC-s meghatározása során több módszert dolgoztak ki, melyek közös vonása az, hogy a *meghatározást általában egy származékképzési lépés előzi meg,* mely egyrészt javítja az aminosavak szeparációját, másrészt alkalmassá teszi az aminosav-származékokat az ultraibolya vagy fluoreszcens detektorral történő meghatározásra. (Köztudott, hogy az aminosavak közül csak a triptofán, a tirozin és a fenil-alanin mutat ultraibolya abszorpciót.) A szakirodalomban számos származékképző reagenst közöltek, melyek közül leggyakrabban az alábbiakat alkalmazzák: OPA (oftálaldehid), FMOC (9-flourenil-metil-klór-hangyasav-észter), DABS-Cl (4-dimetil-amino-azo-benzol-4'-szulfonil-klorid; dabzil-klorid), DNS-Cl (1-dimetil-amino-naftalin-5-szulfonil-klorid; danzil-klorid), DNFB (2,4-dinitro-fluor-benzol), PITC (fenil-izotiocianát).

Az aminosav-meghatározásokat általában gradiens elúcióval végzik, egyszerűbb problémák megoldására azonban az izokratikus elúció is alkalmazható. Az aminosavak HPLC-vel történő meghatározására az alábbi származékképzések terjedtek el a gyakorlatban.

Az ideális *oszlop előtti származékképző reagensnek* az alábbi követelményeknek kell megfelelni:

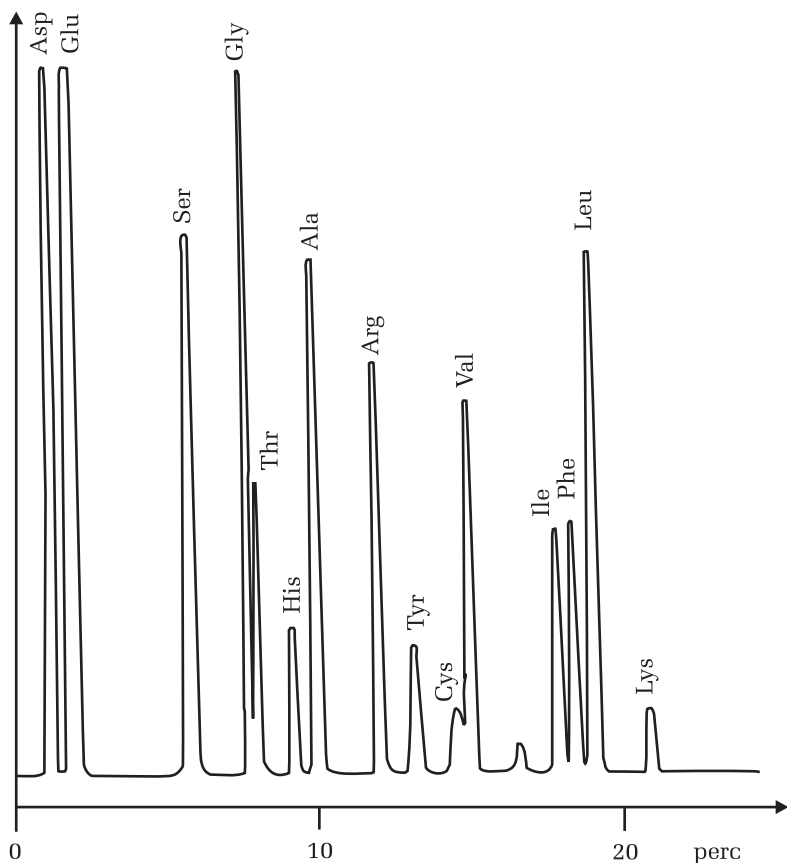
- Egyszerű reakciókörülmények között kvantitatív reakció.
- Kvantitatív reakció az összes fehérjeépítő aminosavval, beleértve az iminosavakat is.
- Stabil reakciótermékek.
- A származékok nagy fluoreszcenciás aktivitása vagy UV abszorpciója.
- A reagens feleslege és a melléktermékek jól szeparálódjanak az aminosav-származékoktól.
- A reagens tegye lehetővé a módszer könnyű automatizálhatóságát.

A származékképző reagensek nem minden esetben tudnak megfelelni ezeknek az optimális elvárásoknak, azonban kisebb-nagyobb hiánysággal mindegyik jól alkalmazható a maga területén.

A fehérjealkotó aminosavak meghatározása oszlop előtti származékképzéssel

Az o-ftálaldehiddel végzett származékképzés. Az OPA-val végzett származékképzés nagy előnye, hogy önmagában nem rendelkezik fluoreszcenciás aktivitással, az aminosavakkal képzett *származékainak* viszont *nagy a fluoreszcenciás aktivitása*, ennek következtében a módszer nem érzékeny a reagens feleslegére, nagy mennyiségű OPA mellett az aminosav-származékok tökéletesen analizálhatók. Néhány OPA-származék instabil, és a reakció hátránya még az is, hogy az iminosavak nem képeznek származékot az OPA-val. A származékok instabilitása csak akkor okoz problémát, ha nem rendelkezik a készülékünk automata származékképzési rendszerrel, ennek birtokában ugyanis, mivel a standard és a minta származékképzése ugyanazzal a módszerrel történik, az eredmények jól reprodukálhatók. A módszerrel a fehérjehidrolizátum 17 aminosavából 15 detektálható és jól mérhető, a módszer hibája viszont az, hogy a prolin (iminosav) nem képez származékot az OPA-val, a cistin OPA-származékának fluoreszcenciás jele pedig rendkívül alacsony

(5.15. ábra). A prolin esetében a módszer alkalmatlan annak meghatározására, a cisztinnél fennálló probléma pedig úgy oldható meg, hogy a származékképzés során a cisztin szulfhidril-csoportját jódecetsavval blokkolják, melynek következtében a származékképzés során egy erősen fluoreszcens izoindol-származék jön létre.



5.15. ábra. Az aminosavak szétválasztása OPA/merkpto-etanol oszlop előtti származékképzés után, HPLC-vel

A stabilitás növelése érdekében az OPA-reagenshez etil-merkaptánt, 2-merkpto-etanol-t vagy 3-merkpto-propionsavat adnak. Az így kapott származékok közül az OPA/merkpto-etanol esetében a legnagyobb a fluoreszcenciás jel. Az OPA/merkpto-propionsavat is jó származékképzőnek ítélik meg, mert a kapott aminosav-származékok mind UV, mind fluoreszcenciás detektálással jól mérhetőek. Összehasonlítva

az OPA/merkpto-etanol módszerrel kapott eredményeket az ioncserés oszlopkromatográfia során nyert adatokkal megállapították, hogy a két módszer közötti egyezés rendkívül jó. Az OPA/merkpto-etanol-módszerrel természetesen a prolint és a cisztint nem mérték, a többi aminosavat viszont két nagyságrenddel kisebb koncentrációban tudták analizálni. Mivel a módszer sokkal érzékenyebb az ioncserés oszlopkromatográfias meghatározásnál, ezért az *OPA/merkpto-etanol származékképzést* széles körben, *döntően, szabad aminosavak mérésére használták*. Meghatározták vele szövetek és plazmák, vér és vizelet, valamint különböző testnedvek aminosav-tartalmát. Alkalmazták természetes és ivóvizek oldott aminosavainak, kávék és teák aminosav-összetételének meghatározására, és széles körben elterjedt élelmiszerek aminosav-tartalmának analízisére is.

A módszer előnye, hogy:

- Az aminosavak és az OPA között a reakció már szobahőmérsékleten is igen gyors.
- Az OPA maga nem rendelkezik fluoreszcenciás aktivitással, ezért a reagens-felesleget nem kell eltávolítani, a származékot egy lépésben lehet létrehozni.
- A HPLC-s meghatározásnál gradiens elúcióval a származékokat könnyű szétválasztani.
- A triptofán is detektálható az OPA-módszerrel.
- Rendkívül nagy érzékenységgű, 0,1 pmol aminosav a módszerrel meghatározható.

A módszer hátránya, hogy:

- A prolin és a hidroxiprolin nem mérhető az OPA-val.
- Az OPA-reagens kevésbé stabil, és az OPA-származékok is instabilak, viszonylag gyorsan lebomlanak, ezért jó reprodukálhatóság csak automatizált rendszereknél képzelhető el.
- A cisztein és a cisztin OPA-származékának fluoreszcenciás jele nagyon alacsony, a fluoreszcenciás detektálás nem eléggé érzékeny ezekre az aminosavakra, mérésük azonban UV-detektálással 330 nm-en megoldható.

Származékképzés 9-fluorenil-metil-kloroformáttal (FMOC).

Einarsson és *mtsai*. 1983-ban publikálták az aminosavak 9-fluorenil-metil-kloroformát (FMOC) reagenssel történő származékképzését és a származékok fordított fázisú HPLC-s analízisét. Az aminosavak és a FMOC közötti reakció nagyon gyors, és az *iminosavak is származékot*

képeznek a reagenssel, sőt a cisztein FMOC-származéka is jól mérhető fluoreszcenciás jelet ad. A FMOC-származékképzés hátránya, hogy a reagens feleslegét kromatografálás előtt pentánnal történő extrakcióval el kell távolítani. Az extrakció megvalósítása nehézkessé teszi a módszert, és fennáll a lehetősége annak is, hogy az aminosav-származékok egy része a pentánnal extrahálódhat. A pentán helyett más extrahálószeret is javasolnak, azonban ezek nem javították lényegesen a módszer reprodukálhatóságát.

Az OPA és a FMOC együttes alkalmazása kiküszöböli a módszerek hibáit. Amennyiben nem vagyunk kíváncsiak a mintában lévő prolin-, hidroxiprolin- és cisztin-tartalomra célszerűbb a származékképzést OPA-val végezni, ha ezek az aminosavak is érdekelnek bennünket, jobb a FMOC-reagenst alkalmazni. Amennyiben a fluoreszcenciás jel gyenge, célszerű a detektálást sorba kötött fluoreszcenciás és UV-detektorral végezni.

Származékképzés dabzil-kloriddal (DABS-Cl). A dabzil-kloriddal végzett származékképzés rendkívül népszerű az aminosav-analitikában, mert az *aminosav-származékok* szobahőmérsékleten több mint egy hónapig *stabilak*, és a látható tartományban detektálhatók. A módszer előnye a rendkívül egyszerű származékképzési eljárás, a nagyon jó stabilitás, a reprodukálhatóság, a komplett folyadékkromatográfias szétválasztás minden aminosavra, és a látható tartományban történő detektálás. A dabzil-klorid mind az amino-, mind az iminosavakkal stabil származékot ad, az érzékenység alsó határa 1 pmólnál kisebb; néhányan a fmól tartományban adják meg értékeiket. A származék stabilitásából következik, hogy nem igényel automatikus származékképző és adagoló rendszert, a kézi származékképzés is jól reprodukálható eredményeket ad.

Származékképzés danzil-kloriddal (DNS-Cl). A danzil-klorid volt az első reagensek egyike, amelyeket oszlop előtti származékképzésre alkalmaztak az aminosavak szétválasztása és meghatározása során. Mind az amino-, mind az iminosavakkal reagál, melynek során *nagy fluoreszcenciás aktivitású danzil-aminosavak keletkeznek*, melyek könnyen és nagy érzékenységgel detektálhatók. A módszer hátránya, hogy a danzil-aminosav-származékok érzékenyek a fényre, ezért a reakció alatt, majd az analízis megkezdéséig a fénytől óvni kell őket. A reakció alatt és után a danzil-klorid folyamatosan hidrolizál danzil-szulfonsavvá, amely

zavarhatja a szétválasztást. Probléma az is, hogy a lizin, a hisztidin és a tirozin reakciója a danzil-kloriddal több reakcióterméket is eredményezhet, ami a módszer megbízhatóságát ezen aminosavak esetében megkérdőjelezheti.

Származékképzés fenil-izo-tiocianáttal (PITC). Az aminosavak fenil-izo-tiocianátos reakciójakor fenil-tiokarbamil- (PTC-) származékok jönnek létre, melyek sav hatására fenil-tiohidantoil- (PHT-) származékokká rendeződnek át. Mindkét származék alkalmas az aminosavak folyadékkromatográfiás szétválasztására és meghatározására, de többnyire a fenil-tiokarbamil-származékképzéssel dolgoznak, melynek során a detektálás az UV tartományban történik.

Az aminosavak HPLC-s meghatározására alkalmazott származékképzési módszerek összehasonlítása

Az előzőekben ismertetett öt módszer összehasonlítását a detektálás, az érzékenység, a származék stabilitása, a reakcióidő és az iminosavak mérhetősége szerint a következőképpen összegezhetjük.

- Fluoreszcens módszerrel detektálhatók az OPA, a FMOC és a DNS-Cl-származékok, ultraibolya tartományban a PITC-, a látható tartományban a DABS-Cl-származékok.
- Az OPA, a FMOC és a DNS-Cl módszerrel fmól, a DABS-Cl és a PITC módszerrel pmól tartományban lehet az aminosavakat mérni.
- A FMOC- és a DABS-Cl-származékok stabilitása kiváló, a PITC-é jó, az OPA-é és a DNS-Cl-é gyenge.
- Az OPA-val és a FMOC-kal történő reakció gyors, a PITC-vel közepes, a DABS-Cl-dal és a DNS-Cl-dal pedig lassú.
- Az OPA kivételével mindegyik módszer alkalmas a prolin, a hidroxiprolin és a cisztein mérésére.

5.9.6. A D- és L-aminosavak meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával

A korábbi elképzelések szerint élelmiszer-fehérjékben D-aminosavak nem, esetleg csak nyomokban fordulnak elő. Újabb vizsgálatok azonban kimutatták, hogy akár a mikrobiológiai romlás, akár a technológiai beavatkozás következtében egyes élelmiszerek fehérjetartalmában

jelentős lehet a D-aminosavak mennyisége, ezért meghatározásuk iránt az utóbbi időben egyre nagyobb az igény. A D- és az L-sztereoizomer aminosavakat a hagyományos módszerekkel (ioncserés oszlopkromatográfia, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia) nem lehet szétválasztani, mivel a sztereoizomer aminosavak minden fizikai és kémiai tulajdonságban – a poláros fény síkjának elforgatása kivételével – megegyeznek. Az aminosav-enantiomerek szétválasztására és meghatározására kezdetben a polarimetriát használták, mely módszert elsősorban tiszta aminosavak racemizációjának tanulmányozására alkalmazták. Enzimes technikákat is használtak a D- és L-aminosavak meghatározására, mely eljárásnak lényege a D- vagy L-aminosavak enzimes oxidációja, majd ezt követően a maradék aminosavak meghatározása. E módszereknek, mint általában az enzimes fehérjehidrolízis módszereknek hibája az, hogy nem használható a D-aminosavak nyomnyi mennyiségének meghatározására, és igen jelentős hibaforrás lehet az enzimekből származó L-aminosavakkal történő szennyezés is.

A minimális racemizációval járó fehérjehidrolízis

Élelmiszerekből vagy biológiai eredetű mintákból esetenként a szabad aminosavakat, a legtöbb esetben azonban a fehérjeláncban lévő aminosavakat kell meghatározni. Ez utóbbi esetben az előkészítés során a fehérje hidrolízise elengedhetetlen, hisz legyen szó bármilyen meghatározásról, az csak a szabad aminosavakkal tud dolgozni. Nagyon fontos annak ismerete, hogy *a fehérje hidrolízise során történik-e racemizáció*, hisz amennyiben igen, az a mérési eredményeket meghamisíthatja. (Ugyanilyen fontos, hogy a származékképzés során fellép-e racemizáció; ezt a problémát a módszerek tárgyalásakor kiemelten kezeljük.) Különböző tanulmányok beszámoltak arról, hogy *a racemizáció foka* a hidrolízis folyamán *függ a peptid, illetve fehérje típusától*, az aminosav környezetében jelenlévő *többi aminosavtól* és megállapították, hogy *a peptidkötésben lévő aminosavak* a szabad aminosavaknál *általában gyorsabban racemizálódnak*. L-glutaminsavat 6M sósavval 24 órán át refluxáltatva azt tapasztalták, hogy annak mintegy 3–5%-a átalakul D-glutaminsavvá, ló-mioglobint és marha-inzulint hidrolizálva pedig 4,6–6,6%-ban mértek D-glutaminsavat. *Manning és Moore* a szabad és peptidkötésben lévő aminosavak racemizációját vizsgálva megállapították, hogy néhány aminosavnál jelentős mértékben különbözik a savas hidrolízisnél (kezelésnél) mért racemizáció attól függően, hogy szabad

vagy peptidkötésben lévő aminosavról van-e szó, és attól függően is, hogy a peptidláncban milyen aminosavak között helyezkedik el a kérdéses aminosav. *Manning* egyértelműen leszögezi, hogy szabad L-aminosavat használva kontrollként nem lehet jelezni a fehérjehidrolízis során fellépő racemizáció fokát. Ennek ellenére a szabad aminosavak sósavas kezelését többen alkalmazták a fehérje hidrolízisének fellépő racemizáció becslésére. A szerzők többsége 0,1–3,7% közötti racemizációt állapított meg a különböző aminosavakra. Különböző szerzők által a szabad aminosavakra, illetve a fehérjében kötött aminosavakra kapott racemizáció értékeket az 5.7. és 5.8. táblázatban foglaltuk össze.

5.7. táblázat. *A szabad aminosavak racemizációjának mértéke a 6 mólosósavas hidrolízis folyamán (%)*

Hidrolízis- feltételek	Idő (óra)	Aminosavak											
		Ser	Ala	Arg	Val	Leu	Ile	Glu	Phe	Pro	Asp	Lys	Met
Reflux ¹	6	–	22	–	19	5	–	–	–	–	–	–	–
105 °C ²	24	–	1,1	–	0,3	1,3	0,5	–	–	–	–	–	–
120 °C ²	24	–	3,7	–	0,6	2,1	1,4	–	–	–	–	–	–
110 °C ³	24	–	0,5	–	0,2	0,8	0,3	1,9	0,1	1,7	1,7	–	–
110 °C ⁴	22	0,4	–	1,6	–	–	–	–	1,4	2,2	–	–	–
110 °C ⁴	18	0,5	–	–	–	–	–	3,3	–	–	3,7	–	–
110 °C ⁵	22	0,4	1,0	1,6	0,7	1,3	1,0	–	–	2,2	–	3,0	2,2

¹ *Aldag és mtsai.*, 1971.

² *Nakaparksin és mtsai.*, 1970.

³ *Hare és Hoering*, 1973.

⁴ *Manning és Moore*, 1968.

⁵ *Manning*, 1970.

Az aminosavak racemizációjának mechanizmusa

Összegezzük röviden azokat a reakciókat, melyek az aminosavak racemizációja során lejátszódnak, hisz csak ezek ismeretében lehet megismerni azokat a hibaforrásokat, melyek egy korrekt mérési technika kialakításakor korrigálásra szorulnak.

5.8. táblázat. A peptidkötésben lévő aminosavak racemizációjának mértéke a 6 mólos sósavas hidrolízis folyamán (%)

A fehérje megne- vezése	Hidrolízis- feltételek		Aminosavak									
	Hőmér- séklet (°C)	Idő (óra)	Ala	Glu	Val	Ile	Leu	Pro	Arg	Phe	Asp	Ser
Bradikinin ¹	110	22	-	-	-	-	-	2,4	1,7	3,9	-	-
Ribo- nukleáz ¹	110	18	-	4,2	-	-	-	-	-	-	4,4	0,2
Mamut- kollagén ²	105	24	1,2	2,7	0,7	-	1,6	-	-	2,6*	3,0	-
Ló- mioglobin ³	Reflux	24	-	6,6	-	-	-	-	-	-	-	-
Marha- mioglobin ³	Reflux	24	-	4,6	-	-	-	-	-	-	-	-

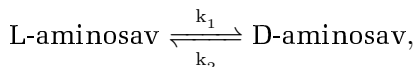
* 48 óra

¹ Manning és Moore, 1968.

² Dungworth és mtsai., 1976.

³ Wiltshire, 1973.

Az aminosavak racemizációját általánosságban az alábbiak szerint lehet leírni:



ahol: k_1 és k_2 az odaalakulás és visszaalakulás reakciósebességi állandója, melyből az egyensúlyi állandó: $K=k_1/k_2$.

A reakció sebessége az alábbi egyenlettel írható le:

$$-\frac{d[L]}{dt} = k_1[L] - k_2[D],$$

ahol: [L] és [D] az L- és D-enantiomer megfelelő koncentrációja. Az egyenletet integrálva a következőket kapjuk:

$$\ln \left(\frac{1 + [D]/[L]}{1 - K'[D]/[L]} \right) = (1 + K') \cdot k_1 t + C,$$

ahol: $K' = 1/K = k_2/k_1$. Az integrációs konstans, amennyiben nincs jelen D-enantiomer, egyenlő a nullával, máskülönben:

$$C = \ln \left(\frac{1 + [D_0]/[L_0]}{1 - K'[D_0]/[L_0]} \right),$$

ahol: $[D_0]$ és $[L_0]$ a D- és L-enantiomer kezdeti koncentrációja.

Egy kísérletben a szarvasmarhacsont D/L aszparaginsav arányára (racemizáció a hidrolízis és a feldolgozás folyamán) 0,07-et kaptak, amelyből a számolt C-érték $t = 0$ időpontra 0,14. Szabad aminosavaknál vizes oldatban az oda- és visszaalakulás sebessége egyenlő, ezért az előző reakcióegyenlet az alábbiak szerint egyszerűsíthető:

$$\ln \left(\frac{1 + [D]/[L]}{1 - [D]/[L]} \right) = 2 \cdot k \cdot t + C.$$

A racemizációs reakció igen jellemző és jól használható paramétere definíció szerint az az idő, amikor 25% D-enantiomer és 75% L-enantiomer van jelen a mintában. A *felezési időre* (τ), a racemizáció sebességére levezetett egyenletből az alábbi összefüggés adódik:

$$\tau = \frac{\ln 2}{k_1 + k_2} \quad \text{vagy} \quad \tau = \frac{\ln 2}{(1 + K') \cdot k_1}.$$

A kérdéses aminosav D/L aránya a felezési időnél az alábbi egyenlettel adható meg:

$$(D/L)_\tau = \frac{K}{K + 2}.$$

A $k_1 = k_2$ feltétel az izoleucinra nem igaz, ugyanis az L-izoleucinnak mind az α -, mind a β -szénatomján van egy-egy aszimmetriacentruma. A lejátszódó racemizáció, illetve a diasztereomerek esetében az epimerizáció csak az α -szénre hat, a β -szénatomon nem figyeltek meg racemizációt. Az *epimerizációs egyensúlyban* az L-izoleucin reakciósebességének állandója (k_1) nagyobb, mint a visszaalakulása (k_2), így az egyensúlyi állandó (K) nagyobb 1-nél. A különböző szerzők K-ra 1,0–1,4 közötti értékeket adnak meg, de hogy elkerüljék az ebből adódó hibákat, minden kísérletben ajánlatos a K_{1le} -ra adódó értékeket meghatározni. Annak ellenére, hogy az egy aszimmetriacentrummal rendelkező aminosavakra többen bizonyították a $k_1 = k_2$ feltevést, mások felvetették, hogy az *oda- és visszaalakulás sebessége a fehérjeláncban kötött aminosavaknál egészen különböző lehet*. Feltételezések szerint a D- és L-enantiomerek

között egy bizonyos környezetben a szterikus egymásra hatásban lényeges különbségek lehetnek, amelyek az oda- és visszaalakulás sebességét befolyásolhatják. A kísérletek azt bizonyítják, hogy *legkönnyebben azok az aminosavak racemizálódnak, melyek aromás oldalláncot* (tirozin, fenil-alanin) *vagy indol- és imidazil-csoportot* (triptofán, hisztidin) *tartalmaznak*, és legnehezebb racemizációra bírni az apoláros oldalláncot tartalmazó valint, izoleucint és leucint. Az aminosavak báziskatalizálta reakciójára a következő mechanizmus látszik a legkézenfekvőbbnek: első lépésként az α -helyzetű protont egy bázis elvonja, és a tetraédres konfigurációból egy planáris szerkezetű karbanion jön létre, mely a továbbiakban egy proton felvételével stabilizálódik. Bármilyen helyettesítés a karboxilcsoporton fokozza a racemizációt, mivel ez megkönnyíti az α -helyzetű proton leszakadását, és hasonló hatás érhető el akkor is, ha a β -helyzetű szénatomhoz egy elektronegatív szubsztituenst kapcsolunk. Az α -helyzetű protonelvonást és rekombinálódást az α -helyzetbe beépült trícium mérésével is bizonyították. Többen egyértelműen leszögezték, hogy a relatív racemizációs arányt egy fehérjében több tényező (szterikus, szomszéd-, oldószerhatás) együttes figyelembevételével lehet csak becsülni.

Bizonyítást nyert az is, miszerint a peptidkötésben lévő aminosavak racemizációja lényegesen gyorsabb mind a sav, mind a bázis által katalizált reakciókban, mint a szabad aminosavaknál. Ebből az is következik, hogy a dipeptidben lévő aminosavak gyorsabban racemizálódnak, mint a szabad aminosavak, és a növekvő racemizációs sebesség a peptidlánc hosszának növekedésével még tovább növekszik. Egyesek szerint az is bonyolítja a kérdést, hogy a fehérje hidrolízise során szabaddá vált *aminosavak racemizációját a nyomnyi mennyiségben jelenlévő nehézfémionok katalizálják*, tehát nyilvánvaló, hogy az aminosavak racemizációja egy olyan összetett mátrixban, mint amilyen egy élelmiszer, igen bonyolult, összetett folyamat. Ebből következik az is, hogy a szabad aminosavak, a peptidok és a fehérjék más-más arányú racemizáción mennek keresztül, és a három frakció közül a fehérjék racemizációja a legjobban nyomon követhető, hiszen a fémek általi katalízisre kevésbé hajlamosak. A szabad aminosavak racemizációját elsősorban a pH és a fémionok befolyásolják, de jelentős hatással lehet arra az ionerősség is, hiszen növekvő ionerősség hatására a racemizáció nő.

Az előzőeket értékelve leszögezhető, hogy *más a racemizáció a szabad, a peptidben vagy a fehérjében kötött aminosavaknál*, és e három reakciónál a racemizációt a különböző környezeti hatások is másként

befolyásolják. Az a tény, hogy lúgos körülmények között a racemizációs folyamatok felgyorsulnak, felhívja a figyelmet arra, hogy a technológia során mindennemű lúgos kezelést lehetőleg el kell hagyni.

A fehérjehidrolízis és a racemizáció

Az utóbbi időben többen kísérleteztek a mikrohullámú technológia alkalmazásával a fehérje hidrolízise során, és többen beszámoltak a rövid ideig magas hőmérsékleten végzett hidrolízissel kapott kiváló eredményekről is. Úgy tűnik, hogy a *mikrohullámmal végzett hidrolízis folyamán jelentős mértékű racemizáció lép fel*, hisz a mikrohullámú kezelést szerves oldószerekben az aminosav-racemizáció kiváltására is használták. A racemizáció nem okoz gondot akkor, ha az aminosav-enantiomereket nem akarjuk meghatározni, hanem megelégszünk az összes aminosav-tartalom mérésével. Amennyiben azonban az aminosav-enantiomerek meghatározása is célunk, olyan fehérjehidrolízis módszert kell választani, amelynek során *nincs vagy minimális a racemizáció*, hisz a hidrolízis alatt fellépő számottevő racemizáció esetén nem tudjuk eldönteni, hogy az aminosav-enantiomerek egy része eredetileg is benne volt-e a mintában, vagy csak a hidrolízis folyamán keletkezett. Több módszert is kidolgoztak a fehérjehidrolízis során bekövetkezett racemizáció visszaszorítására, ezek a módszerek azonban meglehetősen hosszadalmasak, illetve nehézkesek voltak. Fentiek miatt *Csapó* és *mtsai.* egy magas hőmérsékleten, rövid ideig végzett fehérjehidrolízis módszert dolgoztak ki a lehető legkisebb racemizáció elérésére a hidrolízis folyamán.

Minimális racemizációval járó, rövid ideig, magas hőmérsékleten végzett fehérjehidrolízis

A fehérjék hidrolízisére, valamint a szabad aminosavak kezelésére Pyrex újrafelhasználható hidrolíziscsőket használtak, melyekbe 8 cm³ 6M HCl-at lehetett betölteni anélkül, hogy a hidrolizáló ágens elérte volna a teflon zárócsavart. 1 mg fehérjét, szabad aminosavat vagy 20 mg zsírtalanított tejport mértek a hidrolíziscsőbe, melyeket előzetesen sósavval, illetve kétszer desztillált vízzel kimostak. 1 cm³ 6M HCl-at adtak a mintához, és egy üvegkapilláris segítségével 5 percen át nitrogén buborékoltattak át a rendszeren. A nitrogénnel történő átbuborékoltatás után a hidrolíziscsőket azonnal lezárták, majd a hidrolízist 160, 170,

és 180 °C-on, 15, 30, 45, 60 és 90 percre végezték. Minden sorozatban egy-egy mintát 110 °C-on, 24 órán át hidrolizáltak 6M sósavval *Moore* és *Stein* leírása szerint, egyet pedig 110 °C-on 48 órán át bárium-hidroxiddal, ahogy azt élelmiszerek triptofántartalmának rutinmeghatározásánál tették. A hidrolízis után a csöveket szobahőmérsékletűre hűtötték, a sósavat liofilezéssel eltávolították, majd a maradékot 0,01M HCl-ban oldották fel. A bárium-hidroxidos hidrolízis után a hidrolizátumot 1M sósavval neutralizálták, a báriumot pedig szulfát formájában távolították el a rendszerből. A neutralizálás alatt a rendszer hőmérsékletét só-jég hűtőkeverék segítségével 30 °C alatt tartották, ezt követően a hidrolizátumot szűrték és -25 °C-on tárolták a D- és az L-aminosavak meghatározásáig.

A fehérjehidrolízis során előforduló racemizáció tesztelésére a következő anyagokat használták fel: szarvasmarha *ribonukleáz*, *lizozim* és *citokróm-c*, szabad L-aszparaginsav, L-glutaminsav, L-treonin, L-alanin, L-valin, L-fenil-alanin, L-hisztidin, L-triptofán és zsírtalanított tejpor. A fehérjéket és a szabad aminosavakat különböző hőmérsékleteken, különböző ideig kezelték 6M sósavval és az OPA/TATG származékképzést követően határozták meg a D- és L-enantiomereket nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával. Megállapították, hogy mind a hagyományos hidrolízisnél (6M HCl, 24 h, 110 °C), mind a rövid ideig magas hőmérsékleten végzett hidrolízisnél a triptofán teljesen elbomlik. A vizsgált aminosavak közül mind a hagyományos, mind a rövid ideig tartó hidrolízisnél az aszparaginsavnál a legnagyobb a racemizáció mértéke, melyet csökkenő sorrendben követ a glutaminsav, a treonin, a fenil-alanin, az alanin, a valin és a hisztidin. Amennyiben a 160 °C-on végzett hidrolíziseket hasonlítják össze, megállapítható, hogy a hidrolízis idejének növekedésével nő a racemizáció, tehát minden vizsgált aminosavnál a legkisebb racemizációt a 15 perces hidrolízisnél kapták. A hidrolízis idejét 15 percről 90 percre növelve a racemizáció az aszparaginsav esetében 1,15%-ról 2,42%-ra, glutaminsavnál 1,05%-ról 1,87%-ra, treoninnál 1,00%-ról 1,37%-ra, alaninnál 1,07%-ról 1,13%-ra, valinnál 0,81%-ról 1,17%-ra, fenil-alaninnál 1,42%-ról 2,32%-ra, hisztidinnél 0,61%-ról 1,07%-ra nő. Korábbi vizsgálataik szerint a 160 °C-on végzett fehérjehidrolízis esetén 15–45 perc elégtelen a fehérje teljes hidrolíziséhez, különösen a valin, az izoleucin és a leucin melletti kötések hasításához, ezért a 160 °C-on végzett hidrolízisnél csak a 60, illetve 90 perces időtartamnak van gyakorlati jelentősége. Ha a 60, illetve 90 percen át végzett hidrolízis utáni racemizációt hasonlítják a hagyományos hidrolízissel

kapotthoz megállapítható, hogy a hagyományos módszerrel a racemizáció mintegy másfél-két és félszerese a 160 °C-on rövid ideig végzett hidrolízisének.

170 °C-on végezve a hidrolízist az már 45 perc után is teljesnek tekinthető, 60 perc után pedig még az igen nehezen bontható valin melletti kötések is felhasadnak, 180 °C-os hidrolízisnél 30–45 perc is elegendő a tökéletes hidrolízishez. Fentiek miatt a 170 °C-on végzett hidrolízis esetében 45–60 percig, a 180 °C-os hidrolízisnél pedig a 30–45 percig végzett hidrolízis után kapott racemizáció mértékét célszerű a hagyományos módszerrel kapott racemizációval összehasonlítani. Ez esetben megállapítható, hogy a 160 °C-on 60–90 percig végzett fehérjehidrolízis hasonló mértékű racemizációt okoz, mintha a hidrolízist 170 °C-on 45–60 percig végezték volna. A 180 °C-on 45 percig végzett hidrolízis mintegy másfélszer nagyobb racemizációt eredményezett az alacsonyabb hőmérsékleteken, a teljes hasításhoz szükséges ideig végzett hidrolízishez hasonlítva. Növekvő hőmérséklettel és növekvő idővel nő a racemizáció mértéke, de mindhárom hőmérsékleten a peptidkötés teljes hidrolíziséhez szükséges ideig végzett hidrolízis csak mintegy 40%-os racemizációt okoz a hagyományos módon végzett hidrolízishez képest.

A *ribonukleázzal* elvégzett kísérletek után a *lizozimot*, a *citokróm-c-t* és a tejpport a hagyományos módszerrel, és 160 °C-on 60 percig, 170 °C-on 45 és 60 percig, 180 °C-on 45 percig hidrolizálták, és egymáshoz hasonlították a különböző hidrolíziskörülmények között kapott racemizáció nagyságát. Ezeket az idő–hőmérséklet kombinációkat azért választották, mert ezek minden aminosavnál teljes mértékű hidrolízist eredményeztek. Megállapították, hogy a *lizozim* és a *citokróm-c* esetében kapott racemizáció azonos hőmérsékleten megegyezik a *ribonukleáz* esetében kapott értékekkel, míg a tejpornál a három tiszta fehérjéhez viszonyítva minden hőmérséklet–idő kombináció esetén 15–25%-kal nagyobb racemizációt kaptak. A nagyobb racemizáció talán a tejpór ásványianyagtartalmával magyarázható, hiszen a nikkel kivételével az aminosavak racemizációját szinte mindegyik nehézfém gyorsítja. A tejpornál a hagyományos módon is elvégezve a hidrolízist, a tiszta fehérjéhez viszonyítva nagyobb racemizációt kaptak.

A szakirodalmi adatok szerint a szabad aminosavak racemizációja lassúbb a peptidkötésben lévőkhöz képest. Hogy eldöntsék van-e különbség a szabad és peptidkötésben lévő aminosavak racemizációja

között, a szabad aminosavakat külön-külön 6M sósavval kezelték, különböző hőmérséklet–idő kombinációban. Megállapították, hogy mind a hőmérséklet, mind a hidrolízisidő növelésével nő a racemizáció. A magas hőmérsékleten rövid ideig tartó hidrolízis hatását összehasonlítva a hagyományos módszerével megállapították, hogy a tökéletes fehérjehidrolízisnek megfelelő körülmények között a magas hőmérsékletű kezelés 60–70%-kal kisebb racemizációt eredményez a hagyományos hidrolízis-körülményekhez képest. Még a 180 °C-on 45 percig kezelt minta esetében is csak 30%-os racemizációt kaptak az aminosavak többségére a hagyományos módon kezelthez képest. Amennyiben a szabad és a peptidkötésben lévő aminosavak racemizációját hasonlítják össze, akkor megállapítható, hogy a peptidkötésben lévő aminosavak mintegy 4–6-szor gyorsabban racemizálódnak a szabad aminosavakhoz viszonyítva, mind a hagyományos módszerrel, mind a magas hőmérsékleten rövid ideig végzett fehérjehidrolízis körülményei között.

A triptofán gyakorlatilag teljes mértékben elbomlik a 6M sósavas hidrolízis folyamán. Ha meg akarják határozni a racemizáció mértékét a triptofán esetében, akkor olyan hidrolízismódszerhez kell folyamodni, melynek során a triptofán nem bomlik el. Mivel már hosszabb idő óta alkalmazták a fehérje triptofántartalmának meghatározására a bárium-hidroxidos fehérjehidrolízist, vizsgálták, hogy milyen racemizáció lép fel az eljárás során. Elvégezték mind a tiszta fehérjék (*ribonukleáz*, *lizozim*, *citokróm-c*), mind a tejpor és a szabad aminosavak hidrolízisét 4M bárium-hidroxiddal. Megállapították, hogy az összes vizsgált anyag esetében, beleértve a szabad aminosavakat is, az összes aminosav teljes mértékben racemizálódott, tehát a mintákból minden aminosav esetében 50% L- és 50% D-enantiomert tudtak kimutatni. Fentiek miatt a bárium-hidroxidos hidrolízis nem alkalmazható a fehérje triptofántartalma racemizációjának mérésére.

Összefoglalva vizsgálataikat a hagyományos és a magas hőmérsékleten rövid ideig végzett fehérjehidrolízis hatásáról az aminosavak racemizációjára, megállapították, hogy:

- A szabad aminosavak racemizációja lényegesen lassúbb a peptidláncban kötött aminosavakéhoz viszonyítva; ugyanolyan körülmények között a szabad aminosavaknál előforduló racemizáció csak mintegy 20–40%-a a peptidkötésben lévőkéhez képest.
- Hagyományos módszerrel végezve a fehérje hidrolízisét, 1,5–2,5-szer nagyobb a racemizáció, mint magas hőmérsékleten (160–180 °C) a fehérje tökéletes hidrolízisét eredményező körülmények

után. Ez a lényegesen alacsonyabb racemizáció azzal magyarázható, hogy magas hőmérsékleten a fehérje gyorsabban hidrolizál szabad aminosavakra, és a szabad aminosavak racemizációja lényegesen lassúbb, mint a fehérjeláncban kötötteké. Alacsony hőmérsékleten, hosszabb ideig végzett hidrolízisnél a peptidláncban kötött aminosavakat hosszabb ideig érik a racemizációt kiváltó hatások, tehát minden olyan hatás, amely meggyorsítja a hidrolízist, csökkenti a racemizációt.

- Tejpor esetében a racemizáció nagyobb volt, melyet a jelenlévő nehézfémek racemizációt katalizáló hatásával lehet magyarázni.
- 48 óra alatt, 110 °C-on, 4M bárium-hidroxid hatására az összes (szabad vagy peptidláncban kötött) aminosav teljes mértékben racemizálódott. Bárium-hidroxidos fehérjehidrolízissel tehát a tripotfán racemizációját nem lehet meghatározni.
- A magas hőmérsékleten, rövid ideig (160 °C-on 60–90 perc; 170 °C-on 45–60 perc és 180 °C-on 30 perc) tartó hidrolízist javasolják mindazoknak, akik nem akarnak enzimes hidrolízist alkalmazni, és szeretnék a fehérjeláncban bekövetkezett racemizáció mértékét meghatározni.

A D- és az L-aminosavak elválasztására és meghatározására kifejlesztett módszerek

Az optikailag aktív (királis) aminosavak reakciója királis reagensekkel *diasztereomer vegyületeket* eredményez, melyek nem királis oszlopon is szétválaszthatók. Amennyiben a királis reagens egy másik aminosav, akkor diasztereomer dipeptidok keletkezhetnek, melyek elválasztása ioncserés oszlopkromatográfiával is megoldható. Az eljárás lényege egy L-aminosav-N-karboxi-anhidridnek vagy valamelyik aminosav aktív észterének a vizsgálandó D- és L-aminosavakkal lejátszódó reakciója, melynek során *diasztereomer dipeptidok* keletkezhetnek, melyek *az ioncserés szétválasztásra alkalmasak*. Így pl. rutinszerűen analizáltak L- és D-aszparaginsavat L-Leu-D-Asp és L-Leu-L-Asp diasztereomer dipeptid formában.

A D- és L-aminosavak szétválasztására a nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfia mellett az egyik legjobb módszer a gázkromatográfia. Az enantiomereket szét lehet választani egy megfelelő aszimmetriás reagenssel létrehozott diasztereomer pár formában, vagy az illékonyá tett származékokat egy optikailag aktív, álló fázison kell szeparálni. *Charles*

és mtsai. az n-trifluoracetyl-(±)-2-n-alkoholokat használták a diasztereomerek képzésére, és ezt a módszert tökéletesítették *Pollack* és mtsai., akik a származékképzéshez (+)-2-n-butanolt használtak. A gázkromatográfiában elsőként alkalmazott optikailag aktív állófázis az n-trifluoracetyl-L-izoleucil-lauril-észter volt, majd ezt követően az N-lauril-L-valil-tercier-butilamidot alkalmazták és találták nagyon hatékonynak az optikai izomerek szétválasztására. A gázkromatográfiás technikát ma már olyan tökéletesre fejlesztették, hogy az enantiomerek meghatározásának hibája kisebb, mint 5%, és a reprodukálhatóság is rendkívül jó. A módszerekről a következő fejezetben részletesen lesz szó.

Újabb az enantiomerek szétválasztására és meghatározására egyre inkább teret nyer – az előzőekben említett módszerek rovására – a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia. *Weinstein* és *Weiner* az aminosavakból az 5-dimetil-aminonaftalin-1-szulfonil fluoreszkáló származékokat képezték, és fordított fázisú folyadékkromatográfiával az N,N'-di-n-propil-L-alanin (L-DPA) és réz-acetát királis töltet alkalmazásával az összes fehérjealkotó aminosav D- és L-enantiomerjét szét tudták választani. A módszer érzékeny és gyors, aminosav-enantiomerek meghatározására kiválóan alkalmas. Biológiailag aktív anyagok optikai tisztaságának ellenőrzése *Knabe*, valamint *Gübitz* és mtsai. egy direkt módszert dolgoztak ki nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával, melynek lényege a kémiaileg kötött L-hidroxi-prolin-Cu²⁺ királis oszlop és Cu²⁺-tartalmú mozgó fázis. Ezen álló és mozgó fázis alkalmazásával lehetőség van mindazon vegyületek optikai tisztaságának ellenőrzésére, amelyek kelátkomplexeket képeznek a Cu²⁺-ionokkal, mint amilyenek pl. az aminosavak. A módszer hibája, hogy egyszerre csak egy aminosav D- és L-változatát lehet vele meghatározni.

Marfey ugyancsak nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszert fejlesztett ki az aminosav-enantiomerek szétválasztására. Az 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-alanin-amid segítségével, mely egy igen reakcióképes fluoratomot tartalmaz, D- és L-aminosavak keverékéből diasztereomer származékokat hozott létre. Ezeket a származékokat HPLC-vel trietil-aminfoszfát és acetonitril eluensek megfelelő gradienseinek alkalmazásával igen jó eredménnyel szét tudta választani, és mennyiségileg meg tudta határozni. Közleményében a D- és L-aszparaginsav, -glutaminsav, -metionin, -alanin és -fenil-alanin elegyének szétválasztását közli, de a feltételek megfelelő megváltoztatásával lehetőség van a többi aminosav-enantiomer szétválasztására is.

Az aminosav-enantiomerek mennyiségi meghatározásához nem elég csak az enantiomereket egymástól elválasztani, ügyelni kell arra is, hogy az enantiomerek a többi aminosavtól, vagy azok származékaitól is jól elkülönüljenek. Ezen túl a megfelelő érzékenység elérésére kis mennyiségben is jól detektálható aminosav-származékot kell képezni. Az utóbbi időben erre a célra széleskörűen a *fluoreszcens reagensekkel történő oszlop előtti származékképzést* és a származékok fordított fázisú kromatográfiáját alkalmazták. E módszereknél a kimutathatóság határa a meghatározni kívánt aminosavaknál igen kicsi, és az analitikai rendszer flexibilitása is rendkívüli előnyöket rejt magában. A királis reagensekkel történő származékképzés után lehetőség van a fehérjeépítő aminosavak enantiomerjeinek szétválasztására és meghatározására RP-HPLC-vel. Mivel a kromatográfias elválasztás általában 50–70 percet vesz igénybe, nagyon fontos, hogy a kidolgozott analitikai módszer teljesen automatikus legyen. Előfeltétel még az egyszerű származékképzési reakció, mely szobahőmérsékleten rövid idő alatt végbemegy.

A *királis tiolok* használatára az aminosav-enantiomerek szétválasztásánál *Aswad* tette az első javaslatot, aki az OPA-t és az *N-acetil-L-ciszteint* (NAC) alkalmazta a D- és L-aszparaginsav szétválasztására. A származékok szétválaszthatók réz-prolin rendszerben is, melynek során azok a rézzel komplexeket képeznek. A NAC mellett alkalmazták még a terciér-butil-oxi-karbonil-L-ciszteint is származékképzésre. *Nimura* és *mtsai.* a királis *2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glükopiranozil-izocianátot* (GITC) alkalmazták a D- és L-aminosavak szétválasztására. Igen jó elválasztást kaptak az RP-HPLC-s szétválasztás során, mely lehetővé tette a fehérjeépítő aminosav-enantiomerek egy lépésben történő szétválasztását és meghatározását. *Einarsson* és *mtsai.* a GITC kereskedelmi forgalomban kapható tiol-analógiát, a *2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio- β -D-glükopiranozidot* (TATG) alkalmazták az OPA-val történő reakcióban az aminosavak oszlop előtti származékképzésére. A kísérletük célja az volt, hogy olyan diasztereomereket szintetizáljanak, amelyek mind fluoreszcens detektorral, mind elektrokémiaailag könnyen szétválaszthatók és detektálhatók.

Einarsson a királis *1-(9-fluorenil)-etil-kloroformátot* (FLEC) használta az aminosav-enantiomerek szétválasztására, illetve meghatározására. Ez a módszer azzal az előnnyel jár, hogy nemcsak az α -aminosavakkal, de az iminosavakkal is stabil származékot képez, ezért segítségével mind az imino-, mind az aminosavak meghatározhatók, sőt lehetőség van az iminosavak szelektív származékképzésére, és a nagy mennyiségben

jelenlévő aminosavak mellett az igen kis mennyiségű iminosavak kimutatására is.

Az enantiomerek szétválasztása és meghatározása során külön említést érdemelnek a hidroxiprolin, a treonin és az izoleucin, amelyek két aszimmetriacentrummal rendelkeznek. Ezek közül gyakorlati jelentőséggel az izoleucin átalakulása bír, melynek során D-allo-izoleucin keletkezik, amely mint az izoleucin diasztereomere, a rutinszerűen alkalmazott ioncserés oszlopkromatográfiás aminosav-eltávolítás során az izoleucin és a metionin között jelenik meg a kromatogramon, azoktól jól elváló és értékelhető csúcsot adva.

Az előzőekben említett módszerek közül az *Einarsson* és *mtsai.* által publikált fluorenil-etil-kloroformátos (FLEC) és az orto-ftáldaldehyd és a 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio- β -D-glükopiranozidos (OPA/TATG) módszert alkalmaztuk a gyakorlatban (*Csapó* és *mtsai.*), és használtuk több ezer élelmiszer D- és L-aminosav-tartalmának meghatározására. Mivel e két módszerről rendkívül sok és jó tapasztalatunk gyűlt össze, ezért a következőkben e két módszer leírását, ezt követően pedig összehasonlítását közöljük.

*Az aminosav-enantiomerek szétválasztása és meghatározása
1-(9-fluorenil)-etil-kloroformáttal (FLEC) történő
származékképzés után RP-HPLC-vel*

A származékképzést és az analízist egy MERCK-Hitachi LaChrom HPLC-vel végeztük, amely a következő modulokból állt: L-7250 programozható származékképző és mintaadagoló egység, L-7100 pumpa, L-7350 oszloptermosztát, L-7480 fluoreszcens detektor. A modulok szabályozására és a mérési adatok gyűjtésére és kiértékelésére D-7000 HPLC System-Manager-Softvert használtunk. A fluoreszcens detektornál a gerjesztési és az emissziós hullámhossz 260 és 315 nm volt. A vegyszereket a Sigma, a Merck, a Fluca és a Rathburn cégtől vásároltuk, illetve kaptuk. A vegyszerek analitikailag legtisztábbak, a gradienshez szükséges oldószerek pedig mind HPLC minőségűek voltak.

A származékképzés. Az α -aminosavak és az iminosavak származékképzése során a reakciót és az extrakciós lépéseket 190 μ l-es mikrofilóban végeztük, melyet egy teflonmembránnal ellátott, csavaros tetejű üvegcsébe helyeztünk. Az automatikus mintaadagolót úgy programoztuk, hogy keverjen össze 25 μ l pufferben (0,2M borátpuffer, pH=9,0)

oldott mintát 25 μl FLEC-reagenssel (5 mmol acetonban) a mikrofilóban. Ezt követően a reakcióelegyet többször összekevertük, majd 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. A reakció lejátszódása után 60 μl extrakciós elegyet (pentán:etil-acetát = 85:15) adtunk hozzá, hatszor összekevertük, 10 percig állni hagytuk, majd az alsó fázisból a HPLC oszlopára, az enantiomerek analízisére betápláltuk. Minden mintabeteplálást megelőzően és követően a rendszert aceton:víz = 85:15 arányú elegyével hatszor átmostuk.

Az *iminosavak szelektív származékképzése* során 80 μl 9,5-es pH-jú, 0,1M borátpufferben oldott mintához hozzáadtunk 8 μl OPA reagenst (50 mg OPA és 25 μl merkapto-etanol 1 cm^3 acetonitrilben), 8 μl jód-acetátot (1M, 0,1M NaOH-ban) és 24 μl FLEC-reagenst (5 mmol acetonban). Minden reagens hozzáadása után a reakcióelegyet összekevertük és az adagolótűt ötször átmostuk. A reakcióidő az OPA és a jód-acetát esetében 4,5 perc, a FLEC-reagens esetében pedig 7 perc volt. Ezt követően a reakcióelegyet 50 μl dietil-éterrel extraháltuk, és 10 perc várakozás után az alsó fázist a HPLC oszlopára injektáltuk.

Az enantiomerek szétválasztása és meghatározása. A kromatográfias rendszer egy tisztító oszlopból (C-18, 36 \times 4,5 mm belső átmérő, 20 μm részecske méretű Rsil), melyet a pumpa és a mintaadagoló közé helyeztünk, egy biztonsági oszlopból (RP-8, 15 \times 3,2 belső átmérő, 7 μm részecskeméret, Brownlee), melyet a mintaadagoló és az analitikai oszlop közé helyeztünk és az analitikai oszlopból (300 \times 4,6 mm belső átmérő, 5 μm részecskeméret, Kromasil-oktil töltet) állt. Az α -aminosavak szétválasztására egy három komponensből álló gradiensrendszert alkalmaztunk, melynek összetétele az alábbi volt:

A: tetrahidrofurán; B: acetát-puffer (1 cm^3 ecetsav/1 dm^3 víz, pH-beállítás 7,00-ra NaOH-dal); C: acetát-puffer (1,8 cm^3 ecetsav/1 dm^3 víz, pH-beállítás 4,24-re NaOH-dal). Az áramlási sebesség 1 cm^3 /perc volt, a gradiens pedig az 5.9. táblázat szerint változott az idő függvényében.

Az *iminosavak szétválasztására és meghatározására ugyanazt az analitikai oszlopot alkalmaztuk*, mint az α -aminosavak esetében, eluensként acetonitril és 0,1M foszforsav elegyet használtunk, mind a FLEC-származékoknál (acetonitril:foszforsav = 44:56), mind az FMOC-származékoknál (39:61). Az áramlási sebesség 1,5 cm^3 /perc volt.

5.9. táblázat. *Háromkomponensű gradiens a FLEC aminosav-származékok szétválasztására*

Idő (perc)	A (%)	B (%)	C (%)
0	15	85	0
16,9	16	84	0
17	28	0	72
28	28	0	72
37	29	0	71
50,99	38	0	62
51	38	31	31
61	40	30	30
75	44	28	28
82	44	28	28
89,99	46	27	27
90	55	45	0
94,99	55	45	0
95	15	85	0

A módszerrel kapcsolatos észrevételek és megállapítások. Az aminosavak és a FLEC reakciójának sebessége adott hőmérsékleten a reagens koncentrációjától és a reakcióelegy pH-jától függ. A fenolos oldalláncú tirozinból mono- vagy bisz-származék is keletkezhet. Az alkalmazott módszer a tirozin bisz-származékának meghatározásán alapszik, a mono-származék analízise pedig lehetővé teszi a reakció tökéletes lejátszódásának ellenőrzését. Ha a reakció során nem áll megfelelő koncentrációjú reagens rendelkezésre, vagy a reakcióelegy pH-ja túlságosan alacsony, akkor mindkét esetben nőni fog a tirozin mono-származékának koncentrációja. Az előzőekben ismertetett reakciófeltételek esetén a tirozin 90%-a bisz-származék alakjában fordul elő. A származékképzés lejátszódása után a reagens feleslegének, valamint hidrolízissel keletkezett származéka egy részének eltávolítására egy extrakciós lépést iktattunk be.

A származékképzés során két különböző eljárást alkalmaztunk. Az első módszert *mind az α -aminosavak, mind az iminosavak származékainak képzésére használtuk*, a második módszert viszont *csak az iminosavak származékképzésére alkalmaztuk*. A szelektivitás az α -aminosavak és az OPA közötti reakción alapszik, melyet követ az iminosavak

származékképzése FLEC-tal. Az OPA blokkolja az α -aminosavakat, melynek következtében a FLEC csak az iminosavakkal tud reakcióba lépni. Az OPA-származékok különböző fluoreszcenciás tulajdonságainak köszönhetően az iminosavakat az α -aminosavak zavaró hatása nélkül meg lehet határozni.

32 aminosav-enantiomer linearitását vizsgálva az $1\text{--}100\ \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ koncentráció-tartományban, megállapítható, hogy a linearitás a D- és L-tirozin kivételével mindegyik aminosavra jónak mondható. A korrelációs együtthatók átlagai minden esetben meghaladták a 0,99-et. A D- és L-tirozin csak az $50\ \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ koncentrációig mutatott linearitást. Valószínű, hogy a linearitást ez utóbbi esetében is növelni lehet a reagens nagyobb koncentrációjának alkalmazásával. Az alkalmazott elúciós körülmények között mindegyik aminosav nagyon hasonló fluoreszcenciás jelet adott. A legkisebb fluoreszcenciát a treonin adta (a mono-származékok átlagának 78%-a), a legnagyobbat pedig a lizin (190%), az ornitin (170%) és a tirozin (150%) bisz-származékának esetében kaptuk.

Az *iminosav-enantiomerek szelektív meghatározásának módja* három gyors reakciót foglal magában. Az *aminosavak blokkolása az OPA/merkaptó-etanol reakcióval* történik, mely előkészíti a terepet az iminosavak FLEC-tal történő reakciójához. A *jód-acetát* szerepe csak az, hogy *eltávolítsa a merkaptó-etanol felesleget*, megvédve a FLEC reagentst a tioloktól. Kevesebb mint 1 perc szükséges az első két reakcióra, és kevesebb mint 5 perc, hogy a *FLEC-tal a reakció* tökéletesen végbemenjen. Az egész procedúra lejátszódásához szükséges időt nagyban befolyásolják a mosási ciklusok, melyek a különböző reakciólépések között szükségesek. Az iminosav-enantiomerek kalibrációs görbéi $0,1\text{--}100\ \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ koncentráció-tartományban kiváló linearitást mutattak.

A retenciós idők átlagos szórása az α -aminosavak esetében, hét napon keresztül elemezve, 40 különböző minta átlagában 0,2 perc volt. Kisebb különbségeket a később eluáló származékok esetében kaptunk. Az egymáshoz közel eső aminosavak retenciós idejében tapasztalt szisztematikus változás lehetővé teszi a retenciós idők használatát a csúcsazonosítás megbízhatóságának növelésére. Mivel a különböző minták igen különböző koncentrációban tartalmazzák a meghatározni kívánt aminosav-enantiomereket, ezért a koncentráció ismételtőségét az L-aminosavak esetében $20\text{--}80\ \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, a D-aminosavak esetében pedig $0,3\text{--}2,8\ \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ tartományban határoztuk meg. Ezek

a koncentráció-viszonyok jól modellezik azokat, amelyek élelmiszerekben ténylegesen előfordulnak. A szórásszázalék az L-aminosavak esetében 3,6%, a D-aminosavak esetében 6,2%. Egy referencia-aminosav felhasználásával normalizálva a koncentrációkat, ezek az értékek L-aminosavak esetében 2,2%-ra, D-aminosavak esetében pedig 5,3%-ra csökkentek. Az iminosavak izokratikus elválasztásakor a retenciós idők szórása 10 minta analízise után 0,082–0,040 perc között változott. 10 db 5 μ mol koncentrációjú iminosav analízise után a koncentrációk szórásának átlaga 1,1% volt (szélsőértékek 0,75 és 1,44%). Amennyiben az L-prolin koncentrációját a D-prolin koncentrációjának százszorosára megnöveltük, az nem volt hatással a D-prolin koncentrációjának szórásszázalékára.

A csúcsok elválasztását a tetrahidrofuránhoz kevert acetátpuffer mennyiségének változtatásával tudtuk javítani. 7-es pH-jú pufferrel indítva az elúciót, az aszparaginsavat és glutaminsavat elválasztottuk a többi aminosavtól, ezt követően az eluens pH-ját 4,25-re csökkentve, az ionerősséget pedig megemelve elértük, hogy az arginin a treonin és a szerin között eluál. A D-Phe/Val és a D-His/Ile enantiomer páros elválasztásának optimalizálására az eluens pH-ját a két puffer segítségével 4,78-ra növeltük. Az elválasztást ezenkívül optimálni lehet még az álló fázis megválasztásával is, ugyanis egy xilanolcsoport jelenléte az álló fázison jelentősen befolyásolja pl. az arginin retencióját, amelyet 1–20 μ mol trietil-amin vagy tetrametil-ammóniumsó mozgó fázishoz történő keverésével lehet ellensúlyozni.

A hidroxiprolin- és a prolin-enantiomerek szétválasztásához alacsony pH-jú mozgó fázis szükséges. Az elválasztást egy egyszerű izokratikus elúcióval tökéletesen végre lehet hajtani, és ugyanilyen körülmények között szét lehet választani a hidroxiprolin cisz- és transz-izomerjét optikailag inaktív FMOC-Cl-dal történő származékképzés után.

Az aminosav-enantiomerek tisztaságának és a fehérjehidrolízis során lejátszódó racemizáció arányának mérése szükségessé teszi, hogy az enantiomereket széles koncentrációtartományban meg lehessen határozni. *A D-aminosavak nyomnyi mennyiségének detektálása problematikus* lehet a lehetséges átfedések miatt, amit pl. a reagensből vagy az egyéb aminosavakból eredő szennyeződés okozhat. Rendkívül előnyös az, ha a származékképző reagens mindkét enantiomerjét módunkban áll használni, mert ez megnöveli a csúcsok azonosításának megbízhatóságát, mivel a reagens másik enantiomerjével végezve el a származékképzést, *megváltozik a diasztereomer-származékok elúciós*

sorrendje. A másik előnye a reagens mindkét enantiomere használatának az, hogy lehetőség van annak az aminosav-enantiomer retenciós idejének meghatározására is, mely nincs is jelen a mintában, elvégezve a kromatografálást az ellentétes térszerkezetű reagenssel létrejött reakció után. A csúcsok azonosításának különösen az élelmiszer-analízis esetén van nagyon nagy jelentősége, hisz ebben az esetben a kromatografálás során sok olyan csúcs jelenik meg a kromatogramon, amelyről igen nehéz eldönteni, hogy egy kis koncentrációban jelenlévő D-aminosavról, vagy valami más egyébről van szó. Amennyiben megváltozik az elúciós sorrend, akkor biztosak lehetünk a D-aminosav jelenlétében, amennyiben ez a sorrend nem változik meg, akkor nagy valószínűséggel nem D-aminosavról van szó.

*Az aminosav-enantiomerek szétválasztása és meghatározása
o-ftáldaldehyddel és 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio-β-D-
-glükopiranoziddal történő származékképzés után
(OPA/TATG) RP-HPLC-vel*

A készülék azonos az előző pontban ismertetettel, és a vegyszereket is az előző pontban ismertetett cégektől szereztük be. Az elúciós puffereket mono- és dinátrium-hidrogén-foszfátból állítottuk elő, a pH-t NaOH-dal állítottuk be.

A származékképzés során a reakciót 120 μl -es mikroampullában végeztük, melyet 1,8 cm^3 -es térfogatú, teflonbevonatú, belső zárólappal és kupakkal ellátott ampullába helyeztünk. Az automatikus mintaadagolót úgy programoztuk, hogy 90 μl borátpufferben (0,4M, pH=9,5) oldott mintát keverjen össze 15 μl reagenssel (80 mg OPA és 44 mg TATG feloldva 1 cm^3 metanolban), ezt követően a reakcióelegyet többször összekevertük, majd 6 percig állni hagytuk. E reakcióelegyből az injektáló apparátus előzetes átöblítése után, 25 μl -t injektáltunk az analitikai oszlopra. Az injektálást befejezve, a rendszert 100 μl aceton-víz 70:30 arányú elegyével háromszor átöblítettük.

Az enantiomerek szétválasztását és meghatározását RP-HPLC-vel, 250×4,6 mm belső átmérőjű, 5 μm részecskeméretű Kromasil-oktil (C8) töltetű analitikai oszloppal végeztük. Az oszlop élettartamának megnövelésére a mintaadagoló és az analitikai oszlop közé egy biztonsági oszlopot (Newguard 25×3,2 mm belső átmérő, 7 μm részecskeméret, Brownlee), a pumpa és a mintaadagoló közé pedig egy tisztítóoszlopot

(C18, 36×4,5 mm belső átmérő, 20 μm részecske méretű, Rsil) csatlakoztattunk. Az enantiomerek szétválasztására egy *két komponensből álló gradiensrendszert alkalmaztunk*, melynek összetétele az alábbi volt: A: 40% metanol foszfátpufferben (9,5 mmol, pH=7,05), B: acetonitril. Az áramlás sebessége 1 cm³/perc volt, a gradiens pedig az 5.10. táblázat szerint változott az idő függvényében.

5.10. táblázat. *Kétkomponensű gradiens az OPA/TATG aminosav-származékok szétválasztására*

Idő (perc)	A (%)	B (%)
0	95	5
10	95	5
35	83	17
55	72	28
56	67	33
74	67	33
75	62	38

A származékképzés során az aminosavak reakciója az OPA/TATG-val hasonló módon megy végbe ahhoz, mint amit az OPA/merkaptóetanol és az aminosavak közötti reakciók esetében tapasztaltak. Az L-alanin, az L-lizin, az L-metionin, az L-aszparaginsav, az L-hisztidin, az L-szerin, valamint az L- és a D-treonin reakciósebességét tanulmányozva megállapítottuk, hogy a reakció a treonin kivételével kevesebb mint 3 perc alatt végbemegy. A treonin esetében azonban legalább 6 perc szükséges a reakció tökéletes lejátszódásához. A gyors reakció az OPA és a nagy tömegű TATG-molekula, valamint az aminosavak között alátámasztja azt a megfigyelést, miszerint a tömeg növekedése nem jár feltétlenül a reakció sebességének csökkenésével. Az OPA-reagens aminosav-analízisnél történő használatakor komoly probléma, hogy a képzett származék instabil, ezzel szemben az *OPA/TATG-származék* egészen *stabilnak* bizonyult. Az alanin-, a glicin- és a szerinszármazékok nem mutattak fluoreszcenciacsökkenést még másfél órával a reakció befejeződése után sem. 10 órás szobahőmérsékleten végzett tárolás után a fluoreszcenciának mintegy 68%-át mértük lizin és 37%-át ornitin esetében.

A kereskedelmi forgalomban kapható TATG-reagens kromatográfias tisztaságát ellenőrizve megállapítottuk, hogy abban fluoreszcenciás

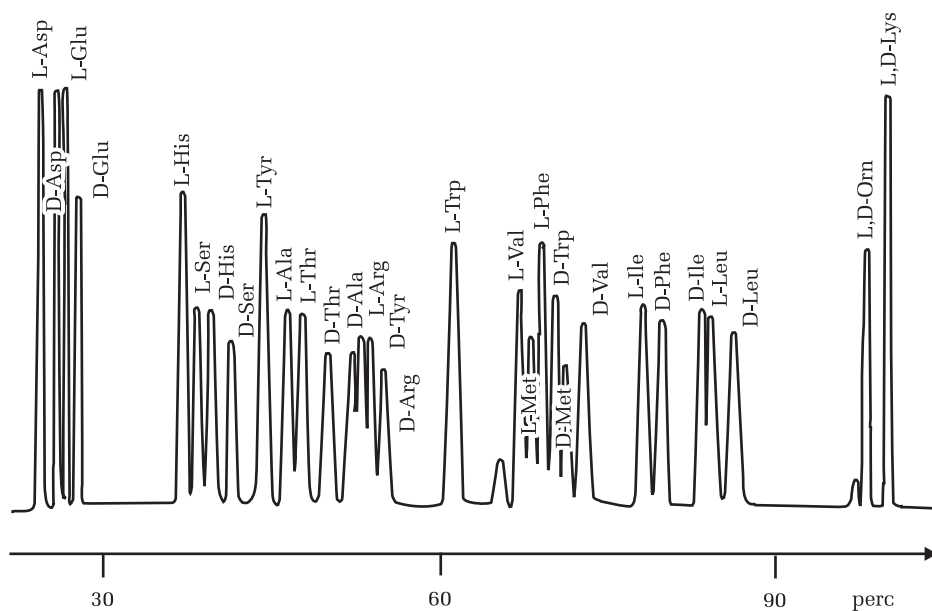
szennyeződések nincsenek. Az OPA/TATG-reagens optikai tisztaságát L-tirozinnal történő származékképzéssel ellenőriztük. Standard addíciós módszert alkalmazva, a D-tirozinhoz tartozó csúcs csak 0,1%-a volt az L-tirozinhoz tartozónak, mely eredmény azt is jelzi, hogy nemcsak a reagens nagy optikai tisztaságú, hanem *a származékképzés során a racemizáció mennyisége is elhanyagolható.*

Az OPA/TATG-származékok fluoreszcenciás spektruma nagyon hasonló ahhoz, amit az OPA/merkaptó-etanol-származékok esetén kaptak. A meghatározás során 342 nm gerjesztési és 410 nm emissziós maximumot használtunk. A leucin OPA/TATG származékának fluoreszcenciás és elektrokémiai jelét vizsgálva megállapítottuk, hogy a kimutathatóság határa fluoreszcens detektor esetében 2 μmol , az elektrokémiai detektor esetében pedig 1 μmol . A módszer megbízhatóságát elemezve konstatáltuk, hogy az aminosav-enantiomerek OPA/TATG származékai retenciós idejének relatív standard szórása 0,2% (szélsőértékek 0,03 és 0,40%), a koncentrációké pedig 38 aminosav átlagában 3,8% (szélsőértékek 3,5 és 5,9%) volt. Ha a D-aminosavak mennyisége az L-aminosavakéhoz viszonyítva igen kicsi, azaz a D/L-arány kisebb, mint 0,01, a koncentráció relatív standard szórása néhány esetben meghaladta a 10%-ot. 38 aminosav-enantiomer származékának linearitását vizsgálva 0,3–300 μmol tartományban, megállapítottuk, hogy a linearitás minden aminosav esetében kiváló.

Az OPA/TATG-származékok elválasztásánál korábban acetátpuffert használtunk, melyet a későbbiekben foszfátpufferrel cseréltünk ki, miáltal megnőtt az elválasztás hatékonysága, és a mozgó fázis nagyobb pufferkapacitással rendelkezett az elválasztás szempontjából érdekes pH-tartományban. A foszfátpuffer ionerősségét 95 mmolra növelve nőtt az elméleti tányérszám az aminosav-származékokra, és a nagyobb ionerősség hatására nőtt – némely esetben viszont csökkent – az elválasztás hatékonysága, ezért kompromisszumos megoldásként további vizsgálatainkat 95 mmol értéknél végeztük. Az ionerősség növelésének hatására a D-szerin és a D-arginin elválása romlik, az L-arginin pedig még közelebb kerül a D-hisztidinhez. Az ionerősség növelésének hatására az ammóniacsúcs ellentétes irányba mozdul el azokhoz a származékokhoz képest, melyek hajlamosak a D-leucinnal történő összemosódásra. A pH 7-re történő beállításával a kromatogram első négy csúcsa, az aszparaginsav és glutaminsav D- és L-enantiomere, növekvő pH hatására együtt mozdul el a fronttól távolodva. A következő aminosav-csoportban

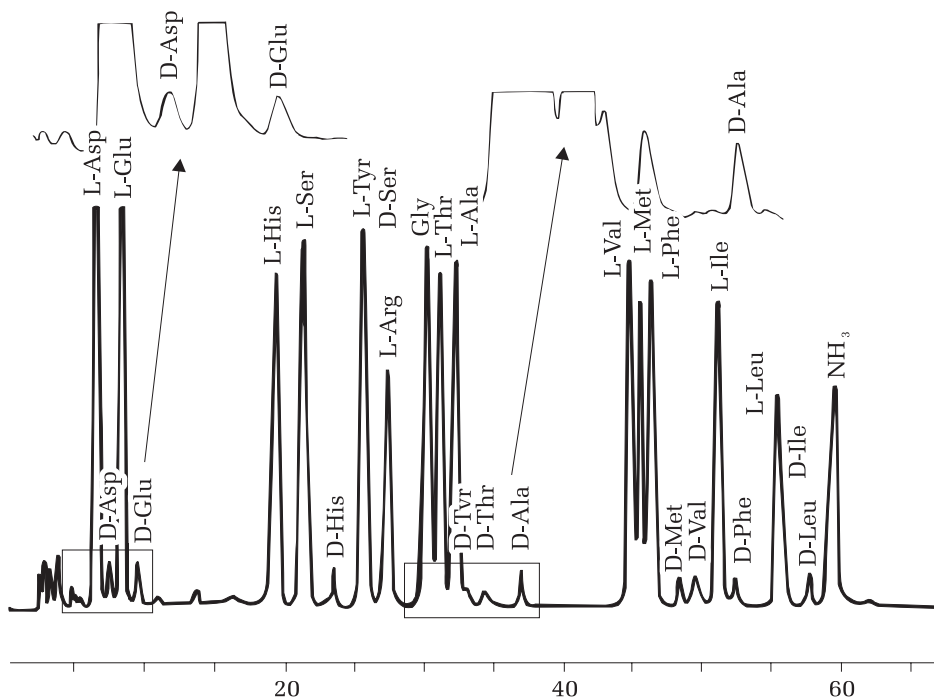
csak a szerinre volt hatással a magasabb pH, mely a front irányába elmozdulva, pH=7,3-nél összerosódott a D-aszparaginnal, a kromatogram vége felé pedig az L-fenil-alanin összerosódott a D-izoleucinnal.

A pH és az ionerősség minimális változásának hatására a D- és az L-leucint már nem lehet egymástól szétválasztani. A D-triptofánt és az L-alanint is nagyon nehéz egymástól szétválasztani, de a nagyobb pH és ionerősség segíti a szeparációt. Jó lépésnek bizonyult a tetrahidrofuran acetonitrillel történő kicserélése is, melynek következtében rendkívüli módon megnőtt az OPA/TATG aminosav-származékok szétválása. Ennek ellenére kijelenthető, hogy a glutamin és az aszparagin enantiomerjei a többi aminosavval összerosódva jelennek meg a kromatogramon. A rossz elválás ellenére is szükség van a nagy metanoltartalmú eluensre a kromatografálás elején, mert különben az aszparaginsav- és glutaminsav-enantiomerek nem váltak volna szét tökéletesen egymástól. E módszer nem teszi lehetővé az *ornitin-* és a *lizin-enantiomerek szétválasztását* (5.16. ábra).



5.16. ábra. Az aminosav-enantiomerek szétválasztása OPA/TATG származékképzés után

A legtöbb alkalmazás során csak pár aminosav D- és L-enantiomerére vagyunk kíváncsiak, és nincs szükség az összes fehérjealkotó aminosav enantiomereinek szétválasztására és meghatározására, ezért a mozgó fázis pH-jának és ionerősségének megváltoztatásával, vagy másik szerves oldószer alkalmazásával, esetleg az analitikai oszlop méretének és töltésének változtatásával lehetőség van arra, hogy bármelyik fehérjealkotó aminosav-enantiomert tökéletesen szét tudjunk választani és meg tudjunk határozni. Természetesen ilyenkor mindig el kell végezni a rendszer optimalizálását a kérdéses aminosavakra. A következőkben egy ilyen *optimalizálás látható az aszparaginsav és glutaminsav, valamint az alanin enantiomereinek szétválasztására* (5.17. ábra).



5.17. ábra. A kis mennyiségű D-aminosavak meghatározása a nagy mennyiségben jelen lévő L-aminosavak mellett

Élelmiszer-fehérjékben a fehérje 20–30%-a is lehet a *glutaminsav*, és az *aszparaginsav* mennyisége is elérheti a 8–10%-ot. E két aminosav D-enantiomerének mennyiségéből következtetni lehet az összes

többi aminosav D-enantiomerére, ugyanis ha nem tudunk D-glutaminsavat és D-aszparaginsavat a mintából kimutatni, szinte biztosak lehetünk abban, hogy természetes eredetű fehérjék esetében az összes többi D-aminosav mennyisége elhanyagolhatóan csekély a mintában. A D-alanin mennyisége pedig azért érdekelheti a szakembereket, mert a *D-alanin (a D-aszparaginsavval és a D-glutaminsavval együtt) a bakteriális fehérjeszintézis markere*, hisz a baktériumok sejtfalában lévő peptidoglikánok jelentős mennyiséget tartalmaznak e három D-aminosavból. A kromatogramból látható, hogy a kérdéses hat aminosav elválása egymástól és a többi enantiomertől egészen kiválóan mondható, és látható az is, hogy 20-szoros mennyiségű L-aminosav mellett nem okoz gondot a D-aminosavak elválasztása és meghatározása a hagyományos fluoreszcens detektor alkalmazásával. A D-aminosavak meghatározásának alsó határa ebben a rendszerben 0,2–0,5 μmol között van, bár a D-aszparaginsav és D-glutaminsav esetében ez a koncentráció kisebb 0,1 μmol -nál, a lizinnél pedig 2 μmol körül van.

Összehasonlítva a FLEC és az OPA/TATG módszert az aminosav-enantiomerek szétválasztására és meghatározására, az alábbiakat lehet elmondani:

- Mindkét módszer kiválóan alkalmas az aminosav-enantiomerek szétválasztására és meghatározására, mert a származékképzés során egyiknél sem tapasztalható számottevő racemizáció.
- A FLEC-módszer talán előnyösebb akkor, ha nagyobb mintamennyiségek állnak rendelkezésünkre, és nem érdekelnek bennünket különösebben az aszparaginsav enantiomerjei. A FLEC-módszer rendkívül előnyös akkor, ha a bázikus aminosavak enantiomerjeit akarjuk szétválasztani, és különösen jól használható a lizin-enantiomerek tesztelésére.
- Az OPA/TATG-módszer előnyösebb akkor, ha az aszparaginsav-enantiomereket is meg akarjuk határozni, ha igen kis anyagmennyiségek állnak rendelkezésünkre, vagy a minta sok ásványi anyagot tartalmaz. A FLEC-módszer igen érzékeny az ásványi anyagokra, a keletkező csapadék a származékképzés során a származékképzési reakciót, illetve az analízist megghiúsíthatja.
- A FLEC-módszer igen nagy előnye egyrészt az, hogy alkalmas az iminosavak szelektív származékképzésére. Segítségével az L-prolin a D-prolintól, valamint a transz-L-hidroxi-prolin, a cisz-L-hidroxi-prolin, a transz-D-hidroxi-prolin és a cisz-D-hidroxi-prolin egymástól tökéletesen szétválasztható. Az aminosavak

meghatározása esetén előny még az is, hogy (+)FLEC és (-)FLEC alkalmazásával, a megváltozott elúciós sorrendet kihasználva, a csúcsok azonosításának biztonsága megnő, illetve a mintában elő sem forduló enantiomer retenciós idejét is meg lehet határozni.

Végső összegzésként tehát elmondható, hogy szinte nincs olyan aminosav-analitikai feladat az aminosav-enantiomerek szétválasztása területén, amelyet vagy a FLEC, vagy az OPA/TATG származékképzéssel, a rendszer megfelelő optimalálása után, ne lehetne megoldani.

5.9.7. Az aminosavak meghatározása gázkromatográfiával

Az aminosav-analízis „hagyományos” módja az ioncserés oszlopon (IEC) végzett elválasztás, melyet oszlop utáni ninhidrines származékképzés és spektrofotometriás detektálás követ. Bár ez a technika elterjedt és megbízható, előnytelen tulajdonságokkal is rendelkezik. Az analízis költségei viszonylag nagyok, az érzékenység korlátozott, az analízis hosszú időt vesz igénybe, és az IEC készülék nem túl flexibilis: csak néhány analízistípus végezhető el vele. Hogy e hátrányokat kiküszöböljék, már a hatvanas évek végén kísérleteztek a *gázkromatográfiás (GC) aminosav-analízis megvalósításával*. A gázkromatográfiás technika lehetőségei révén kapilláris GC-vel kitűnő felbontás érhető el, a megfelelő detektorok kiválasztásával pedig nagy érzékenység biztosítható. A ninhidrin-származékok 10 ng feletti mennyiségben, az o-ftálaldehid-származékok HPLC elválasztás után fluorescens detektorral 1 ng felett mutathatók ki, míg a *gázkromatográfiás származékok elektronbefogási detektorral már 10–100 pg mennyiségben észlelhetők*, és ez az érzékenység tömegspektrométer (MS) csatolásával, megfelelő üzemmódban még tovább javítható. A csúcs alatti területek relatív szórása (RSD) 5–10 ng aminosavat tartalmazó elegyekben IEC alkalmazásánál 2% körüli, míg GC-vel 1% alatti RSD is megvalósítható.

A gázkromatográfiás elválasztásban gyakorlatilag csak az állófázis–minta kölcsönhatás jelentős, szemben a folyadékkromatográfiával, ahol a minta–állófázis–mozgófázis egymásra hatásában mindhárom tényezőnek jelentős szerep jut, így előbbi esetben az elválasztás optimalálása némileg egyszerűbb. A gázkromatográfiás analízis előnyei közé sorolható annak az egyéb technikákhoz viszonyított relatíve kisebb költsége is. Az aminosavak gázkromatográfiás analízise azonban csak akkor kivitelezhető, ha azt megelőzően az aminosavakból olyan származékokat

képezünk, melyek illékonyak és kevésbé polárosak, mint az eredeti aminosavak. Ezért a GC rendszer paramétereinek optimalálásán kívül *megfelelő származékképzési eljárásokra is szükség van* az aminosavak gázkromatográfiás analízise érdekében. E munka- és az időigényes lépések szükségessége gátolja leginkább a gázkromatográfiás aminosav-analízis széles körű elterjedését.

Mikor alkalmazható az ioncserés folyadékkromatográfia alternatívájaként a gázkromatográfiás technika? Általánosságban elmondható, hogy azokat a származékképzési technikákat érdemes alkalmazni, melyekkel kiaknázhatók a gázkromatográfiás analízis előnyei, miközben az eredmények jó összhangban vannak az IEC analízissel nyert adatokkal.

A mintaelőkészítés során a fehérje hidrolízisét a 5.9.1. fejezetben leírtak szerint végezhetjük. *A származékképzés során* olyan származékképzési módszert kell alkalmazni, mellyel egy adott reagens használatával, azonos reakciókörülmények között, egyszerre mindegyik aminosav teljes mértékű átalakítása megvalósítható, és minden aminosavból csak egy termék keletkezik. Ezt a feladatot a mai napig sem sikerült minden esetben maradéktalanul megvalósítani.

Az akirális származékok képzése során az aminosavak poláros csoportjait kevésbé poláros csoportokká kell alakítani, hogy illékonyabbá váljanak és kémiai reakciókra kevésbé legyenek hajlamosak. Az egyik lehetőség, hogy *a karboxilcsoportot rövid szénláncú alkohollal észtereszítik, az aminocsoportot pedig halogénezett savanhidridekkel acilezik.* A halogénatomok bevitelével lehetőség nyílik az elektronbefogási detektor (ECD) használatára, amely nagyfokú érzékenységnövekedést jelent. A másik megoldás az aktív csoportok egy lépésben, egy reagenssel történő blokkolása trimetil-szilil-származékok képzésével.

Az *N(O,S)-trifluor-ecetsav- (N-TFA-) n-butil-észter-származékok* képzését és gázkromatográfiás analízisét elsőként *Gehrke* és *mtsai.* valósították meg 1965-ben. Ezt követően a fenti módszert számos kutatási területen alkalmazták. *Zumwalt* és *mtsai.* szérum és vizelet szabadaminosav-tartalmát, valamint kukoricadara és szójabab teljes aminosav-tartalmát határozták meg *N-TFA-n-butil-észter-származékok* formájában. A vizsgált minták között szerepelt tengeri alga, kémiailag módosított fehérje, szívizom, sőt az Apollo-programmal a Földre került holdközet is.

Egy másik széleskörűen elterjedt technika a *N-heptafluor-butiril- (N-HFB-) izobutil-észter-származékok* létrehozásán és analízisén alapszik, melyet *MacKenzie* és *mtsai.* fejlesztettek ki. A módszer adaptációjával és módosításával különböző kutatócsoportok összességében mintegy

ötvenféle, biológiai szempontból fontos aminosav mennyiségét határozták meg. Vizsgálták a halliszt ciszteintartalmát ciszteinsav-HFB-izobutil-származék formájában, a hővel és lúggal kezelt fehérjékben jelen lévő lizinoalanin mennyiségét, valamint hús- és vizeletminták aminosav-összetételét is.

Az aminosavak *N-acetil-n-propil-észter* származékait növényi szövetek, szérum és vizelet szabad- és teljes aminosav-tartalmának analízisére használták. A származékképzés módjától függetlenül, az aminosav-alkil-észterek gázkromatográfiás mérése jól alkalmazható biológiai folyamatok vizsgálatára.

Mintegy harminc aminosav analízise valósítható meg az *N-TFA-n-propil-észter-származékok* képzésén alapuló technika segítségével, és szintén eredményes analízist tesznek lehetővé az *N-HFB-n-propil-észter* aminosavak, melyek kialakulásának folyamatát és észterezési kinetikáját is vizsgálták. Használatosak még az *N-HFB-izoamil-*, és az *N(O,S)-izobutil-oxikarbonil-metilészter-* (izo-BOC-) származékok (*Gehrke* és mtsai.). Utóbbi esetben az aminosavak vizes közegben izobutil-kloroformáttal reagálnak, majd diazometánnal észtereket képeznek belőlük (*Kataoka* és mtsai.).

A trimetil-szilil-csoport (TMS) származékképzés céljából történő alkalmazására először a hatvanas évek elején került sor, amikor *Klebe* és mtsai. leírták a *BSA (N,O-bis(trimetil-szilil)acetamid)* szintézisét, és publikálták a TMS-származékok kromatogramjait. A glicin és az alanin elválasztását egyaránt zavarta azonban a reakció egyik mellékterméke, a mono(trimetil-szilil)acetamid (MSA), ezért a kromatográfiás interferencia elkerülése céljából egy új reagenst, az *N,O-bis(trimetil-szilil)trifluor-acetamidot* (BSTFA) alkalmaztak. A BSTFA és reakcióterméke, a mono(trimetil-szilil)trifluor-acetamid (MSTFA) sokkal illékonyabb, mint a BSA és az MSA, és így nem zavarja a trimetil-szililezett aminosavak elválasztását (*Gehrke* és mtsai.). Még használatos reagensek a *hexametil-diszilazan* és a *trifluor-ecetsav* elegye (HMDS+TFAA), valamint a *N-metil-N-(t-butil-dimetil-szilil)trifluor-acetamid* (MTBSTFA). A szililezés előnye, hogy csupán egy lépésben megy végbe a származékképzési reakció, szemben a többi származékképzéssel, ahol az észterezési lépést még egy acilezés is követi, melyek idő- és munkaigényes folyamatok. Több szililezőszerrel (BSTFA, MTBSTFA, HMDS+TFAA) végzett származékképzést vizsgálva, különböző reakcióidőn és hőmérsékleten megállapították, hogy az esetek döntő többségében egy adott aminosavból több származék is keletkezhet, és a reakciókörülményeket

nem lehet úgy optimálni, hogy az összes fehérjealkotó aminosavból csak egy-egy adott származék keletkezzen (*Molnár-Perl* és *Katona*).

Összességében elmondható, hogy a biológiai minták analízisében a TFA- és HFB-származékok alkalmazásáról sok tapasztalat gyűlt össze, azonban *e származékképzési eljárások végrehajtása* sok esetben *bonyolult*, mivel vízmentes közeget, magas hőmérsékletet igényel, és az amidok (aszparagin, glutamin) átalakulásával jár, és némely aminosav alkoholban való kismértékű oldékonysága is problémát okozhat (*Kataoka* és *mtsai*.).

A trimetil-szililezett aminosavak alkotják az akirális származékok másik fő csoportját. Az egyszerű szililszármazékok, mint a trimetil-szilil és az N(O)-terc-butil-dimetil-szilil (terc-BDMS) képzése egy lépésben zajlik, de vízmentes közeget, magas hőmérsékletet és hosszú időt igényel. Egyes aminosavaknál több származék is keletkezhet, így a kromatogramon több csúcs jelentkezhethet, és a GC-analízis magas hőmérsékletén bizonyos magas forráspontú molekulák részlegesen elbomolhatnak. Ezzel szemben az izo-BOC-származékok ígéretesnek mondhatók, mivel szintézisük nem igényel vízmentes közeget, magas hőmérsékletet, és hosszú időt (*Kataoka* és *mtsai*.).

Az akirális származékok elválasztása gázkromatográfiával

A hatvanas évek végén *Wall* kétoszlopos módszert használt az N-TFA-n-butyl-észter-származékok elválasztásához. Az álló fázis egyrészt etilén-glikol-adipát (EGA), másrészt 50% fenil-, 50% metil-szilikon (OV-17, Supelco) volt. A hisztidin és az aszparaginsav származékát azonban nem sikerült egymástól elválasztani, és az eredményeket sem lehetett reprodukálni, ugyanis az arginin-, a hisztidin- és a cisztinszármazékok az EGA állófázissal, sőt a hordozóval is reagáltak, így ezen aminosavak analízisére más módszert kellett keresni. Később egy szintén kétcsatornás rendszerben 17 aminosavat sikeresen analizáltak EGA állófázisú kolonnán; az arginin, hisztidin és a cisztin származékát pedig egy kevert fázisú oszlopon választották el (*Gehrke*), melyben az állófázis 50% fenil-, 50% metil-szilikon, valamint trifluor-propil-szilikon 2:1 arányú elegye volt (OV-17 és OV-210, Supelco). Poliészter alapú állófázisokkal az egyoszlopos analízist a fenti három aminosav-származék koelúciója miatt nem sikerült megvalósítani.

Az aminosavak TMS-származékainak elválasztására számos fenil-metil-sziloxán alapú állófázist kipróbáltak, és a legjobb eredményt

a fenil-metil-dimetil és a fenil-metil-difenil fázisok 2:1 arányú kombinációja adta (OV-7 és OV-22, Supelco) (*Gehrke*). Belső standardnak aminos- és karboxilcsoportot egyaránt tartalmazó vegyületeket használtak.

A szabad aminosavak meghatározása sajtból, illékony acilezett és észteresített származékok formájában

Wood és mtsai. N-heptafluor-butiril- (N-HFB-) izobutil-észter-származékok formájában, gázkromatográffal határozták meg a sajt szabad-aminosav-tartalmát. Ennek során 10 g őrölt sajtot 756 cm³ desztillált vízzel, a fordulatszámától függően, 30–60 másodpercig turmixoltak. Félórás ülepedés után a felülúszót üvegszálal szűrőn engedték át, a szűrletből 0,5 cm³-t 4 cm³-es *Wheaton*-fiolába mérték, belső standardként 0,4 cm³ 2,5 mM norleucin-oldatot adtak hozzá, és a fiolából a vizet liofilezéssel eltávolították.

A szabad aminosavakból *Pearce* módszere szerint N-HFB-izobutil-származékokat képeztek. Ennek során a 3M sósavat tartalmazó izobutanol-oldatot vagy HCl-gáz elnyelésével, vagy in situ módszerrel acetil-klorid hozzáadásával kell elkészíteni. Ha az izobutanolhoz 270 μl/cm³ koncentrációban adjuk hozzá az acetil-kloridot, akkor az oldat sósavra nézve 3 mólos lesz. A minta aliquot részét vastag falú, teflontömítéssel ellátott fedeles fiolába mérték, hozzáadták a belső standardot, majd az oldószert 50 °C-on, tiszta nitrogénáramban (100–200 cm³/perc) bepárolták. 100 μl sósavhoz 3 mólos izobutanol oldatot adtak, majd a fiolát száraz, tiszta nitrogénnel átöblítették, és szorosan lezárták. A fiolákat 120 °C-os olajfürdőbe merítették úgy, hogy az olaj csak a folyadékszint tetejéig érjen. Öt-tíz perc elteltével a fiolákat még forró állapotban összerázták egy kémcsőkeverő készülékkel, majd még további 30 percig melegítették. Ezt követően a mintát – maximum 50 °C-on – tiszta, száraz nitrogéngázzal bepárolták.

Ezután 50 μl analitikai minőségű hexafluor-vajsav-anhidridet (HFBA) adtak az aminosav-észterekhez, a fiolát tiszta, száraz nitrogéngázzal öblítették, majd szorosan lezárták, és 10 percig 150 °C-on melegítették az észteresítéshez hasonló módon. Mivel az izobutil-észterek jól oldódnak a HFBA-ben, a forró üvegce eltávolítása és összerázása a melegítés alatt nem szükséges. Miután a fiola szobahőmérsékletre lehűlt, a HFBA feleslegét tiszta, száraz nitrogéngázzal elpárologtatták. Amikor az oldat beszáradt, a bepárlást azonnal abba kell hagyni, nehogy az illékonyabb származékok egy része is eltávozzon. A maradékot analitikai

minőségű etil-acetátban oldották fel, és így az oldat már alkalmas a gázkromatográfiás analízisre. Antioxidáns (BHT) hozzáadását a szerzők nem javasolják, ha a HFBA analitikai minőségű.

A gázkromatográfiás méréseket egy Shimadzu GC-RIA készülékkel végezték el. A WCOT oszlop állófázisa SE-30, mérete: 50 m×0,22 mm volt, a split injektor 1:10 arányú osztással üzemelt. Vivőgázként hidrogént használtak, 33 cm/s lineáris gázsebességgel. A hidrogéngáz áramlási sebessége 40 cm³/percet, a levegőé 400 cm³/percet tett ki. A detektor (FID) és az injektor hőmérséklete egyaránt 260 °C, az oszloptermostát hőmérséklet-programja pedig a következő volt: 100 °C-ról 250 °C-ra emelés (6 °C/perc), majd hőtartás 250 °C-on (3 perc).

A módszerrel Edámi, Cheddar, Jarlsbergi és svéd típusú sajtok szabadaminosav-tartalmát határozták meg. Az aminosavak mennyisége 1–50 μmol/g értékek között, a relatív szórás pedig 2–20% között volt. A kromatogramon a csúcsok sorrendje a következő: Ala, Gly, Val, Thr, Ser, Leu, Ile, norleucin, Pro, BHT, Met, Asp, Phe, Orn, Glu, Lys, Tyr, Arg, Cys. Megállapítható, hogy mindegyik aminosav elválasztása megfelelő, minden aminosav kromatográfiás csúcsa visszatér az alapvonalra, mielőtt újabb csúcs kezdődne.

5.9.8. A D- és az L-aminosavak meghatározása gázkromatográfiával

A teljes aminosav-tartalom vizsgálata mellett lehetőség van az aminosav-enantiomerek illékony származékainak gázkromatográfiás meghatározására is. Utóbbi esetben a királis szelekció megvalósítására két lehetőség kínálkozik: *királis állófázisú oszlop alkalmazása, vagy az aminosav-enantiomerekből királis reagenssel diasztereomer párok létrehozása*, melyek akirális oszlopon is elválnak egymástól. Mivel a mozgófázis ebben az esetben nem manipulálható, a folyadékkromatográfiában alkalmazott harmadik lehetőség – királis mozgófázis használata – itt nem jöhet szóba.

A királis származékok képzését az aminosav-enantiomerek diasztereomer formában történő elválasztására először Weygand és mtsai. valósították meg. Ennek során vagy a karboxil-csoporttal reagáltatnak királis amint vagy alkoholt; vagy királis savval acilezik az aminocsoportot. Az első csoportba tartozik az *N(O,S)-TFA(+)-2-butil-észterek* és

a (+)-3-metil-2-butil-észterek képzése, a másodikba a *N-TFA-L-prolil-klorid*, az *N- α -kloro-izovaleril-* és a *N- α -kloro-propionil-*reagensekkel végzett származékképzés.

Az *N-TFA-L-prolil-klorid* azért alkalmazható királis reagensnek, mert racemizáció szempontjából stabil, és optikailag tiszta formában beszerezhető. Amennyiben hidroxil-aminosavak enantiomer arányát szeretnénk meghatározni, akkor a diasztereomer-képzést TMS-éter képzésnek kell megelőznie. A tirozin, a lizin, a hisztidin, az arginin és a triptofán esetében az *N-TFA-L-prolil-klorid*-származékok molekula-tömege olyan nagy, hogy kismértékű illékonyaságuk nem teszi lehetővé a gázkromatográfiás meghatározást. Ebből a szempontból kedvezőbb a sokkal illékonyabb *N- α -kloro-izovaleril-*, vagy a vele homológ *N- α -kloro-propionil-*származékokat létrehozni, mivel ez esetben a lizin és az ornitin is mérhetővé válik (*Frank*).

Az aminosav karboxilcsoportjának reakciója révén létrehozott diasztereomerek illékonyasága jobb, mint az aminocsoport acilezésével kialakított molekuláké, ugyanis a bevitt királis csoportok mérete kisebb. A létező legillékonyabb származék a 2-butilcsoport kapcsolásával alakítható ki. A lizint is beleértve, mintegy 12 aminosav választható szét az *N(O,S)-TFA (+)-2-butil-észterek* formájában, és az összes fehérjealkotó aminosav elválasztható, amennyiben (+)-3-metil-2-butil-észter-származékokat képezünk belőlük (*Frank*).

A diasztereomerpár-képzéssel végzett indirekt enantiomer-analízis számos feltételhez kötött. Elengedhetetlenül fontos, hogy a királis reagens optikai tisztasága megfelelő legyen. Amennyiben a „hibás” tükörképi párok is megjelennek a kromatogramon, a kromatográfiás csúcsok közötti korreláció bizonytalanná válik. A reagens optikai tisztaságán kívül kritikus pont a származékképzési reakció is. A megbízható analízis feltétele, hogy se a reagensnél, se az aminosavnál ne következzen be racemizáció a származékképzés során. Fenti folyamatok miatt a diasztereomerpár-képzéssel végzett gázkromatográfiás analízissel a teljes aminosav mennyiségén belüli 1%-os, vagy ennél is kisebb racemizáció kimutatása nehézségekbe ütközik. Míg az akirális származékok képzéséhez elégséges csupán egy metilcsoporttal észteresíteni a karboxilcsoportot, a legegyszerűbb királis csoport bevitele is egy izobutil-csoporttal növeli a molekula méretét, így ezeknek a származékoknak az illékonyasága kisebb. Továbbá a királis reagens és az egyes aminosav-enantiomerek közötti származékképzési reakciók termodinamikai egyensúlyi állandói,

valamint a reakciósebességi állandók aminosavanként nagyon különböznek. Amennyiben tisztán aminosavakat tartalmazó mintákat vizsgálunk, a fentiek nem okoznak problémát, mivel a reagens nagy feleslege miatt a reakció gyakorlatilag teljesen a diasztereomer-képzés irányába tolódik el; azonban komplex biológiai mintákban, ahol az aminosavak mellett számos egyéb vegyület van jelen, és a reagens mellékreakciókban is felhasználódhat, a fenti jelenséget nem szabad figyelmen kívül hagyni. Ezekben az esetekben nagyon fontos igazolni, hogy a származékképzés teljesen végbement (*Frank*).

A királis származékok elválasztása gázkromatográfiával

A diasztereoizomer prolin-dipeptidek elválasztása mind az EGA, mind az SE-30 állófázisokkal megvalósítható. Míg a legtöbb dipeptidnél az LL-diasztereomer eluál először, addig a prolin-dipeptideknél fordított a sorrend. Az N(O,S)-TFA-(+)-2-butil-észterek analízisének a Carbowax fázis használata nem teszi lehetővé a treonin-, a szerin- és a ciszteintartalom meghatározását, a fenti három aminosav acetilszármazéka viszont stabil, és elválasztható ilyen állófázisú oszlopon. A fehérjében előforduló aminosavak diasztereoizomereit (+)-3-metil-2-butil-észter-származékok formájában metil-szilikon állófázisú oszlopokon (SE-30, Supelco) (*Frank*) maradéktalanul analizálhatók.

Aminosav-enantiomerek elválasztása királis oszlopon gázkromatográfiával

Az aminosav-enantiomerek elválasztása királis származékképzés nélkül is lehetséges, amennyiben rendelkezésre áll a célnak megfelelő optikailag aktív vegyületet tartalmazó oszlop. Az enantiomerek direkt elválasztásánál nincs szükség királis reagensre, így a nem megfelelő optikai tisztaság, és a származékképzési reakció során bekövetkező esetleges racemizáció nem okozhat problémát. Amennyiben az oszlop optikailag aktív állófázisa számottevő mennyiséget tartalmaz a nem kívánt konfigurációjú enantiomerből is, akkor az aminosav-izomerek elválasztása rosszabb lesz annál, mintha optikailag teljesen tiszta állófázis lenne jelen a kolonnában.

A királis állófázisok fejlesztésének fő célja olyan fázis létrehozása, amely az összes aminosavra megfelelő enantiomer-szelektivitást biztosít, és használható a gázkromatografálás magas hőmérsékletén is. Először

a N-TFA-L-izoleucin-lauril-észtert alkalmazták, de csak 90 °C alatti hőmérsékleten, és csak három enantiomer-pár elválasztására volt alkalmas. Ezt követően dipeptideket, uretánokat, diaminokat és különböző szerkezetű triazéneket próbáltak ki erre a célra, melynek során a stabilitási problémák a kémiailag kötött állófázisok bevezetésével oldódtak meg. A nagy enantiomer-szelektivitású L-valin-t-butil-amid-csoportot karboxi-szilikonhoz kapcsolták, mely állófázis (Chirasil-Val) 30 °C-tól 250 °C-ig használható, ami lehetővé tette az összes aminosav-izomer elúcióját fél óra alatt (*Frank*).

*Szabad D- és L-aminosavak meghatározása tejtermékekből
illékony acilezett és észtereszített származékok formájában,
királis oszlopon*

Brückner és Hausch N-pentafluor-propionil-propil-észter-származékok formájában, királis gázkromatográfiás oszloppal határozták meg tejtermékekből a D-enantiomerek arányát (D/L arány). A teljes (L+D) aminosav-tartalom kvantitatív meghatározását IEC-val végezték. A GC analízist megelőző kezelések előtt minden mintához belső standardként 5 cm³ 250 μM-os α-amino-β-guanidino-propionsav- (α-AGPA-) oldatot adtak.

A mintaelőkészítés során 90 cm³ nyers vagy pasztörözött tejhez 180 cm³ acetonitrilt adtak, az elegyet szobahőmérsékleten 10 percig kevertették, majd 1600 g-n centrifugálták. A felülúszót vákuumban kb. 5 cm³-re bepárolták, majd a fehérjék kicsapására 5 cm³ telített pikrinsavoldatot tettek hozzá. Öt perces kevertetés után 10 cm³ 0,1M sósavoldattal elegyítették, majd további öt perc kevertetés után centrifugálták. A felülúszót választótölcsérbe szűrték, és 20 cm³ 40–60 °C forráspontú petroléter/dietiléter 1:1 arányú elegyével a lipidek eltávolítására háromszor extrahálták. A vizes fázist 200–400 mesh Dowex 50 WX 8 kationcserélővel töltött 5 cm hosszú, 1 cm átmérőjű oszlopon vezették át. Az adszorbeált aminosavakat 30 cm³ 2 mólos vizes ammóniaoldattal mosták le, a folyadékot vákuumban bepárolták, a maradékból pedig származékot képeztek a GC-s analízishez.

Joghurt, kefir, aludttej és friss sajt analíziséhez 15 g mintát szuszpendáltak 45 cm³ 8:2 arányú (v/v%) metanol/víz elegyben, és 15 percig szobahőmérsékleten kevertették. Az érlelt sajtoknál 1,5–5 g mintát 70 cm³ desztillált vízben szuszpendáltak 45 percen keresztül 50 °C-on, majd 30 cm³ metanol hozzáadásával a keverést további 15 percig folytatták.

A centrifugálást követően (1600 g) a felülúszót szűrőpapíron átszűrték, és vákuumban 10 cm³-re párolták be. A bepárlási maradékhoz 10 cm³ telített pikrinsav-oldatot adtak, majd centrifugálták (1600 g). A zsírmentesítést, az aminosav-oldat szilárd fázisú extrakciós dúsítását, valamint tisztítását ugyanúgy végezték el, mint a többi tejterméknél.

A *gázkromatográfias származékképzés során* kb. 3 mg aminosavat tartalmazó elegyet használtak, melyhez 200 μl 1-propanol/acetilklorid 8:2 arányú elegyét (v/v%) és antioxidánsként 1,5 mg BHT-t (butil-hidroxi-toluol) adtak, és egy 1 cm³-es, teflontömítéssel záródó reakcióedényben 100 °C-on egy órán át melegítették. Az oldószert nitrogénáramban bepárolták, 200 μl diklórmétánt (DCM) és 50 μl pentafluor-propionsav-anhidridet adtak hozzá, és 100 °C-on 20 percig melegítették. Az oldószert nitrogénáramban elpárologtatták, majd a maradékot 50–100 μl DCM-nal feloldották, és 0,6–1 μl-t injektáltak a gázkromatográfba.

Az analízist egy Carlo Erba gázkromatográf (Model HRGC 5160), lángionizációs detektálással (FID) végezték. Két Chirasil-L-Val királis oszlopot (25 m x 0,25 mm i. d.) próbáltak ki; az egyik gyártója a Macherey-Nagel (A), a másiké a C.G.C. Analytic (B) volt. A vivőgáz: hidrogén, az oszlopfajnyomás: 45 kPa, az injektor és a detektor hőmérséklete: 250 °C volt. Az injektált mennyiség: 0,6–1,0 μl, a split-arány: 1:30 volt. A hőmérsékletprogramok: „A” oszlopra: 80 °C (4 perc), emelés: 4,5 °C/min 190 °C-ig, majd hőntartás 10 percig 190 °C-on. „B” oszlopra: 70 °C (5 perc), emelés: 3,5 °C/perc 195 °C-ig, hőntartás 5 percig 195 °C-on.

A fenti módszerrel tejtermékek szabad D- és L-aminosav-tartalmát vizsgálták meg (tej, kefir, joghurt, aludttej, friss sajt, érlelt sajtok: Gouda, Trappista, Ementáli, Parmezán, Camembert, Gorgonzola, Limburgi, Harzer). A D-aminosavak abszolút mennyiségét úgy határozták meg, hogy a GC-s mérések alapján kiszámolták a (D/(D+L))·100 arányt (RSD=0,2%); majd ezt az IEC-val kapott abszolút adatokkal (mg aminosav/100g minta) beszorozták. Az enantiomerek elválasztását nagyban befolyásolja az aktuális csúcsok mérete, amely függ a bevitt mintamennyiségtől és a minta anyagi minőségétől. A tej kromatogramján a D- és L-alanin elválasztása jó, a D- és L-glutaminsavé elfogadható, a D- és L-aszparaginsavé gyenge. A Harzer sajt kromatogramján az aminosavak (és reagensek) sorrendje: D-Ala, L-Ala, L-Thr, L-Val, Gly, D-allo-Ile, L-Ile, L-Ser, L-Leu, D-Pro, L-Pro, GABA, BHT, D-Asp, L-Asp, L-Met, L-Phe, D-Glu, L-Glu, L-Tyr, L-Orn, D-Lys, L-Lys. Az elválasztás jó, kivéve a D- és az L-prolin, valamint a D- és az L-aszparaginsav között, ahol gyengébb, de még elfogadható. A Parmezán sajt kromatogramján más volt a sorrend, amely

azért meglepő, mivel a szerzők ugyanazokat a körülményeket adták meg a vizsgálatokra. A különbség abból adódhat, hogy az egyik kromatogram az „A”, a másik a „B” oszlopon készült. A sorrend: D-Ala, L-Ala, D-Val, L-Val, L-Thr, Gly és L-Ile egy csúcsban, L-Pro, D-Leu, L-Leu, D-Ser, L-Ser, BHT, D-Asp, L-Asp, L-Met, D-Glu, L-Phe, L-Glu, L-Tyr, L-Orn, L-Lys. Az elválasztás jó, kivétel a Gly és az L-Ile, melyek nem válnak el. A Limburgi sajtnál megjelenik a D-Pro is, és az L-Val-nal összemosódik az L-Thr.

5.9.9. Az aminosavak rétegekromatográfiája

Az aminosavak elválasztása szervesetlen alapanyagú rétegen

Aminosavak rétegekromatográfiás analízise szilikagél rétegen előnyösen végezhető. A legkülönbözőbb minőségű szilikagél porokból jó minőségű rétegek készíthetők, de kész szilikagél rétegek is kaphatók az aminosavak vizsgálatához. Analitikai célokra általában 0,25 mm vastag rétegeket használnak, preparatív célokra viszont 1–2 mm vastag szilikagél rétegek a legalkalmasabbak. Szilikagél vékony rétegen az aminosav-keverékek szétválasztása csak kétdimenziós futtatással ad megbízható eredményt, mert egydimenziós futtatással az aminosavak egy része nem választható szét egymástól. Kétdimenziós vizsgálatokhoz az alábbi futtatóelegy-párok a legalkalmasabbak.

1 dimenzió

2 dimenzió

n-butanol–jégecet–víz (4:1:5)

fenol–víz (7:3, g/g)

CHCl₃–CH₃OH–17%–NH₃ (2:2:1)

fenol–víz (7:25, g/g)

n-butanol–jégecet–víz (4:1:5)

CHCl₃–CH₃OH–17%–NH₃ (2:2:1)

A szakirodalomban közölt elválasztásokat még kész réteglapok alkalmazása esetén sem lehet mindig reprodukálni, ezért a futtatóelegyet, illetve a futtatási körülményeket némiképp módosítva, az elválasztási körülményeket folyamatosan optimalni kell.

Az aminosavak elválasztása cellulóz rétegen

Az aminosavak cellulóz rétegeken történő elválasztása és meghatározása valójában *a papírkromatográfia továbbfejlesztett változataként*

fogható fel. A megfelelő módon előkészített cellulózporból általában 0,25 mm vastag réteget állítanak elő, mely rétegeknek előnye, hogy stabilak, az előhívás különféle változatainak ellenállnak, a különféle specifikus reagensek jól használhatók, a reprodukálhatóság elfogadható és a cellulózzréteg különösen alkalmas denzitometriás kiértékelésre. Hátránya a cellulózzrétegnek, hogy agresszív reagensek nem használhatók, és az aminosavak kimutatási reakcióinak érzékenysége kisebb, mint a szilikagélréteg esetében. A cellulózzrétegeket néhány aminosav szétválasztásra, a bázikus aminosavak meghatározására és a fehérjehidrolizátumban lévő aminosavak beazonosítására használjuk. A cellulóz, szilikagéllel kombinálva, javítja az elválasztást, és jelentősen nő az aminosavak ninhidrin-érzékenysége is.

Aminosavak elválasztása ioncserélő rétegen

Aminosavak rétegekromatográfiás elválasztásánál ioncserélő hordozók is használhatók. Az aminosavak ioncserés oszlopchromatográfiájánál használt ioncserélő műgyantához hasonló tulajdonságú anyagokat üveglapra kenve az aminosavak két dimenzióban szinte tökéletesen szétválaszthatók. *Dévényi* és *mtsai*. Na^+ -ion formában lévő ioncserélő műgyantát műanyag fóliára rögzítettek, melynek segítségével a fehérjeépítő aminosavakat analizálták. Az ioncserélő-rétegeken végzett eljárás hasonlóan történik más rétegekromatográfiás vizsgálatokhoz. A meghatározás során hasonló munkafeltételeket kell teremteni, mint az oszlopchromatográfiás szétválasztáskor, az ioncserélő vékonyréteget ugyanis felhasználás előtt ekvibrálni kell, majd ezt követően cseppenthető fel az elválasztani kívánt aminosavak elegye az ioncserélő vékony rétegre. Az aminosavak szétválasztását eltérő pH-jú, illetve eltérő nátriumion-koncentrációjú citrát-pufferekkel lehet elvégezni. Különböző pufferek alkalmazásával a különböző karakterű aminosavak elválasztását lehet optimalni. El lehet választani az összes fehérjeépítő aminosavat, a bázikus aminosavakat, lehet tesztelni a hidrolizátumot metioninra és lizinre, illetve speciális futtatószerrel alkalmazni csak a triptofán szétválasztására az összes fehérjeépítő aminosavtól. Vékonyréteg-kromatográfiával gyorsan lehet értékelni különféle anyagcsere-betegségben szenvedők vérérszérumának és vizeletének aminosav-tartalmát.

Az aminosavak kimutatása a rétegekromatogramokon

Szilikagél alapú rétegek esetében ninhidrin-oldattal érhetünk el jó eredményt. A ninhidrint oldhatjuk butanolban és ecetsavban, adhatunk az oldathoz kadmium-acetátot és acetont, majd a bepermetezést követően 20 percig 90–100 °C-on a lapokat szárítjuk, melynek során végbemegy az aminosavak és a ninhidrin közötti reakció. Az aminosavak különböző színű (ibolyás, lilás, kékes) foltokat adnak a ninhidrinnel, melyek komplexképző kationok adagolásával állandósíthatók, bázisok adagolásával pedig speciális színhatások érhetők el. Polikromatikus ninhidrinreagens is használható az aminosavak kimutatására, melyek közül a klasszikusnak nevezhető reagens az alábbi oldatokból állítható elő. Első oldat: 50 cm³ 0,2% ninhidrinoldat abszolút etanolban + 10 cm³ ecetsav + 2 cm³ 2,4,6-kollidin. Második oldat: 1%-os Cu(NO₃)₂ · 3 H₂O abszolút etanolban. Felhasználás előtt a két oldatot 50:3 arányban kell elegyíteni, majd a vékony réteget ezzel bepermetezni. Az aminosavak rendkívül érzékeny kimutatását teszi lehetővé, ha a rétegeket előbb dietil-aminnal kezeljük, 3 percig 110 °C-on szárítjuk, majd lehűlés után a réteglapot 0,2%-os metanos ninhidrinnel fújjuk be, és végül 10 percig 110 °C-on melegítjük. Ekkor az aminosavak foltjai a gyenge kékszínű háttérben intenzíven jelennek meg.

Az egyes aminosavak különféle specifikus reakciókkal is kimutathatók, melyek alkalmasak lehetnek az illető aminosav azonosítására, esetleg mennyiségi meghatározására. A különféle aminosavak az alábbi reagensekkel adnak speciális színreakciót. *Arginin*: 8-hidroxi-kinolinnal vagy α -naftollal, karbamiddal és brómmal; *aszparaginsav*: ninhidrinnel, borátoldattal és sósavval; *cisztin*, *cisztein* és *metionin*: nitroprusszid-nátriummal és nátrium-cianiddal, vagy nátrium-aziddal és jóddoldattal; *glicin*: o-ftálaldehiddel és kálium-hidroxiddal; *hisztidin*: szulfanilsavval; *hidroxi-prolin*: dietil-aminnal és ninhidrinnel; *lizin* és *ornitin*: vanillinrel és kálium-hidroxiddal, vagy K₂S₂O₅-tel és furfurollal; *arginin*, *hisztidin* és *lizin*: bizmut-jodiddal; *prolin*: dietil-aminnal és ninhidrinnel; *szerin*, *treonin* és *tirozin*: Na-metaperjodáttal és Nessler-reagenssel; *triptofán*: p-dimetil-amino-benzaldehiddel vagy o-foszforsavval.

Az aminosavak félkvantitatív és mennyiségi meghatározása

A különféle módon kialakított rétegekromatogramokon az aminosavakat közvetlenül a rétegeken vagy elúció után határozhatjuk meg.

Közvetlen meghatározás esetében a foltnagyság négyzetgyöke és a felvitt mennyiség logaritmususa között lineáris az összefüggés, mely alkalmas félkvantitatív meghatározásra. Megbízhatóbbak az eredmények, ha a réteglapokon elválasztott aminosavak értékelésére *denzitométert* használunk, mely *a folt nagyságát és a szín intenzitását integráltan veszi figyelembe*. A rétegekromatogramok mennyiségi értékelésének pontossága lényegesen elmarad az oszlopkromatográfiás módszerekétől, előnye azonban a rendkívüli érzékenység, az olcsóság és az, hogy a vizsgálatokhoz kis mennyiségű peptid vagy fehérje is elegendő.

A rétegeken szétválasztott aminosavakat a megfelelő színreakció után a rétegről eluálhatjuk, melyet követően a mennyiségi értékelés fotometriásan is elvégezhető. A mennyiségi kiértékelés mind a vékonyréteglapon végzett közvetlen, mind a közvetett kiértékelésnél, standardgörbék segítségével történik.

AZ ÉLELMISZER-FEHÉRJÉK HASZNOSULÁSA

6.1. Az aminosavak lebontása és szintézise

6.1.1. Az aminosavak lebontása

6.1.1.1. Az aminosavak szerepe és jelentősége

Az aminosavak a szervezetben három lényeges feladatot töltenek be:

- a szervezet fehérjéinek építőkövei,
- energiaforrások, a glükoneogenezis útján glükózzá alakulhatnak, vagy beléphetnek a citrátkörbe,
- változatos funkciójú anyagok, hormonok, porfirinek, purinok, pirimidinek, koenzimek, alkaloidok prekursorai.

Heterotróf szervezetek elsődleges aminosavforrása a táplálékkal felvett fehérjék lebontásából származik. A különféle szervezetek aminosavigénye nagyon különböző. Az élőlényeknek a fehérjéket felépítő aminosavakból csak egy részt kell külső forrásból megszerezniük (esszenciális aminosavak), a többi aminosav a szervezetükben szintetizálódik (nem esszenciális aminosavak). A következő összeállítás (6.1. táblázat) az aminosavak csoportosítását tartalmazza az ember táplálkozási igényeinek megfelelően.

Esszenciálisnak tekinthetők azok az aminosavak, amelyek hiánya fiatal állatok vagy a gyermek növekedésében zavart okozhatnak. Táplálkozás-élettani szempontból azokat az aminosavakat soroljuk ide, amelyeket a szervezetnek külső forrásból, a táplálék útján kell megszereznie. Biokémiai tekintetben azokat az aminosavakat tekintjük esszenciálisnak, amelyek szintéziséhez a szervezetben nincs meg a szükséges enzimkészlet. A két fogalom nem azonos, amit a hisztidin és az arginin esetén lehet bemutatni. Hisztidint az emberi szervezet nem képes ugyan szintetizálni, de a baktériumok tevékenysége folytán a szervezet csaknem teljes igénye kielégül. Az argininszintézis viszont kellő intenzitással folyik a májban, de a többi szövet számára hozzáférhetetlen, mert azonnal karbamid keletkezik belőle, ami a vizelettel kiürül.

6.1. táblázat. *Aminosavak csoportosítása az ember táplálkozási igényeinek megfelelően*

Esszenciális		Szemiesszenciális	Nem esszenciális
Lizin	(0,8, 6,0)*	Arginin**	Glutaminsav
Triptofán***	(0,3, 1,2)	Tirozin***	Aszparaginsav
Fenil-alanin	(1,1, 4,2)	Cisztein***	Alanin
Metionin	(1,1, 3,6)	Glicin**	Prolin
Treonin	(0,5, 3,6)	Szerin****	
Leucin	(1,1, 5,4)	Hisztidin	
Izoleucin	(0,7, 3,0)		
Valin	(0,8, 4,2)		

* Az ember minimális és optimális igénye, g/nap.

** Tyúknak, pulykának esszenciális.

*** A tirozin csökkenti, de nem elégíti ki a fenil-alanin-igényt; a cisztein csökkenti, de nem elégíti ki a metioninigényt; a nikotinsav csökkenti, de nem pótolja a triptofánigényt.

**** A szerin csökkenti vagy kielégíti a glicinigényt.

A tápanyagok az aminosavigény kielégítése szempontjából különböző értékűek. Az aminosavigény kielégítése függ a benne lévő fehérjék minőségétől és a tápanyagokban lévő egyéb, a szervezet energiaigényét is kielégítő anyagok minőségétől és mennyiségétől. Általában az állati eredetű fehérjék (hús, tej, tojás stb.) kellő mennyiségben és megfelelő arányban tartalmazznak esszenciális aminosavakat (komplett fehérjék), míg a növényi eredetűek egy része egyes aminosavakat a szükségesnél kisebb mennyiségben tartalmaz.

Egy 70 kg tömegű ember napi fehérjekörforgása (turnovere) normális táplálkozás esetén kb. 400 g. Ennek kb. 1/4-e az aminosavak oxidatív lebontására használdik, a fennmaradó 3/4 rész pedig az aminosavak endogén reciklizációjára (más aminosavak és fehérjék bioszintézisére) fordítódik. Fehérjeéhezés esetén az ember napi nitrogénürítése kb. 5 g, ami mintegy 30 g szöveti fehérje lebomlásából és oxidatív átalakításából származik.

A fehérjehiányos táplálkozáskor legsúlyosabb az az eset, ha a fehérjehiány energiahiánnyal is párosul. Energetikailag kielégítő, csupán fehérjetartalmát tekintve hiányos táplálék következménye a kwashiorkór, ami sok tekintetben emlékeztet a metioninhiányos táplálkozás tüneteire. Rendszerint a hosszú ideig anyatejen nevelt gyermek elválasztása

után következnek be. Az elsősorban vitaminhiánynak tekintett pellagra kialakulását fokozza a nem teljes értékű, csekély triptofántartalmú fehérjékkel való táplálkozás (nikotinsav-amid keletkezésének gátoltsága triptofánból).

A különféle szervezetek aminosavigényét a következő feltételek határozzák meg:

- az aminosav-lebontás örökletesen kialakult útvonalai,
- a környezetből megszerzett aminosavkészlet felhasználhatósága, a komplett és inkomplett fehérjék aránya,
- a táplálkozási függőség mértéke (esszenciális aminosavigény),
- az aminosavak felhasználásával összefüggő energiaigény,
- a fehérjeszintézis aminosavigénye,
- az egyéb biomolekulák szintéziséhez felhasznált aminosavak mennyisége.

A növények minden szükséges aminosavat szintetizálnak, és aminosavakat gyakorlatilag nem ürítenek. A baktériumok némelyike szerves anyagból szintetizál aminosavat, míg mások szén- és nitrogénforrásként egyes aminosavakat vagy aminosavak elegyét igénylik. A különféle tápanyagok fehérjetartalmát és biológiai értékét a 6.2. táblázat tartalmazza.

6.2. táblázat. *Egyes tápanyagok fehérjetartalma és biológiai értéke*

	Fehérje %	Biológiai érték % *
Tojás	13,0	94
Tehéntej	3,5	85
Marhahús	20,6	74
Halhús	16,0	76
Szója	41,5	73
Burgonya	2,5	67
Borsó	22,5	64
Búzaliszt	14,0	52

* A FAO adatai alapján számított, elvileg „teljes értékű” fehérjére vonatkoztatva.

6.1.1.2. A fehérjék emésztése

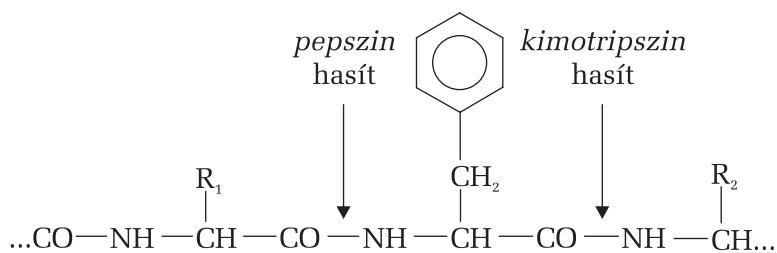
A szabad aminosavak a táplálékban csak csekély mennyiségben fordulnak elő, többségük a szervezet számára felhasználható fehérjékben, peptidkötéssel összekapcsolva található. Az aminosavak képesek

felszívódni a tápcsatorna hámsejtjein keresztül, a fehérjéknek azonban a felszívódást megelőzően aminosavakra kell hidrolizálniuk. A táplálékfehérjék emésztése extracelluláris folyamat. A mikroorganizmusok, a szaprofita és ragadozó növények, valamint a gombák változatos összetételű *proteináz* elegyet bocsátanak a környezetükbe; táplálékfehérjéiket hidrolizálják, és a keletkezett termékeket a sejtek abszorbeálják.

A proteolitikus enzimek attól függően, hogy a polipeptidláncot hol hasítják, két csoportba sorolhatók: a *peptidázok* (*exopeptidázok*) egy-egy aminosav lehasítását végzik a láncvégen, míg a *proteinázok* (*endopeptidázok*) specifitásuknak megfelelően a láncon belüli kötéseket hasítják. Fehérjebontó enzimek minden sejtben előfordulnak. Rendkívül sokrétű feladataik az alábbiak:

- szabályozzák a sejtek fehérjeállományának összetételét, a szükségteleneket lebontják, hogy a keletkező aminosavakból a sejt az igényeinek megfelelő fehérjét felépíthesse,
- a szignálpeptid lehasításával lehetővé teszik, hogy a szekretori- kus fehérjék a sejtből kijussanak,
- aktiválják az inaktív zimogéneket, és inaktiválják a funkciójukat betöltött, biológiailag aktív fehérjéket,
- kiküszöbölik a defektív fehérjéket,
- éhezés esetén lebontják a fehérjéket a szervezet energiaigényének a kielégítésére.

A gerincesek fehérjeemésztése a tápcsatornában folyik. Az emésztés a gyomorban kezdődik, ahol a gyomornyálkahártya sósavtermeléssel igen savas közeget létesít (pH=1–2), ami egyrészt a táplálékfehérjék denaturációját segíti elő, másrészt a pepszin működéséhez szükséges savas környezetet biztosítja. A pepszin csakúgy, mint a fehérjeemésztésben résztvevő többi proteolitikus enzim, inaktív, zimogén alakban keletkezik. A proenzim, a pepszinogén molekulatömege 40 400, aktiválásakor az N-terminálisáról egy kb. 7000 molekulatömegű, 44 tagú polipeptid hasad le, amely a pepszinogén 20 bázikus aminosavrészéből 16-ot tartalmaz, melynek következtében a pepszinben mindössze 4 bázikus aminosav marad vissza. A pepszin széles specifitású, leginkább az aromás és más apoláros oldalláncok alkotta peptidkötéseket (leucin, metionin) hasítja. Az aktív centrum kötőhelye eltér a többi szerin-proteináz felépítésétől. Míg a kimotripszin specifitása a kérdéses aminosav karbonilfunkciójára vonatkozik, ezzel szemben a pepszin az NH-csoporttal létesít kapcsolatot (6.1. ábra).



6.1. ábra. A pepszin és a kimotripszin hasításának helye a fehérjeláncban

A gyomrot elhagyva, a részben emésztett fehérjék a vékonybélbe jutnak, ahol a pH közel neutrális. A fehérjék emésztését itt a pankreasban zimogén alakban termelődő *kimotripszinogén*, *tripszinogén*, a *prokarboxipeptidáz A* és *B* és a *proelasztáz* aktivált alakja folytatja. A vékonybélben az *endo*- és *exo*peptidázok elegye a részlegesen bontott fehérjéket az aminosavakig hidrolizálja. Az aminosavakat a vékonybél hámja szívja fel energiaigényes, aktív transzport útján. A felszívódást követően az aminosavak a véráram közvetítésével a szövetekbe jutnak, ahol bekapcsolódnak az anyagcserébe. A sejtek anyagcserepoolja a szöveti fehérjék lebomlásából származó aminosavakkal is kiegészül. Az intracelluláris fehérjelebontást a *katepszinek* gyűjtőnéven ismert *proteinázok* végzik.

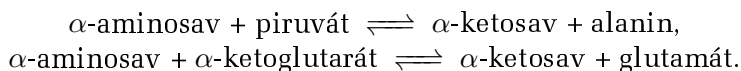
A *proteinázok* a működésükhöz szükséges optimális feltételeket tekintve savasak, neutrálisak és bázikusak. A funkciós csoportokat tekintve egy részük ún. *szerin-proteináz*, másokban szulfhidrilcsoport vesz részt az acil-enzim kialakításában, vagy fématom szükséges a katalitikus centrumhoz, és végül bizonyos *proteinázokban* aszpartil- vagy glutamil-oldallánc karboxilcsoportja adja a funkciós csoportot.

A növényi táplálékok egy részében polipeptid- vagy fehérjetermészetű *proteinázinhibitorok* is vannak, melyek a *tripszin* és a *kimotripszin* működését gátolva csökkentik a táplálék fehérjéinek felhasználhatóságát. Az inhibitorok főzéssel, vagy másfajta hőkezeléssel inaktíválhatók.

6.1.1.3. Az aminosavak lebontásának közös reakciói

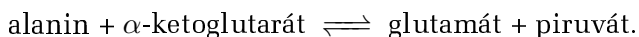
Az aminosavak katabolikus átalakulását multienzimrendszerek teszik lehetővé. Az α -szénatom szubsztituenseinek lehasítása közös kémiai mechanizmussal történik. Az *aminosavak szénláncának katabolizmusa a citrátkör útján valósul meg*, amihez előbb az NH_2 -csoportot

el kell távolítani. Az aminocsoport eltávolítása az emlősszervezetekben a májban és a vesében történik transzaminálás vagy oxidatív dezaminálás segítségével. A lehasított NH_2 -csoportot a gerincesek karbamid, húgysav, vagy NH_4^+ alakban ürítik. Az aminosavak lebontásakor az NH_2 -csoport nem minden esetben ürül ki a szervezetből. Az aminosavak egy ketosavval másik aminosavat képezhetnek, miközben maguk ketosavvá alakulnak:

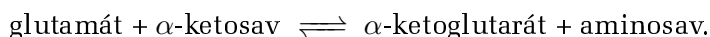


A folyamatot *transzaminálásnak*, a résztvevő enzimeket pedig *transzaminázoknak* nevezzük. A transzaminálási reakciók egyensúlyi állandója közel 1, így a folyamatok teljesen reverzibilisek. Lehetővé teszi, hogy a szervezet a nitrogénnel takarékoskodjon, és az energiaigény kielégítése érdekében az aminosavak szénláncá nitrogénvesztés nélkül felhasználódjék.

A transzaminálási reakcióban aminoakceptorként 3 ketosav, a piruvát, az oxálacetát és az α -ketoglutarát jön elsősorban számításba, míg donor az aminosavak többsége lehet. A *transzaminázokat* az aminodonor szerint nevezzük el: az *alanin transzamináz* az alaninból szállítja az aminocsoportot:



A nitrogén-anyagcserében központi helyet elfoglaló *glutamát transzamináz* a következő reakciót katalizálja:

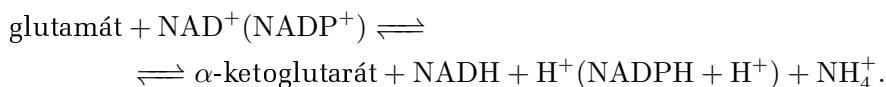


A reakció az ellentétes irányban is lejátszódik, és az *alanin transzaminázzal* együtt lehetővé teszi, hogy az aminonitrogén a glutamátban tárolódjon. A glutamát (α -ketoglutarát) az NH_2 -csoport terminális akceptora, mivel ez vesz részt a karbamid szintézisében is. A *leucin*, a *tirozin* és az egyéb *aminosav transzaminázok* szerepe kevésbé általános.

A *transzaminázok* koenzimje a piridoxál-foszfát (B_6 -vitamin alakja a piridoxin) nem kovalensen kapcsolódik az enzim fehérjéjéhez. A katalízis folyamán az aldehidcsoport reverzibilisen aminná alakul. A B_6 -vitamin koenzim alakjai lehetnek a piridoxin, a piridoxál-foszfát és a piridoxamin-foszfát.

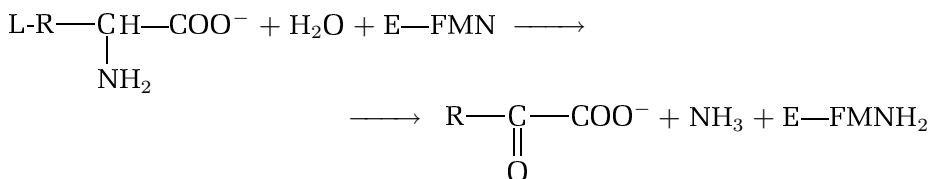
A transzaminálás feladata kettős: visszatartja és más aminosavba építi be az aminosav aminonitrogénjét, és olyan vegyületté alakítja át az aminosav szénláncát, hogy az a trikarbonsav ciklus átalakulási folyamatába beléphessen.

Az aminocsoportok eltávolítása oxidatív dezaminálás során is bekövetkezhet. Egyes baktériumokban a glutamát gyorsan dezaminálódik a glutamát dehidrogenáz enzim közreműködésével, ami NAD^+ vagy NADP^+ koenzim segítségével egyidejűleg dehidrogenálja és dezaminálja a glutamátot:



A glutamát az egyetlen olyan aminosav, aminek dehidrogenáza fiziológias körülmények között kellő intenzitással működik. A glutamátnak központi szerepe van a transzaminálás révén az aminonitrogén gyűjtésében, a glutamát dehidrogenáz pedig központi jelentőségű a nitrogén-egyensúly kialakításában.

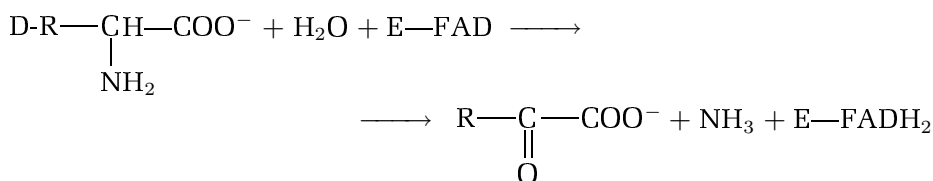
Oxidatív dezaminálást katalizálnak az *L*-aminosav oxidázok, de működésük alárendelt jelentőségű. Kofaktorként flavin-mononukleotidot tartalmaznak, és a következő reakciót katalizálják (6.2. ábra):



6.2. ábra. Az *L*-aminosav oxidázok által katalizált reakció

Az enzim a máj endoplazmatikus retikulumában található, ahol főként a lizin dezaminálását végzi. Szintén a májsejtekben fordul elő a *D*-aminosav oxidáz, melynek funkciója a *D*-aminosavak oxidációja. A táplálékkal vagy a bakteriális tevékenység révén kerül a szervezetbe. Koenzimje a flavin-adenin-dinukleotid, amely a 6.3. ábrán látható reakció katalízisében vesz részt.

A *D*-aminosav oxidáz katalizálja a májban a glicin oxidációját glioxiláttá.



6.3. ábra. A D-aminosav oxidázok által katalizált reakció

Az aminosavak lebontásának egy másik útja a *dekarboxilálás*. Az α -COOH eltávolításával biogén aminok keletkeznek, melyek számos speciális biológiai funkciót betöltő vegyület prekursorai.

6.1.1.4. Az aminosavak szénláncának lebomlása a trikarbonsav ciklusban

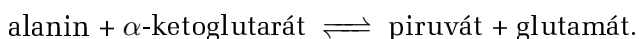
Az aminosavak szénláncá szinte teljes egészében a trikarbonsav ciklus útján alakul át végtermékké, szén-dioxiddá és vízzé. A 20 fehérjealkotó aminosav egyedi, egyszerűbb-bonyolultabb úton válik a ciklus intermedierévé. Az aminosavak katabolizmusának kapcsolatát a trikarbonsav ciklussal a 6.4. ábra mutatja.

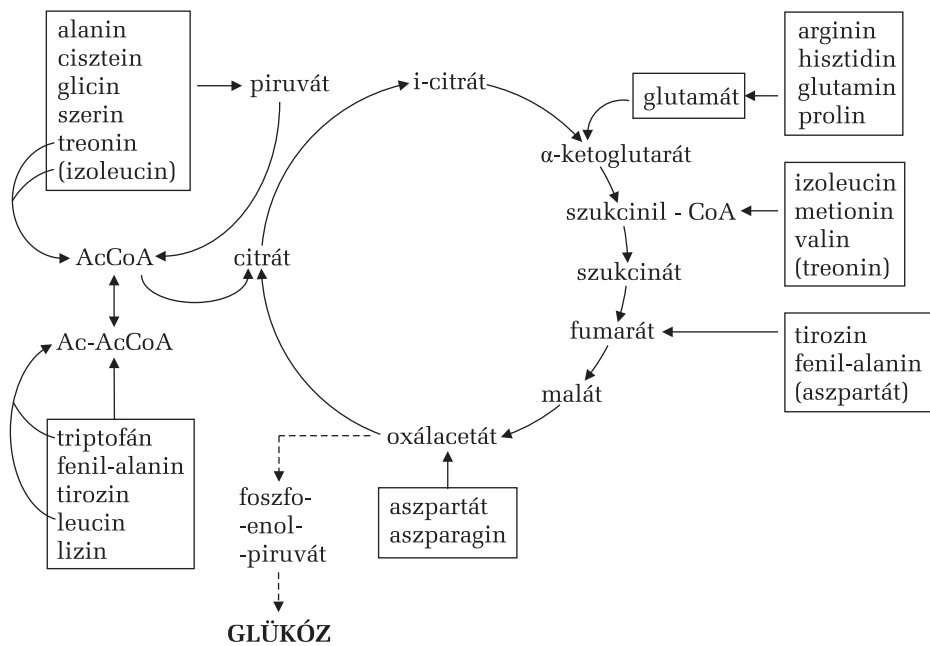
A különböző aminosavak különböző helyeken lépnek be a citrát-körbe.

– *Az acetyl-CoA útvonal:* 11 aminosav acetyl-CoA-vá bomlik le, és így kapcsolódik be a citrát-szintézisbe. Ezen belül két lehetőség van az aminosavak átalakítására: az alanin, a glicin, a szerin, a cisztein, az izoleucin és a treonin piruváttá alakul, és a *piruvát dehidrogenáz* komplex segítségével AcCoA-vá, a leucin, a lizin, a triptofán, a fenilalanin és a tirozin egy része pedig acetoacetyl-CoA-vá válik, amelyből AcCoA keletkezik.

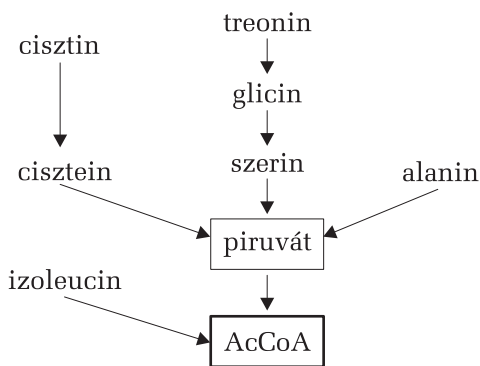
– *A piruváttá alakuló aminosavak:* az ide tartozó aminosavak katabolizmusá két irányba mehet. A keletkező piruvát részt vehet a glükoneogenezisben, vagy oxidálódhat a trikarbonsav ciklus révén. Az aminosavak bekapcsolódását a trikarbonsav ciklusba a piruváton keresztül a 6.5. ábra tartalmazza.

Az egyes aminosavak átalakulása a következőképpen megy végbe: Az *alanin transzamináz* segítségével, α -ketoglutarát jelenlétében, közvetlenül alakul piruváttá:





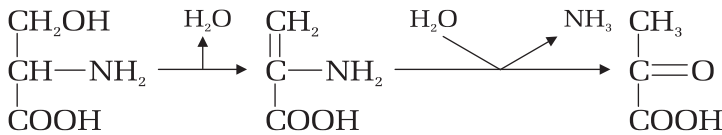
6.4. ábra. Az aminosavak katabolizmusának kapcsolata a trikarbonsav ciklussal. A vastag szaggatott nyíl a glükoneogenezishez vezető útvonalat jelöli



6.5. ábra. Az aminosavak bekapcsolódása a trikarbonsav ciklusba piruváton (AcCoA) keresztül

A *cisztein* piruváttá alakulására háromféle lehetőség van, mely átalakulásokba a cisztin ciszteinné való redukciója után kapcsolódhat be. A *cisztation- γ -liáz* az NH_3 -at és a H_2S -t távolítja el a ciszteinből. A merkapto-piruvát keletkezésében, *transzamináz* reakcióban, az α -ketoglutarát az aminoakceptor. A harmadik útvonalon keletkező cisztein-szulfinsav dekarboxilálás útján hipotaurinná, majd további oxidáció hatására taurinná alakul. Ez piruváttal transzaminálás útján alanint képezhet, és végül szulfát keletkezik. A ciszteinből H_2S alakban kivasadt kén először szulfittá, majd a májban a *szulfít oxidáz* hatására szulfáttá oxidálódik. A szulfát egy része a vizelettel kiürül, fennmaradó része pedig 3-adenozin-5-foszfoszulfáttá, ún. aktív szulfáttá alakul. Ez különféle alkoholokkal, fenolokkal, szteroidokkal vagy poliszacharidokkal észterkötést létesíthet, így oldékonyságukat megnövelvén elősegíti egyrészt a szervezeten belüli transzportjukat, másrészt kiürülésüket a szervezetből.

A *szerin* piruváttá a *szerin dehidratáz* alakítja át (6.6. ábra):



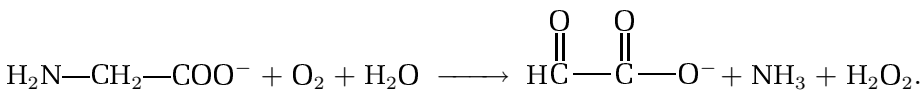
6.6. ábra. A *szerin* piruváttá történő átalakítása

A *szerin* és a *treonin dehidratáz* működése legalább két részreakcióból áll. Először a β -szénatomon vízvesztés történik, és az ezáltal keletkező instabil vegyület víz felvételével stabilizálódik.

A *glicin*-átalakulás során, a *glicin szintetáz* részvételével, reverzibilis oxidatív lebomlás útján, CO_2 , NH_3 és tetrahidrofolát koenzim (FH_4) $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -metilén-származéka keletkezik:



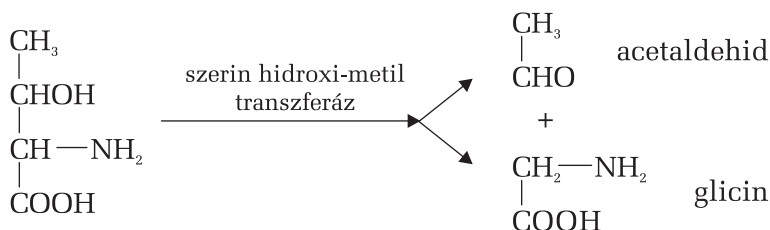
A *glicin* lebomlásának másik lehetősége a *glicin oxidáz* útján történő átalakulás glioxiláttá (6.7. ábra):



6.7. ábra. A *glicin* átalakulása glioxiláttá

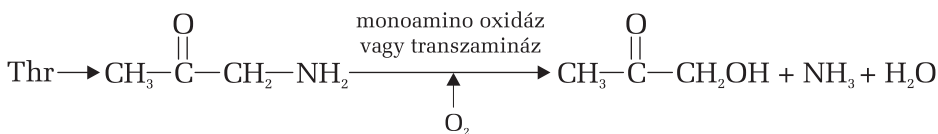
A glioxilát oxidációja révén az állati szervezetben oxalát keletkezik. Egészséges emberekben a glioxilát α -ketoglutaráttal kapcsolódva α -hidroxi- β -keto adipátot képez, és ilyen formában ürül ki a szervezetből. A glicin átalakulásának harmadik lehetősége a szerinhez kapcsolódik, ugyanis glicinből *szerin hidroxi-metil transzferáz* és N^5, N^{10} -metilén-tetrahydrofolát részvételével szerin keletkezik. A keletkezett szerin továbbalakulása piruváttá az előzőeknek megfelelően történik.

A *treonin* katabolikus lebontásának 3 útja ismert: a *szerin hidroxi-metil transzferáz* a treonint glicinre és acetaldehidre bontja. A szerin lebontásától eltérően egy C_2 -termék és acetaldehid keletkezik, ami nagyobb annál, hogy a THF-hez kötődhessen és további transzfer-reakciókban vegyen részt (6.8. ábra).



6.8. ábra. A *treonin* átalakulása acetaldehiddé és glicinné

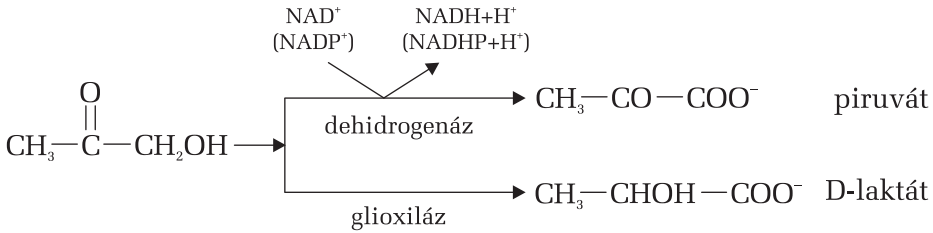
Az aminoaceton keletkezésének első lépése a *treonin* dekarboxilálása. Az így keletkezett vegyületből az aminocsoportot *monoamino oxidáz* vagy *transzamináz* távolítja el (6.9. ábra):



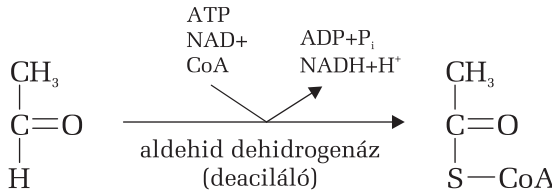
6.9. ábra. A *treonin* átalakulása aminoacetonná

Ezt követően a vegyület *dehidrogenáz* hatására piruváttá, vagy *glioxiláz* közbejöttével D-laktáttá alakul (6.10. ábra).

A *szerin hidroxi-metil transzferáz* reakció során keletkezett glicint ugyanez az enzim szerinné alakíthatja, így a *treonin*ből adott körülmények között szerin keletkezhethet, ami piruváttá alakulhat, és így részt vehet az AcCoA keletkezésében is. A reakció során a glicin mellett keletkezett acetaldehid az alábbiak szerint alakul át AcCoA-vá (6.11. ábra):

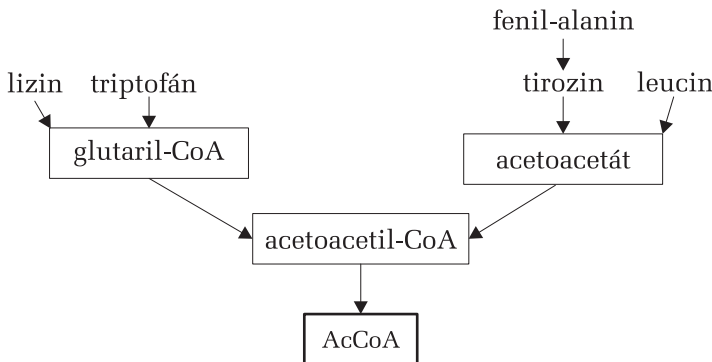


6.10. ábra. A treonin átalakulása piruváttá és D-laktáttá



6.11. ábra. Az acetaldehyd átalakulása AcCoA-vá

– Az *acetoacetyl-CoA*-vá alakuló aminosavak közé tartozik a leucin, a lizin, a triptofán, valamint a fenil-alanin és a tirozin szénláncának egy része. Minthogy a lebomlás intermediereként *acetoacetyl-CoA* (acetoacetát) keletkezik, az ide tartozó aminosavak ketogének (6.12. ábra). Az *acetoacetyl-CoA* és a szukcinil-CoA útvonalon átalakuló aminosavakat nevezhetjük „zsírszerűen” metabolizálóknak is, mert lebomlásuk egyes lépései hasonlóak a zsírsavak átalakulásához. Az ebbe a csoportba tartozó aminosavak mind esszenciálisak.



6.12. ábra. Az aminosavak bekapcsolódása a trikarbonsav ciklusba acetáton keresztül

A *fenil-alanin és a tirozin lebomlása*. A fenil-alanin lebomlásának első lépése, hogy a *fenil-alanin-4-monooxygenáz* részvételével tirozinná alakul. A tirozin *tirozin transzamináz* segítségével hidroxifenilpiruváttá alakul, amit a *hidroxifenilpiruvát oxygenáz* homogentizinsavvá alakít. Ezt követően a *homogentizinsav oxygenáz* a gyűrűt felhasítja, és maleilo-acetoacetát keletkezik. A keletkezett maleilo-acetoacetát *izomeráz* hatására alakul fumarilo-acetoacetáttá, amit a *fumarilo-acetoacetáz* két négy szénatomos termékre, fumarátra és acetoacetátra hasít. Az előbbi a trikarbonsav ciklus intermediere, és oda akadálytalanul bekapcsolódhat. Az acetoacetát szukcinil-CoA-val reagál, és acetoacetyl-CoA-ként folytatja anyagcseréjét.

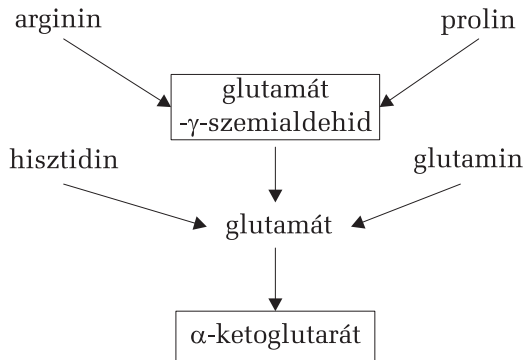
Az összes többi aminosavnál hasonló bonyolultságú folyamatok során történik a lebontás és az anyagcserébe történő belépés. Ennek részletes ismertetése nem tárgya az anyagnak.

A *leucin* lebomlása során négy szénatomból keletkezik acetoacetyl-CoA (ketogén aminosav), két szénatom pedig AcCoA-vá alakul. Az első lépésben transzaminálás útján az aminocsoport α -ketoglutaráttal reagál, és a leucinből α -keto-izokapronsav keletkezik. Több lépés útján β -hidroxib-metil-glutaril-CoA, a ketontestek és a szteroidszintézis prekursora keletkezik, mely az utolsó lépésben acetyl-CoA-vá és acetoacetáttá hidrolizál.

A *lizin* lebomlása igen komplex, mivel 6 szénatomjából négy acetoacetyl-CoA képzésében vesz részt (ketogén aminosav), míg 2 dekarboxilálás következtében szén-dioxiddá alakul. A többi aminosavhoz viszonyítva különleges problémát okoz az ϵ -aminocsoport eltávolítása, mert erre nincs megfelelő enzim. Az ϵ -aminocsoport eltávolítására 2 útvonal ismeretes: az egyikben gyűrűs közti termékek (piperidin karbonsavak, pipekolát) keletkeznek, a másik útvonalon a májban az ϵ -aminocsoport az α -ketoglutaráttal szacharopinná kondenzál. A lizin a két útvonal közös csomópontján amino-adipát-szemialdehiddé, végül acetoacetyl-CoA-vá alakul.

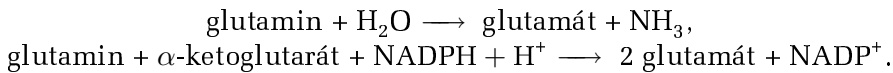
A *triptofán* a legnagyobb méretű aminosav, 11 szénatomot tartalmaz, amiből négy acetoacetyl-CoA-vá, kettő acetyl-CoA-vá, négy CO₂-dá, egy pedig formiáttá alakul.

– *Az α -ketoglutaráttá alakuló aminosavak*: Az α -ketoglutarát útján 5 aminosav, a glutamát, a glutamin, a prolin, a hisztidin és az arginin kapcsolódik be a trikarbonsav ciklusba (6.13. ábra):



6.13. ábra. Az aminosavak bekapcsolódása a trikarbonsav ciklusba az α -ketoglutaráton keresztül

A *glutamát* egyszerű transzaminálás útján lép be, a *glutamin* esetében viszont problémát jelent a savamid-csoport, amit vagy a vesében előforduló *glutamináz* hidrolizál, vagy α -ketoglutarát jelenlétében a *glutamát szintetáz* alakít glutamáttá:



Végül a glutamin transzaminálásban is részt vehet, így α -ketoglutarát-sav-amid keletkezik, ami hidrolizálhat α -ketoglutaráttá és ammóniává.

Az *arginin* az emlősök májában *argináz* hatására ornitinné alakul át, amely lépés lehetővé teszi emlősökben a karbamid keletkezését. Az *ornitin* δ -aminocsoportja oxidatív dezaminálás útján lehasad, és glutamát-szemialdehid keletkezik. Az ornitin *ornitin-ketosav transzamináz* részvételével is átadhatja a δ -NH₂-csoportját. A keletkező γ -glutamil-szemialdehid spontán n¹-pirrolin-5-karbonsavvá ciklizál, és a prolin lebomlásának megfelelő útvonalon alakul tovább.

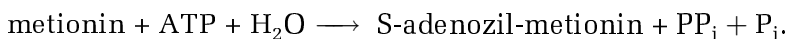
A *prolinból* oxidáció után n¹-pirrolin-5-karbonsav keletkezik, ami a NADH+H⁺-val működő specifikus *dehidrogenáz* hatására glutamáttá alakul, de kis mennyiségben glutamát-szemialdehid is létrejöhethet belőle. A hidroxiprolinból γ -hidroxiglutamát keletkezik, ami alaninra és glicinre hasad, és így alakul tovább.

A *hisztidin* glutamáttá alakulása azért figyelemre méltó, mert a gyűrű felhasadása következtében N-formimino-glutamát keletkezik. A formimino-csoportot tetrahydrofolát koenzimet tartalmazó enzim távolítja el. A reakció alkalmas a szervezet folsavellátottságának ellenőrzésére úgy,

hogy hisztidinterhelés után méri a vizeletben megjelenő N-formimino-glutamát mennyiségét.

– *Szukcinil-CoA útvonal*: A propionil-CoA, illetőleg a metil-malonil-CoA intermediereken keresztül 4 aminosav lebontása vezet szukcinil-CoA-hoz: a *valiné*, a *leuciné*, a kéntartalmú *metioniné*, valamint a *treonin* egy része is ezen az útvonalon alakul át. Ezen aminosavak lebontása soklépéses reakció útján valósul meg. Az átalakulási folyamatokra jellemző, hogy az NH₂-csoport eltávolítása után létrejövő ketosav dekarboxilálódik, majd CoA kapcsolódása után páratlan szénatomszámú zsírsavszármazék képződik, ami a β-oxidáció lépéseinek megfelelően addig rövidül, amíg C₃-méretű propionil-CoA keletkezik. Ez szén-dioxid felvételével szukcinil-CoA-vá válik, és a megfelelő helyen belép a trikarbonsav ciklusba.

A *metionin* katabolikus anyagcseréjével kapcsolatban két körülmény érdemel figyelmet. A kénnel az anyagcsere takarékosan bánik, ezért a metionin kénje lebomlásakor a ciszteinbe épül be. Figyelemre méltó az is, hogy ATP felhasználásával S-adenozil-metionin keletkezik, ami többféle metilálási folyamatban metildonor:



Megfelelő akceptor jelenlétében a metilcsoport a *homocisztein metil transzferáz* segítségével az akceptorra kerül, az adenzinrész lehasad, és a keletkezett homocisztein szerinrel kapcsolódva a *kéntartalmú aminosavak anyagcseréjének központi intermediérévé, cisztationná alakul*.

A cisztationból cisztein és α-keto-butirát keletkezik. Az α-keto-butirát dekarboxilálódik, és CoA-val kapcsolódva propionil-CoA-t hoz létre. A propionil-CoA páratlan szénatomszámú acil-CoA-származék, mely *propionil-CoA karboxiláz* segítségével és az ATP terminális foszfátja energiájának felhasználásával szén-dioxid beépítése útján metil-malonil-CoA-vá alakul. A keletkezett metil-malonil-CoA *racemáz* vagy *epimeráz* útján L-alakká racemizálódik (epimerizálódik), majd ebből a *metil-malonil-CoA mutáz* segítségével szukcinil-CoA. Ez utóbbi a *szukcinil-CoA szintetáz* katalizálta reakcióban CoA-vá és szukcináttá alakul, amely bekapcsolódik a citrátkörbe.

Az *izoleucin* és a *valin* katabolikus anyagcseréje rendkívül hasonló a metioninéhoz. A szénlánc elágazása miatt sok lépés szükséges a trikarbonsav ciklusba történő bekapcsolódásra alkalmas intermedier kialakulásához. Transzaminálás és dekarboxilálás után β-oxidációs lépés következik, és végül az izoleucinból propionil-CoA, a valinból pedig

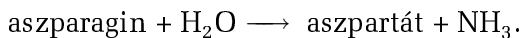
metil-malonil-CoA keletkezik. Kis mennyiségben ezen az úton az aszpartát is átalakulhat.

A *treonin* lebomlásának harmadik lehetősége az oxidatív dezaminálás a *treonin dehidratáz* segítségével, melynek eredményeként α -keto-butirát jön létre. Ez oxidatív dekarboxilálás útján CoA felhasználásával propionil-CoA-vá alakulhat, ami szukcinil-CoA alakban kapcsolódik a citrátkör folyamataihoz.

A folsavon és az S-adenozil metioninon kívül a B₁₂-vitamin származéka is közreműködhet a metilcsoport szállításában. A B₁₂-vitamint csak a mikroorganizmusok, különösen az anaerob szervezetek képesek szintetizálni. A táplálkozásból eredő B₁₂-vitaminhiány mégis igen ritka, mert a vitamin gyakorlatilag minden állati szövetben megtalálható. A kobalt vegyértékváltozásának lehetősége és a gyűrűben kialakult helyzete magyarázhatja azt, hogy a B₁₂-vitamin kémiaiilag inert metilcsoportok felvételére és leadására képes. Különösen gyorsan osztódó szövetek igénylik nagyobb mértékben a metilcsoportok felvételét, illetve leadását. A metil-malonil-CoA \rightarrow szukcinil-CoA átalakulás elősegíti, hogy az elágazó szénláncú aminosavak, továbbá a metionin és a treonin katabolizmusának termékei beléphessenek a citrátkörbe. Az 5-metil-kobalamin transzmetilálás útján közvetít a metil-tetrahidrofolát és a homocisztein között, ami a metionin keletkezését teszi lehetővé.

– *Fumarát útvonal*: fumarát útvonalon kapcsolódik be a citrátkörbe a *fenil-alanin* és a *triozin*, és lehetőség van ezen túl az *aszpartátból* keletkező fumarát bekapcsolódására is.

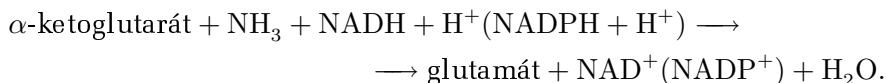
– *Oxálacetát útvonal*: az oxálacetát útvonalon az *aszpartát* és az *aszparagin* szénlánc bomlik le. Az aszparagin amidcsoportját az *aszparagináz* hidrolizálja:



Az aszpartát transzaminálás útján alakul oxálacetáttá, így a szénlánc teljes egészében bekapcsolódhat a trikarbonsav ciklusba, vagy részt vehet a glükóz szintézisében.

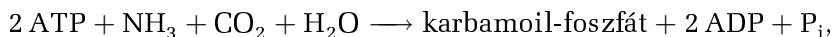
6.1.1.5. A nitrogén eltávolítása a szervezetből

A magasabb rendű szervezetek normális tápláltság esetén a fehérje-nitrogénnek csak egy részét ürítik, a nagyobb részét újra felhasználják *transzaminázok* és a *glutamát dehidrogenáz* útján:



Az aminosavakból és az egyéb nitrogéntartalmú vegyületekből származó nitrogén a szervezet életmódjától és fejlettségétől függően kerül kiürítésre. Az emlősök karbamidformában, a madarak és a hüllők húgysav alakban, a halak pedig ammónia, vagy trimetil-amin-oxid formájában ürítenek.

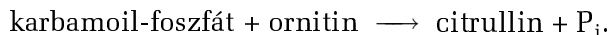
Az emlősök nitrogénürítése – a karbamid szintézise. Az emlősök nitrogénürítésének részleteit *Krebs* és *Henseleit* vizsgálták. Megállapították, hogy a májban két aminosavból származó egy-egy nitrogén és egy szén-dioxid kapcsolódik ATP felhasználásával karbamiddá. A két aminocsoport közül az első szabad ammónia formájában reagál, amikor a mitokondriumokban a glutamátból *glutamát dehidrogenáz* közreműködésével keletkezik. Az így keletkezett ammónia szén-dioxiddal kapcsolódik, és két ATP-foszfát felhasználásával a mitokondriummátrixban lévő *karbamoil-foszfát szintetáz* segítségével karbamoil-foszfáttá alakul:



vagy

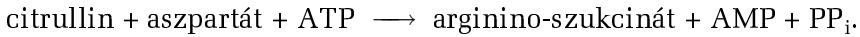


A reakció két nagy energiájú foszfát felhasználása következtében gyakorlatilag irreverzibilis. Az enzim Mg^{2+} -ionokat és alloszterikus aktivátorként N-acetil-glutamátot igényel. A *karbamoil-foszfát szintetáznak* mitokondriális alakján kívül ismeretes citoplazmatikus alakja is, ami a pirimidin-bioszintézisben szerepel. A karbamoil-foszfátot a mitokondriummátrixban lévő *ornitin karbamoil transzferáz* enzim a mitokondriumba speciális carrier révén bejutott ornitinhez kapcsolja és ezáltal citrullin keletkezik:

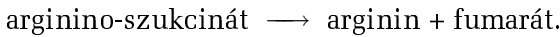


Az ornitin és a citrullin nem fehérjealkotó aminosavak. Emlősök szervezetében szabadon csak kis mennyiségben fordulnak elő, mint a karbamidciklus intermedierei. A karbamidciklus mitokondriális szakasza a citrullin szintézisével befejeződik, és a citrullin a citoszolba kerül.

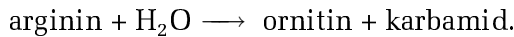
A karbamid második aminocsoportja az aszpartátból származik, ugyanis az *argino-szukcinát szintetáz* közbejöttével az aszpartát a citrullin karbonil szénatomjával kondenzál, és ATP felhasználásával arginino-szukcinát keletkezik:



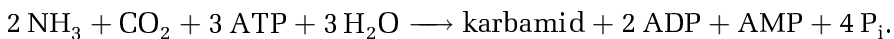
A pirofoszfát *pirofoszfatáz* hatására hidrolizál, ami a reakciót az arginino-szukcinát keletkezés irányába tolja el. Ezt követően az *arginino-szukcinát liáz* részvételével arginint és fumarátot hoz létre:



A fumarát carrier útján visszakerül a mitokondriumba. Ez a reakció-sor minden argininszintézisre képes szervezetre jellemző. Az emlősök májában viszont jelentős mennyiségű *argináz* enzim van jelen, ami az arginint nagy sebességgel ornitinra és karbamidra bontja:

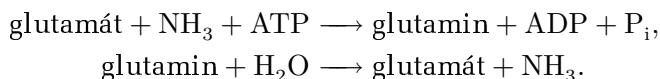


Az *argináz* enzim 4 alegységből áll, melyek szorosan kötnek egy-egy Mn^{2+} -iont. Működésüknek tudható be, hogy az emlősök szervezetében nincs nettó argininszintézis, így ez az aminosav esszenciálisnak-szemiesszenciálisnak tekinthető. Az *argináz* működése folytán keletkezett karbamid a vérárammal a vesébe jut, és a vizelettel ürül. Az ornitin megfelelő transzportrendszer révén visszajut a mitokondriumba, és ismét citrullinná alakul. Egy-egy ciklus során egy mol karbamid keletkezik, amihez 3 ATP-foszfátkötés hidrolízise szolgáltatja a szükséges energiát:



A *karbamidürítés rendkívül drága a szervezetnek*, mivel egy nitrogén ürítése 1,5 ATP felhasználását igényli. Ezt az energiát azonban mégis be kell fektetni, mivel a szervezetnek a mérgező ammóniát el kell távolítani. A karbamidciklus és a citrátkör kapcsolatát az oxálacetátból képződő aszpartát és az argino-szukcinátról lehasadó fumarát jelenti.

Az emlősök ammóniumion formában (NH_4^+) is üríthetnek ammóniát. A glutamát *glutamát szintetáz* hatására a májban ammóniát vesz fel, amit a keletkezett glutamin a *glutamináz* hatására a vesében lead:



6.1.1.6. Az aminosav-lebontás és a nitrogénürítés sémája

A fehérjéket a fehérjebontó enzimek hidrolizálják aminosavakká, melyek lebontásakor az első lépés az aminocsoport eltávolítása transzaminálással, vagy dezaminálással. Az aminocsoport vagy közvetlenül más aminosavak képzésében vesz részt *transzaminázok* segítségével, vagy a *dezaminázok* ammóniává alakítják. Az ammóniát a glutamát veszi fel, és a nitrogén benne tárolódik mindaddig, amíg a szervezet fel nem használja, vagy amíg a májban karbamiddá nem alakul, és el nem hagyja a szervezetet. Bőséges fehérjetáplálkozás esetén a vizelet összes nitrogéntartalmának 75–80%-a karbamid, amely arány kb. 55–60%-ra csökken a fehérjeszegény táplálkozás során. Éhezéskor újra megemelkedik a karbamid-N a szervezetben, mert a szervezet energiatermelésre, illetve szénhidrátképzésre saját fehérjéit használja.

6.2. Az aminosavak szintézise

A szénnél kisebb mennyiségű, de ugyanolyan jelentőségű a biomolekulák felépítésében a nitrogén. Nagyobb része az aminosavakban és fehérjékben, kisebb, de jelentékeny mennyisége nukleinsavakban található. Az aminosavak szintézisének tanulmányozása során elsősorban az alábbiak érdekelnek bennünket:

- hogyan épül be a nitrogén a biomolekulákba, melyek a nitrogénfixálás alapvető lépései,
- hogyan keletkeznek aminosavak a különféle fejlettségű szervezetekben, mivel az élőlények nem egyformán rendelkeznek a szintézis képességével,
- az aminosavakból milyen egyéb, az élő szervezet működéséhez nélkülözhetetlen vegyületek keletkeznek.

Nitrogénigényüket tekintve még a legegyszerűbb mikroorganizmusok is különbözők. Egyesek pl. ammóniát képesek felhasználni a különféle biomolekulák felépítésére, mások viszont csak akkor fejlődnek, ha aminosavakat, vagy más, szerves formában kötött nitrogént adunk a táptalajhoz. A növények jó része nitritet, vagy nitrátot használ fel

a nitrogénvegyületek előállítására, míg a hüvelyesek a gyökérgumóikban szimbiózisban élő mikroorganizmusokkal együttműködve a légköri nitrogén felhasználására is képesek.

A magasabb rendű állatok csupán az ammóniumiont képesek a nem esszenciális aminosavak szintézisére felhasználni, de azt is csak korlátozott mennyiségben. Az individuális aminosavak szintézise a lebontáshoz hasonlóan egyedi útvonalakon történik. A nem esszenciális aminosavak általában egyszerűbb útvonalon keletkeznek, míg az esszenciális aminosavak némelyikének keletkezése bonyolult, több mint 10 résztvevőből álló multienzimrendszer közreműködésére van szükség a szintézishez. A biológiai célokra felhasználható nitrogén mennyisége korlátozott; a korlátozást azok a biokémiai folyamatok jelentik, amelyeken keresztül a légköri nitrogén bejuthat a bioszférába.

6.2.1. A nitrogénfixálás mechanizmusa

A légköri nitrogén megkötésében csaknem 10 000 fajta hüvelyes és 250 másfajta növény vesz részt a gyökereik gumóiban élő mikroorganizmusokkal együttműködve. Ez a folyamat a *szimbiotikus nitrogénfixálás*. A nitrogénmolekula rendkívül stabil, laboratóriumi körülmények között nehezen redukálható, a folyamat még katalizátor jelenlétében is igen sok energiát igényel. Nehéz megérteni, hogy a kémiailag inert nitrogénmolekula hogyan képez olyan kapcsolatot az enzimekkel, hogy a két nitrogénatom közötti kötés felhasad, és más elemekkel létesít kötést. Nehéz hüvelyesek gumóiból olyan egyszerű rendszert, pl. sejtmentes kivonatot előállítani, amiben a nitrogénfixálás részletei tanulmányozhatók, mert sem a gazdanövény, sem a szimbiota mikroorganizmus egyedül nem képes a nitrogén megkötésére.

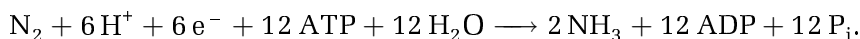
A fixáló mechanizmus a mikroorganizmusokban van, de működéséhez néhány anyagot a gazdanövényből igényelnek. A primitív kékeszöld algák, az egyes talajbaktériumok, a fotoszintetikus baktériumok és mások, a gazdanövény segítségével nélkül, önmagukban is képesek a légköri nitrogén megkötésére. A fixáló rendszerekben közönséges légköri nyomáson a rendszer nitrogénnel van telítve. A fixálást különféle gázok – N_2O , H_2 , CO és különösen a hármas kötést tartalmazó vegyületek (acetilén, HCN és azidok) – kompetitíve gátolják. A hatvanas évek elején *Mortenson Clostridium pasteurianum*ból olyan sejtmentes kivonatot állított elő, amely megfelelő elektrondonor és ATP jelenlétében nitrogént

fixált. Hidrogénakceptorként acetilént alkalmaztak, és a keletkezett etilént gázkromatográfiás eljárással mutatták ki. A *nitrogenáz* működése során a keletkező ammónia az első stabilis, fixált termék. A vizsgálatokat csak teljesen oxigénmentes közegben lehet végezni, mert a *nitrogenáz* rendszer is és a nitrogénfixáló baktériumok is nagyon érzékenyek az oxigénre.

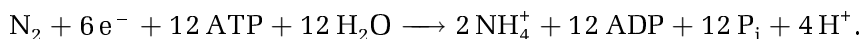
A fixáló rendszer lényeges eleme a baktériumokban a ferredoxin, ami 7 nem-hem vasatomot és ugyanannyi savlabilis ként tartalmaz. Igen elektronegatív fehérje, redoxpotenciálja $-0,43$ V.

A *nitrogenáz* rendszer két, önmagában nem aktív, aránylag sok ciszteint tartalmazó fehérjekomplex. A Mo-Fe-fehérje két alegységből áll. Két molibdénatomot, 32 vasatomot és 25–30 savlabilis ként tartalmaz. A komplex másik tagja csak vasat tartalmaz; molekuláris aránya a Mo-Fe-fehérjékhez 2:1. A két fehérjéhez kapcsolódó kén H_2S alakban van a ciszteinnel egyező mennyiségben.

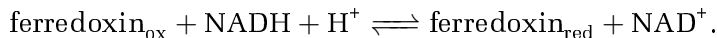
Egy-egy elektron transzformációja 2 ATP-t igényel, vagyis a $H_2 \rightarrow 2 H^+ + 2 e^-$ reakcióhoz 4 ATP szükséges, tehát a N_2 redukciója a következő alakban írható fel:



Amennyiben nem vesszük figyelembe az ADP hidrolíziséhez szükséges vízigényt, a nitrogén redukcióját az alábbi alakban is írhatjuk:



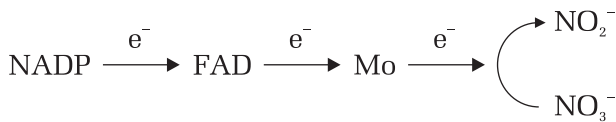
Az ATP részvételének mechanizmusa még nem tisztázott. Feltételezések szerint a Fe-fehérje konformációját úgy szabályozza, hogy az a Mo-Fe-fehérje oxidált alakjával kapcsolódhasson, és lehetővé tegye az elektron átvitelét a Mo-Fe-fehérjéhez kötött molekuláris nitrogén felé. Az oxidált ferredoxint vagy a *piruvát dehidrogenáz* rendszer redukálja, vagy a *NADH-ferredoxin reduktáz* segítségével regenerálódik:



Az ammónia formájában megkötött nitrogén alkalmas lenne az aminosavak aminocsoportjának képzésére. A talajban élő nitrifikáló baktériumok energiaigényük fedezése érdekében az ammóniát csaknem teljes mennyiségben nitritté, majd nitráttá oxidálják. Ezt a folyamatot *nitrifikálásnak* hívjuk. Az ammónia oxidációja két szakaszban történik:

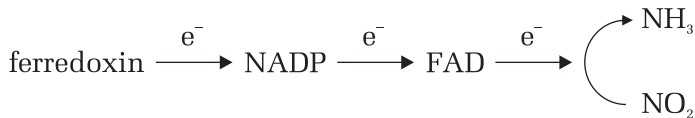
a *Nitrosomonas* pl. az ammónia hidrogénjét üzemanyagként hasznosítja, és az ammóniát nitríté alakítja. Sejtjeiben az elektrontranszportlánc-hoz hasonló felépítésű rendszer a hidrogént az *ammónia dehidrogenáz* rendszertől a citokromokon keresztül a molekuláris oxigénhez szállítja. A folyamat foszforilálással kapcsolódik, és ATP keletkezik. A *Nitrobacter* folytatja az oxidációt, és a nitritből nitrát keletkezik. Vannak olyan mikroorganizmusok is, amelyek a nitrát egy részét ismét molekuláris nitrogénné alakítják, tehát csökkentik a magasabb rendű szervezetek számára a talajból felvehető nitrogénvegyületek mennyiségét. Ezt a folyamatot *denitrifikálásnak* hívjuk.

A növények a nitrogént nitrát alakjában veszik fel a talajból. A nitrát felhasználását az előbbiekkal ellentétes folyamat teszi lehetővé, amikor a nitrát nitrit keletkezése közben ammóniává redukálódik. Az első lépést a növényvilágban elterjedt *nitrát redukáz* katalizálja (6.14. ábra):



6.14. ábra. A nitrát átalakítása nitritté

A FAD-tartalmú enzimből a molibdén szerepe az, hogy ciklikus vegyértékváltozás ($\text{Mo}^{5+}\text{Mo}^{6+}$) útján segítse a nitrát redukcióját. A nitrit további redukciójához ferredoxin szükséges, ami a fotoszintézis során fény hatására redukálódik. A nitrit redukcióját a következő egyenlet szemlélteti (6.15. ábra):



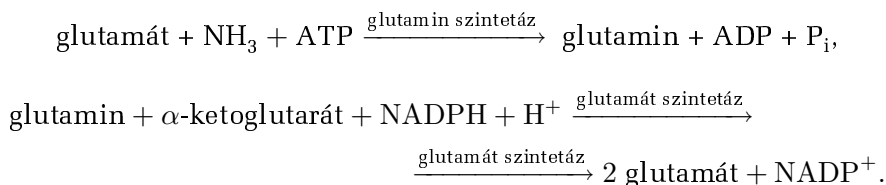
6.15. ábra. A nitrit átalakítása ammóniává

A reakció során keletkezett ammónia ketosavakkal, pl. α -ketoglutaráttal reagál. A keletkező glutamát a növények aminosav-szintézisének első prekuzora, ami transzaminálás útján lehetővé teszi a többi aminosav szintézisét.

6.2.2. A nem esszenciális aminosavak bioszintézise

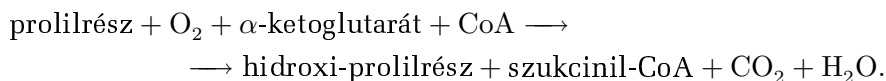
6.2.2.1. A glutamát, a glutamin, a prolin és a hidroxiprolin bioszintézise

A nem esszenciális aminosavak szintézise általában egyszerű, kevés lépésből álló reakciósor. A glutamát, a glutamin és a prolin keletkezése szoros kapcsolatban áll egymással. Glutamát keletkezik transzaminálás útján α -ketoglutarátból és valamilyen más aminosavból. Keletkezésének másik útja az α -ketoglutarát aminálása *glutamát dehidrogenáz* segítségével. Az utóbbi reakció különösen azért jelentős, mert az élőlények nagy részében ez a reakció teszi lehetővé, hogy az ammónia közvetlenül bekapcsolódhasson az aminosav-anyagcserébe. Glutamin *glutamin szintetáz* segítségével és ATP felhasználásával keletkezhet egy komplex reakcióban, melynek közti terméke a γ -glutamil-foszfát. A *glutamil szintetáz* a *glutamát szintetázzal* együttműködve biztosítja, hogy a szabad ammónia a glutamát sokféle célra felhasználható α -aminocsoportjává váljék:



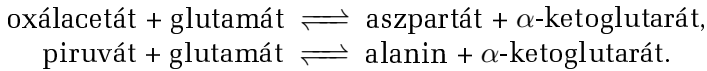
A prolin szintézise glutamátból indul ki, melynek során a glutamát γ -COOH-csoportjának aldehiddé kell alakulnia. Az átalakulásnak a prolin alloszterikus inhibitora; a szintézis intermedierei egyébként egyeznek a lebontáséival. Ez egyike azon ritka folyamatoknak, ahol a lebontás és a szintézis ugyanazon folyamatok megfordításaként zajlik, a reakciókat azonban más enzimek katalizálják. A redukció valószínűleg úgy történik, hogy a karboxilcsoport először ATP foszfátjának felhasználásával foszforilálódik, és a nagy energiájú csoport NADH+H⁺-val vagy NADPH+H⁺-val reagál.

A kötőszöveti fehérjékben található hidroxiprolin szintézise poszt-szintetikusan, a polipeptidláncba beépülő prolinrészecskék a *prolin hidroxiláz* módosításával az alábbiak szerint megy végbe:

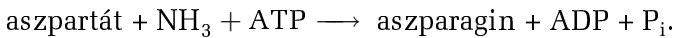


6.2.2.2. Az aszpartát, az aszparagin és az alanin bioszintézise

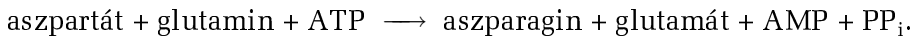
Az aszpartát és az alanin egyaránt keletkezhet transzaminálás útján glutamátból és oxálacetátból, valamint piruvátból:



Aszparagin aszpartátból két úton keletkezhet, amit kétféle *aszparagin szintetáz* katalizál. Az egyik reakció a *glutamin szintetáz* analóg módon zajlik le az *aszparagin szintetáz* segítségével mikroorganizmusokban:

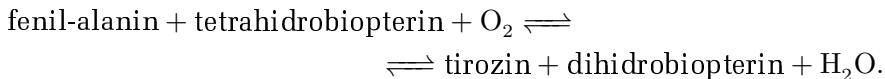
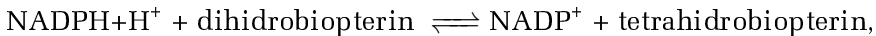


A másik útvonalon is kell ATP, de itt ammónia helyett a glutamin az aminodonor:

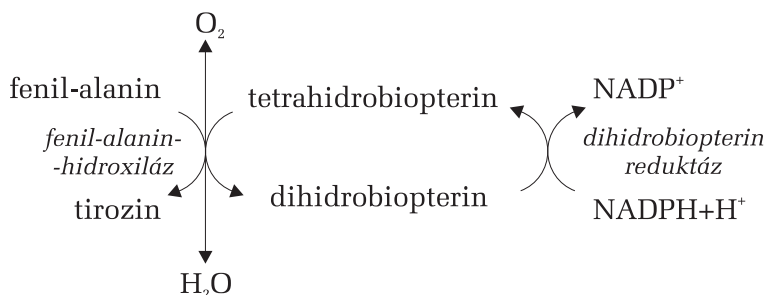


6.2.2.3. A tirozin bioszintézise

A tirozin szemiesszenciális aminosav, mivel keletkezéséhez az esszenciális fenil-alanin jelenlétére van szükség, ami a *fenil-alanin hidroxiláz* (*fenil-alanin-4-monooxigenáz*) hatására tirozinná alakulhat. A *fenil-alanin monooxigenáz* működéséhez $\text{NADPH} + \text{H}^+$ és tetrahydrobiopterin szükséges. A folyamat két lépésben az alábbiak szerint játszódik le:



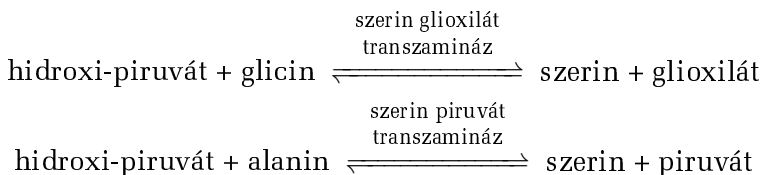
A folyamatban a folsavval rokon tetrahydrobiopterin a hidrogéndonor (6.16. ábra).



6.16. ábra. A tirozin bioszintézise fenil-alaninból

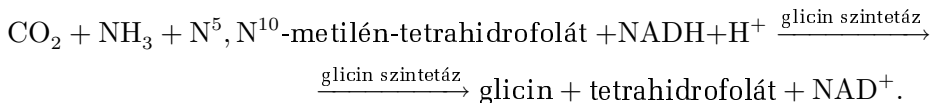
6.2.2.4. A szerin, a glicin és a cisztein bioszintézise

Szoros kapcsolat áll fenn a szerin, a glicin és a cisztein szintézise között. Közös prekursoruk a glikolízis során nagy mennyiségben keletkező 3-foszfoglicerát, amiből *foszfoglicerát dehidrogenáz* hatására foszfo-hidroxi-piruvát keletkezik. Ez glutamáttal történő transzaminálás segítségével 3-foszfo-szerinné alakul, majd a *foszfo-szerin foszfatáz* révén szerinné defoszforilálódik. A szerin keletkezésének másik lehetősége az, hogy a glicerátból keletkezett hidroxi-piruvát glicin vagy alanin felhasználásával transzaminálódik (6.17. ábra).

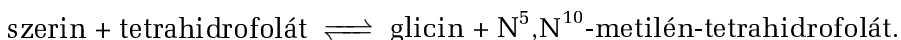


6.17. ábra. A szerin bioszintézise

Glicin keletkezhet még CO_2 -ből és NH_3 -ból piridoxál-foszfat-tartalmú enzim, a *glicin szintetáz* segítségével, a következők szerint:



Gerincesek májában a glicin szintézisének ez a fő útvonala. Emellett a *szerin hidroxi-metil transzferáz* segítségével is keletkezhet glicin, az alábbiak szerint:

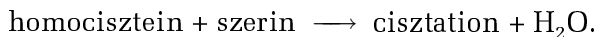


Mivel a reakció reverzibilis, ezen az útvonalon szerin keletkezése is lehetséges. A folyamatot a *piridoxál-foszfát enzim* katalizálja.

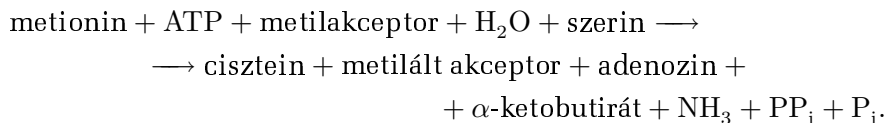
A cisztein tartalmazza a szervezetben lévő kén egy részét, ami az emlősökben transzszulfurálás útján az esszenciális metioninból származik. A kén akceptora a szerin, amiben a β -helyzetű hidroxilcsoport helyébe kerül a szulfhidrilcsoport. A folyamathoz szükséges a homocisztein keletkezése metioninból, melynek első lépése az S-adenozil-metionin szintézise:



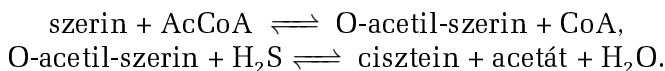
A metilálási reakciókban aktívan közreműködő S-adenozil-metionin megfelelő akceptor jelenlétében a metilcsoport átadása után S-adenozil-homociszteinné alakul, majd a hidrolízis után felszabaduló homocisztein *cisztationin β -szintetáz* segítségével szerinnel kapcsolódik és cisztation keletkezik.



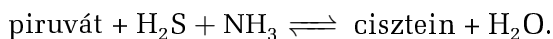
A cisztation hasadását ciszteinre és α -ketobutirátra a *piridoxál-foszfát koenzimmel működő cisztationin- γ -liáz* katalizálja, melynek alloszterikus inhibitora a cisztein. A cisztein keletkezése az alábbi egyenlettel foglalható össze:



A kénforrások tekintetében az élővilág még a nitrogénnél is nagyobb takarékosagra kényszerül. Anorganikus forrás lehet a SO_4^{2-} , a $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ és a H_2S , de egyes baktériumok az elemi ként is képesek szulfáttá oxidálni. A növények és egyes mikroorganizmusok képesek arra, hogy a szulfátot vagy a tioszulfátot kén-hidrogénné redukálják, ami a cisztein tiolcsoportjává válhat:



A reakciókat a *szerin acetyl transzferáz*, ill. a *cisztein szintetáz* katalizálja. A kén-hidrogén felhasználására ismeretes olyan reakció is, mint pl. amit a piridoxál-foszfát tartalmú *cisztation- γ -liáz* katalizál:



Az enzim mind a cisztein, mind a cisztation keletkezését katalizálhatja.

6.2.3. Az esszenciális aminosavak bioszintézise

Az ember és az emlősök számára a nélkülözhetetlen vagy esszenciális aminosavak bioszintézise magasabb rendű növényekben és sokféle baktériumfajban hasonló, vagy azonos úton történik, de sokkal bonyolultabban, mint a nem esszenciális aminosavaké.

6.2.3.1. A metionin és a treonin bioszintézise

A metionin és a treonin keletkezésének közös intermediere a homoszerin. Emlősökben hiányzik az a reakciólánc-szakasz, ami lehetővé teszi, hogy aszpartátból homoszerin keletkezzék, ehhez ugyanis az aszpartát β -karboxilcsoportjának acil-foszfát intermediereken keresztül aldehiddé kell redukálnia. Ezt követően a keletkezett homoszerin ATP-foszfát hatására homoszerin-foszfáttá alakul, és a piridoxál-foszfátot tartalmazó *treonin szintetáz* révén treoninná.

A reakció több lépésből áll, melynek során a homoszerin-foszfát α -aminocsoportja Schiff-bázist képez a reakció alatt a piridoxál-foszfát-koenzim aldehidcsoportjával. A treonin alloszterikus modulátora a reakciósor első lépését katalizáló *aszpartát kináz*nak.

A metionin-szintézisnek első lépése szukcinil-CoA felhasználásával az O-szukcinil-homoszerin keletkezése, melyet a *homoszerin acil transzferáz* katalizál. A trikarbonsav cikluson kívül ez a reakció használja el a szukcinil-CoA egy részét. A következő lépésben cisztein kapcsolódik a reakcióba, és cisztation keletkezik, ami a *cisztation- β -liáz* hatására homociszteinre, piruvátra és ammóniára hasad.

A cisztation a cisztein és a metionin keletkezésének egyaránt prekursora, de a cisztein csak az emlősökben, a metionin a növényekben, míg mikroorganizmusokban mindkettő keletkezhet.

Ahhoz, hogy homociszteinből metionin keletkezzék, előbb metilálnia kell, mely az N⁵-metil-tetrahidrofolát metildonor révén következik be. Más esetekben a B₁₂-vitamin származéka, a metil-kobalamin vesz részt a metilcsoport-transzferben. Metildonorként szolgálhat még a glicin trimetilszármazéka, a betain is.

6.2.3.2. A lizin bioszintézise

A lizin szintézisének két útvonala ismert: baktériumokban és növényekben diamino-pimelinsavon, gombákban α -amino-adipinsavon keresztül halad a lizinszintézis. A treonin keletkezéséhez hasonlóan a diamino-pimelinsav keletkezéséhez is aszpartát-szemialdehidre, továbbá piruvátra van szükség. E kettő aldolkondenzáció útján heterociklusos intermedierré, 2,3-dihidro-pikolinsavvá alakul. Ebből több lépés útján diamino-pimelinsav keletkezik, ami dekarboxilálás révén alakul lizinné.

6.2.3.3. A leucin, az izoleucin és a valin bioszintézise

Az elágazó láncú aminosavak, a leucin, az izoleucin és a valin bioszintézisében sok közös vonás van. A valin és az izoleucin keletkezése ketosavakból, piruvátból, ill. α -ketobutirátból indul úgy, hogy aktív acet-aldehiddel kapcsolódnak, így acetohidroxisavak, illetőleg aceto-hidroxi-butirát keletkezik. A kapcsolódásban a transzfert a tiamin-pirofoszfát-tartalmú enzim teszi lehetővé, hidroxetil-tiamin-rész intermedierek keletkezésével. Redukció, metil-, ill. etilcsoport-vándorlás útján átrendeződnek, dehidratáció következik be, és a két aminosavnak megfelelő ketoanalóg alakul ki, amiből transzaminálás segítségével aminosav lesz.

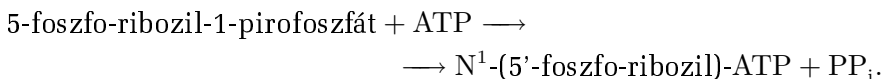
A leucin keletkezésének első lépése kevésbé különbözik az előzőektől. Ketoizovalerát és acetyl-CoA kapcsolódásából α -izopropil-malát alakul ki, ami a citrát \rightarrow α -ketoglutarát átalakulásához hasonlóan alakul tovább, és a megfelelő ketoanalóg transzaminálás során lesz aminosavvá. Baktériumokban mindhárom aminosav bioszintézise feed-back kontroll alatt áll.

6.2.3.4. Az arginin (ornitin) bioszintézise

Az arginin emlősök májában számottevő mennyiségben keletkezik, a keletkezett arginin azonban *argináz* hatására azonnal bomlik, ezért a máj argininszintetizáló képessége ellenére sem lehet a szervezet argininforrása. Mikroorganizmusokban nincs *argináz*, ezért a bennük keletkezett arginin nem bomlik el. Az arginin keletkezésének prekürzora az ornitin, ami növényekben és mikroorganizmusokban glutamátból keletkezik.

6.2.3.5. A hisztidin bioszintézise

A hisztidin keletkezése szokatlan lépéssel kezdődik: foszfo-ribozil-pirofoszfát ATP-vel reagál úgy, hogy az 5-foszfo-ribozil-rész glikozidkötést képez az ATP adenin részének 1 helyzetű nitrogénatomjával, mellyel egyidejűleg pirofoszfát lép ki:



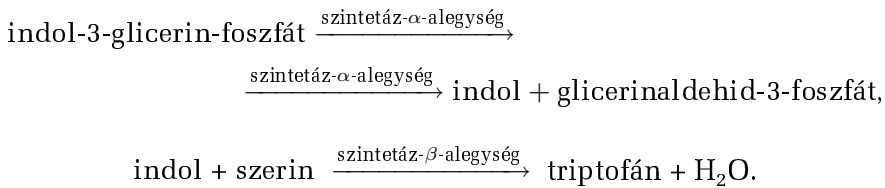
A foszfo-ribozil-pirofoszfát 2 szénatomja az imidazolgyűrű, 3 pedig a hozzá kapcsolódó alaninrész szénvázává válik. Az imidazolgyűrű egyik -N=C része az ATP adeninyűrűjéből származik, míg a második N-glutaminból adódik. Az ATP purinyűrűjének fel nem használt része mentési akció révén visszajut a purin-bioszintézisbe, így a hisztidin keletkezése nem jár anyagveszteséggel. Ez kapcsolja össze egymással az imidazolgyűrű és a purinyűrű bioszintézisét.

6.2.3.6. A fenil-alanin és a triptofán bioszintézise

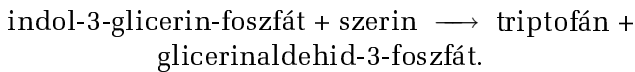
A fenil-alanin és a triptofán keletkezésének alapfeltétele a 6 tagú aromás gyűrű kialakulása, ami ugyancsak alifás prekursorokból történik. Megállapították, hogy az aromás aminosavakat igénylő auxotróf mutánsok növekedésében az aminosavakat (fenil-alanin, tirozin, triptofán) egy hidroaromás vegyület, a sikiminsav helyettesítheti. Ez a vegyület a növényvilágban az aromás gyűrű bioszintézisének központi intermediere, prekuzora a fás növények sejtfalanyagának jelentékeny részét kitevő lignin szintézisének. Sikiminsavból keletkeznek az elektrontranszportban központi helyet elfoglaló ubikinon és a plasztokinonok is.

A sikiminsav szintézisének prekuzora a foszfo-enolpiruvát és az eritroz-4-foszfát, amiből kétatomos foszforilált termék keletkezik. Ezt gyűrűzáródás követi, majd vízelvonás és redukció következik. Az így létrejött sikiminsav foszforilálódás után az aromás aminosav-anyagcsere elágazását képező korizminsavvá alakul. Prefénsav keletkezésével a reakció a fenil-alanin, antranilsav keletkezésével a triptofán szintézise irányába halad tovább. A prefénsav a reakciósorban az utolsó, nem aromás vegyület, mely aromássá két úton válhat: vagy fenil-piruváttá alakul egyidejű dehidrállás és dekarboxilálás során, vagy p-hidroxi-fenil-piruváttá, a tirozin közvetlen prekuzorává a dehidrogenálás és dekarboxilálás következtében.

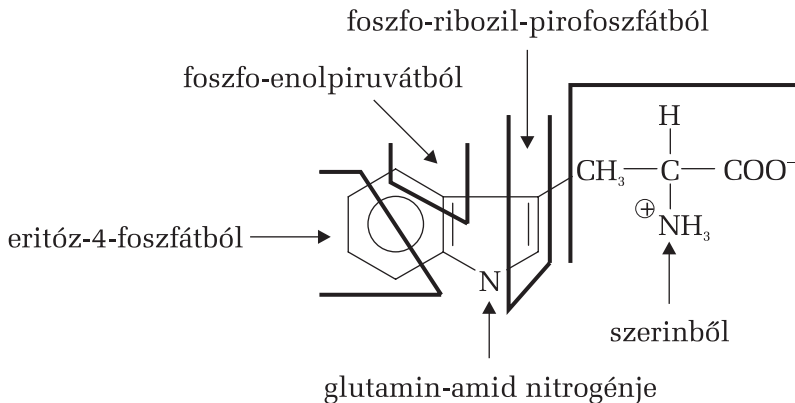
A triptofán keletkezéséhez foszfo-ribozil-pirofoszfát szükséges, ami antranilsavval kapcsolódik. Ez teszi lehetővé, hogy az indolgyűrű kialakulásához szükséges öttagú rész létrejöjjön. A folyamat utolsó lépését, az indol-3-glicerol-foszfát átalakítását triptofánná a *triptofán szintetáz* katalizálja. A *triptofán szintetáz* aktív alegységeinek tanulmányozása szolgált bizonyítékkal a molekuláris genetika egyik alaptételének, a DNS-szekvencia kolinearitásának, a DNS-triplet-sorrend és az aminosavsorrend közötti egyezés bizonyításának. A *triptofán szintetáz* piridoxál-foszfátot tartalmaz; az enzim által katalizált reakció az alábbi lépésekben játszódik le:



A két reakció összege:



A triptofánmolekula keletkezését különböző prekursorokból a 6.18. ábra összeállítása mutatja.



6.18. ábra. A triptofán keletkezése prekursoraiból

6.2.4. Az aminosavak bioszintézisének szabályozása

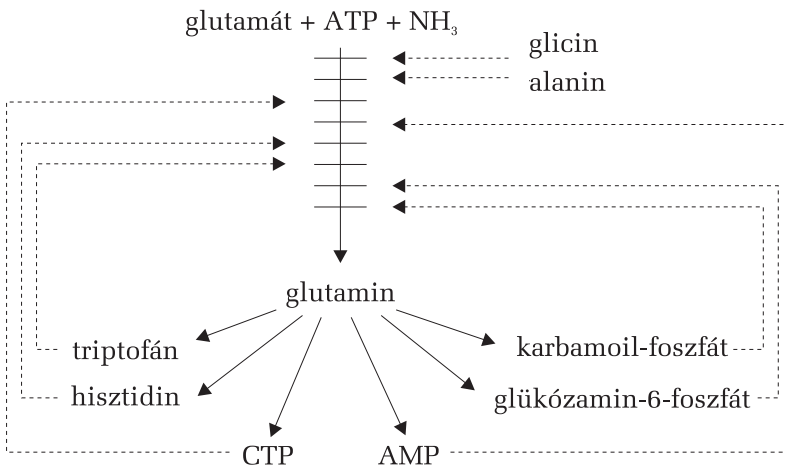
Az aminosavak bioszintézisének szabályozása két szinten érvényesül:

- az enzimek működésének szintjén a *feed-back*, illetve az *allosterikus szabályozás* révén, és
- celluláris szinten, az *enzimfehérjék szintézisének eredményeként*.

Az *első igen gyors, rendkívül érzékeny regulációt tesz lehetővé*, és biztosítja, hogy a szervezet megfelelően gazdálkodjon a korlátozott nitrogénforrásokkal. Ez a szabályozás túlnyomórészt az esszenciális aminosavak bioszintézisében érvényesül, így az emlősök aminosav-anyagcseréjére nincs hatással. Kölcsönös kontroll tapasztalható az aminosav- és fehérje-anyagcsere között mikroorganizmusokban represszió-derepresszió útján, *amikor a szintézishez szükséges enzimkészletet tartalmazó DNS-szakasz transzkripciója a szabályozás alapja*. Ez a szabályozás lassúbb, mint a *feed-back* kontroll, azonban annál tartósabb, hosszabban érvényesül. A kétfajta mechanizmus, továbbá az a körülmény, hogy a fehérjék szintéziséhez nélkülözhetetlen aminosavak keletkezését a kérdéses aminosav sejten belüli koncentrációja is befolyásolja, az aminosav-anyagcsere rendkívül érzékeny szabályozását biztosítja.

A szabályozás komplexebbé válik akkor, ha a szintézisfolyamatokban elágazás van, vagyis az intermedier többféle végtermékké alakulhat. Ilyenkor a két végtermék együtt gátolja a reakciósor első enzimjét, míg a termékek külön-külön hatástalanok. Más esetben a *termékek hatása additív* lehet, amelyet *kumulált gátlásnak* nevezünk.

A szabályozás lehetőségei még tovább finomodnak akkor, ha a szabályozott enzim egyes alakjainak (izoenzimjeinek) a szabályozó anyagra vonatkozó affinitása eltérő. Az *E. coli*-ban a *glutamin szintetáz* működése is sokoldalúan szabályozott. Ez azért rendkívül fontos, mert a glutamin amidcsoportja sokféle anyagcsere termék prekursora. A 12 alegységből álló *glutamin szintetáz működését* külön-külön legalább *8 termék gátolhatja* (6.19. ábra). Az enzim szabad, aktív és kovalensen módosított, inaktív alakban fordul elő. Az aktív alakot a triptofán és az AMP is gátolja. Minden alegységnek egy-egy külön kötőhelye van az ATP, a szubsztrát és a különböző *feed-back* inhibitorok számára. ATP felhasználásával az enzim kovalensen módosítható, enzimatikusan adenilálható, melynek során mind a 12 alegység egy-egy tirozil-oldallánca adenilsav-5'-foszfát csoportjával kapcsolódik, melynek következtében



6.19. ábra. A glutaminszintézis multivalens feed-back szabályozása. Glicin és alanin ugyan nem keletkezik közvetlenül glutaminból, mégis nagyon hatékony inhibitorok, valószínűleg azért, mert steady-state koncentrációjuk meghatározóan összefügg a glutaminszintézissel és -anyagcserével

az enzim gyakorlatilag elveszíti aktivitását. Megfelelő enzim segítségével az adenilcsoportok eltávolíthatók, és az enzimaktivitás helyreáll.

Az emlősökben lévő *glutamin szintetáz* kevésbé komplex, nem befolyásolja az alloszterikus szabályozás. Az agyban lévő enzim egyáltalán nem szabályozott, és a májban található aktivitását is csupán néhány effektor befolyásolja.

6.3. Az ember fehérjeemésztése

Az egészséges felnőtt évente kb. 500 kg élelmiszert fogyaszt, melynek mintegy 10–20%-a fehérje. A szervezetnek a tápanyagokat meg kell emésztenie, melynek során egy kb. 8 méter hosszúságú cső, az emésztőrendszer, bonyolult kémiai folyamatok során bontja le a tápanyagokat a felszívódásra alkalmas szintig. A tápcsatorna részei a szájüreg, a garat, a nyelőcső, a gyomor, a vékonybél, a vastagbél, a végbél és a végbélnyílás. Az ember emésztésének jellegzetessége, hogy *mindenevő voltának megfelelően nagyon sokféle élelmiszert tud hasznosítani*. Alkalmazkodó bélrendszere tette lehetővé, hogy mind a növényi, mind az állati eredetű élelmiszereket hasznosítani tudja. A táplálék legfontosabb összetevői

a fehérjék, a szénhidrátok és a zsírok, de az étrendnek olyan anyagokat is tartalmazni kell, amelyek emészthetetlenek (mint például a cellulóz), melyek fizikai és kémiai értelemben is hozzájárulnak az emésztőrendszer egészségés és hatékony működéséhez.

A táplálék emésztése a szájban kezdődik, ahol a szájba jutó táplálék összekeveredik a nyállal, mely a keményítőt bontó *amilázt* tartalmazza, és ezen túl a rágás és a nyelés folyamatának a kenőanyaga. A nyál napi mennyisége kb. másfél liter, melyet a szájüreg mindkét oldalán elhelyezkedő 3–3 mirigy termel a táplálék illatának, ízének vagy a táplálék elképzelésének ingerlő hatására. Az étel fokozatos összerágása, pépesítése közben a nyállal keveredik, majd a *falatnak* nevezett, *nedves, nyelésre kész masszává* alakul. A falat a garaton keresztül a nyelőcsőbe jut, melynek perisztaltikus mozgása végigtolja a nyelőcsőben a gyomor bejáratáig. A falat a nyelőcső záróizma ellazulását követően jut a sósavat tartalmazó gyomorba. A záróizom megakadályozza, hogy a gyomortartalom visszaáramoljon a nyelőcső alsó részébe, ami azért is rendkívül hasznos, mert a nyelőcső fala, a gyomorral ellentétben, kevésbé ellenálló a sósavval szemben. Az egész bélrendszer a nyelőcsőtől a végbélig perisztaltikus, kígyószerű, tekergő mozgásokat tud végezni, melynek következtében a megemésztett béltartalom folyamatosan halad végig az emésztőrendszeren. A perisztaltikus mozgást a bélfal izmai hozzák létre az idegvégződések segítségével.

Az átlagos gyomor térfogata mintegy 1–1,5 liter, ami naponta kb. a térfogatának megfelelő gyomornedvet termeli. A *gyomor elsősorban raktározza a tápanyagokat, majd adagolja* azt az emésztőcső további részébe. A felső, zsákszerűen kiszélesedő része a gyomorfenék (*fundus*), amely az elfogyasztott táplálékot tárolja, majd az alsó részbe (*antrum*) üríti. Főként alsó részének erős izmai segítségével a táplálékot keveri, melynek következtében a gyomortartalom ragadós, kásás masszává (*chymus*) alakul. A gyomor e funkciókon túl a termelt sósav segítségével *elpusztítja* a táplálékban lévő *mikroorganizmusokat*, és nem utolsósorban a gyomorfal sejtjei által termelt fehérjebontó enzimmel, *a pepszinnel, elkezdi lebontani a táplálékfehérjéket*. A nyálkatermelő sejtek által kiválasztott vastag nyálkaréteg megakadályozza, hogy a sósav és a *pepszin* károsítsa a gyomor falát.

A gyomor sav- és enzimm kiválasztásának összhangban kell lenni a táplálék megjelenésével, melynek szabályozásában mind az idegrendszer, mind a hormonok szerepet kapnak. A gyomor felső részében lévő sejtek

idegei ingerlés hatására termelik a gasztrin nevű hormont, mely a vérkeringéssel szétterjedve további nedvek kibocsátását serkenti a gyomorüregbe. Ennek következtében a *gyomorba került falatot* egyrészt a *sósav*, másrészt a *pepszin azonnal megtámadja*, és megkezdődik a fehérjék bontása. A részben megemésztett gyomortartalom a gyomor kijáratánál lévő körkörös záróizomgyűrű időnkénti ellazulását követően ételpépadagokban jut a vékonybél kb. 25 cm-es hosszúságú első szakaszába, a patkóbélbe (*duodenum*). Az ételpépadagok megtöltik a patkóbél bevezető részét, kitágítják annak falát, és kiváltanak egy reflexet, melynek hatására csillapodnak a gyomormozgások és csökken a kifolyó ételpép mennyisége. Amint a gyomortartalom a patkóbélbe jut, a nyálkahártyából megindul a *szekretin és a kolecisztokinin hormonok* elválasztása, melyek egyrészt lassítják a gyomormozgásokat és a gyomorsav-kiválasztást, másrészt *serkentik a hasnyálmirigy működését, az emésztőenzimek szintézisét*.

A vékonybél első szakasza a patkóbél, a második szakasza a 2,5 m hosszúságú éhbél (*jejunum*), a harmadik szakasza pedig a csípőbél (*ileum*), mely kb. 3,5 m hosszú, a has jobb alsó feléig lefelé tekeredik, ahol a bél kitágul, és a vastagbél első részébe megy át. A vékonybél minden szakaszának kb. 2,5 cm a belső átmérője.

A gyomorban a fehérje emésztése csak megkezdődik, *az emésztés zöme és a tápanyag-molekulák felszívódása döntő részben a vékonybélben történik*. A pépes táplálék a patkóbélben a hasnyálmirigy váladékával keveredik, és az ebben lévő *tripszin* és *kimotripszin* egyre rövidebb szakaszokra bontják a fehérjét. A hasnyálmirigy lúgos kémhatású, a benne lévő anyagok lekötik a gyomorsavat, és lehetővé teszik, hogy a vékonybélben lévő enzimek optimális pH-án végezhesék tevékenységüket. A vékonybél belső felülete több tényező következtében rendkívül nagy. A tápanyagok lebontását és felszívódását egyrészt a vékonybél hosszúsága teszi hatékonyá, hisz a hasüregben többször megcsavarodva helyezkedik el. Belső felülete redőzött és bordázott, ami tovább növeli a felület nagyságát. A redőknek és a barázdáknak a felszíne olyan, mint a bársonyszőnyeg, ugyanis azt ujszerű kiemelkedések, bélbolyhok borítják. A bélbolyhokat vizsgálva megállapítható, hogy azokon még kisebb ujszerű nyúlványok, mikrobolyhocskák találhatók, melyek együttesen a bél belső felületét kb. 250 m²-re növelik. A nagy fehérjemolekulák részben lebontott maradványai a mikrobolyhocskák között áramlanak, melyeket az itt elválasztott *dipeptidázok* és *aminopeptidázok* bontanak le szabad aminosavakká, melyek aktív transzporttal

átjutva a bélbolyhokon az azok mögött húzódó vérhajszálerek hálózatába kerülnek. A *felszívódott aminosavak* a belek hajszálerei segítségével a májkapuvisszéken át a *májba jutnak*, mely a hasüreg felső részében közvetlenül a rekeszizom alatt, a jobb oldalon fekszik. Nyugalmi állapotban percnként mintegy 1200 cm^3 vér áramlik rajta keresztül, melynek az étkezések közötti időszakban több mint háromnegyede a belek felől érkezik a májkapuvisszéken keresztül, egynegyede pedig a májverőéren biztosítja a máj saját szövetei részére az oxigént és a tápanyagokat. Ha eszünk, akkor a vékonybélbe több vér jut, az emésztés és felszívódás könnyebben mehet végbe, és a májkapuvisszéken is növeli a véráramlást. A májnak döntő szerepe van a fehérje-anyagcserében, hisz a nem kívánatos aminosavak, illetve fehérjék a májban aminosavakra bomlanak, más aminosavakká alakulnak át, vagy energiaként hasznosulnak. E folyamatok során a feleslegként jelentkező nitrogén karbamiddá alakul, mely a véráramba kerülve a vesén keresztül a vizelettel ürül.

A vékonybélben meg nem emésztett tápanyagok a mintegy 1,5 m hosszú, 5 cm keresztmetszetű vastagbélbe jutnak. A vastagbél a csípőbélvaktól záróizomnál, a vakbél bejáratánál kezdődik, és a hasüreg jobb elülső oldalán fut felfelé a máj alsó felszínéig, majd derékszögű hajlással megy át a harántvastagbélbe. Ez a lép alatt egy kanyarulattal leszálló vastagbélként folytatódik, a bal oldalon fut le, majd egy S alakú kanyarral visszafordul a középvonal felé, melyet követően a végbélbe torkollik. A víz legnagyobb része a vastagbélben felszívódik, a maradékot pedig a táplálék emésztetlen anyagai alkotják. A széklet szárazanyagának egyharmad része baktériumokból áll, melyek a bél valamennyi tartományában megtalálhatók. *A vastagbélben visszamaradó anyagok jó táptalajok a baktériumok számára.* Ezek életműködésük során olyan rendkívül fontos anyagokat termelnek, mint például a K-vitamin vagy a hisztidin. Működésük mellékhatásaként gázt – főként metánt és széndioxidot – termelnek, miközben a táplálékmaradványokat lebontják.

A bél utolsó szakasza a mindössze 5 cm hosszú végbélnyílás-csatorna, mely egy záróizommal csukódik, és melyen át a széklet távozik a szervezetből.

6.4. A fehérjék intermedier anyagforgalma

6.4.1. Az aminosavak hasznosítása energiaforrásként

A 6.1–6.2. fejezetekben részletesen tárgyalásra került, hogy a szervezet a fehérjét csak aminosavakból képes felépíteni, ezért az aminosavakat elsősorban a fehérjeszintézisre tartalékolja, és energiaforrásként csak akkor hasznosítja, ha a fehérjeellátás bőséges, vagy egyéb módon nem jut elég energiához. Az aminosavakat energiaként hasznosítva előbb azokat dezaminálni kell, amely történhet transzaminálással, melynek során az aminocsoport egy másik ketocsoporthoz kapcsolódik, vagy oxidatív dezaminálással, amikor az aminocsoport NH_3 formában szabaddá válik. Az ammónia a sejtek számára toxikus, ezért közömbösíteni kell. A karbamidképződés kulcsvegyülete az arginin, amely fölös nitrogénjétől megszabadulva ornitinné alakul át az ornitin körfolyamatban. A karbamid szintéziséhez 3 ATP szükséges, ezért egy nitrogén, illetve ammónia detoxikációja a szervezetnek 1,5 ATP-jébe kerül. A baromfifélék húgysav formájában ürítik ki a felesleges nitrogént, melynek energetikai hatásfoka az ornitincikluséhoz hasonló. A húgysav négy nitrogénjét 6 ATP segítségével építi fel a szervezet, ezért egy nitrogén kiválasztása itt is 1,5 ATP-be kerül. A húgysav energiatartalma lényegesen nagyobb, mint a karbamidé, ezért a baromfiak fehérjéből való energiatermelése kevésbé hatékony az emlősökéhez viszonyítva. A dezaminálás után visszamaradó szénlánc a citrátkörbe lépve energiaként hasznosul.

6.4.2. Fehérjeszintézis

A fehérje minden sejtben képződik, mert a sejt képződésnek és a sejtállomány folyamatos kicserélődésének, regenerálódásának alapja a fehérjeszintézis. A fehérjeszintézishez szükséges aminosavak egy részét az állati szervezet maga állítja elő, *az esszenciális aminosavakat* azonban *a táplálékban készen kell kapnia*. A nem esszenciális aminosavak szénváza a citrátkörben képződik, melyekből transzaminációval az aminosavak bioszintézisük során jönnek létre. Az aminosavak képződésében, az aminocsoportok felvételében, tárolásában és továbbításában a glutaminsavnak, illetve savamidjának, a glutaminnak központi szerepe van. A sejtekben a fehérjék szintézise a DNS-ben kódolt genetikai információ alapján az RNS-ekkel történik. *Egy peptidkötés kialakítása 5 ATP energiáját igényli*, melynek következtében a fehérjeszintézis energetikai

hatásfoka 82% körül alakul, a kérődzők fehérjeszintézisének elméleti hatásfoka azonban csak 79%-os. Gyakorlati körülmények között legkedvezőbb hatásfokkal a tehén és a tojótyúk építi fel a fehérjét; az energetikai hatásfok mindkét esetben 65% körül van, ami megközelíti a fiatal szopós állatok, valamint a fiatal baromfi fehérjeképzését. Az életkorral azonban a hatásfok csökken, így a süldők és a hízók esetében már csak átlagosan 55%-os a transzformáció hatásfoka, amely a későbbiekben 20–40%-ra csökken.

6.4.3. A nitrogénforgalom

Az állatok nitrogénforgalmával, az általuk fogyasztott fehérje hasznosulásával, illetve az állatok fehérjemínőség iránti igényével azért kell foglalkoznunk, mert az élelmiszer-fehérjék minőségének megállapítása sok esetben állatkísérletekben történik, ezért a kapott eredmények értelmezéséhez feltétlenül ismerni kell a kísérleti állatok szervezetében lejátszódó folyamatokat.

A nitrogénforgalom az új fehérjék szintézisével, a lebontott fehérjék újraépítésével, a testfehérjék lebontásával, az aminosavak dezaminálásával és az anyagforgalomban való felhasználásával összefüggő folyamatokat foglalja magában. Az állatok csak a takarmánnyal jutnak a nitrogénhez, a levegő nitrogénjét nem képesek hasznosítani, és a szervezetből a nitrogénforgalomban kiürülő termékek között sincs légnemű anyag. A szervezetből jelentős mennyiségű nitrogén a terméken kívül a bélsárral és a vizelettel ürül, ugyanis a kihullott szőrrel, a hámló bőrrel, valamint az izzadsággal eltávozó nitrogén mennyisége oly csekély, hogy az elhanyagolható.

A nitrogénmérleg megállapítása során vizsgálják a takarmány, a bélsár és a vizelet nitrogéntartalmát. Pozitív a nitrogénmérleg abban az esetben, ha a bélsárral, a vizelettel és a termékkel ürülő nitrogén mennyisége kevesebb, mint a takarmánnyal felvett nitrogénmennyiség. A *pozitív nitrogénmérleg* a szervezet fehérjeállományában bekövetkezett gyarodásként fogható fel. *Negatív nitrogénmérleg* esetén a szervezet több nitrogént ürít, mint amennyit a szervezet felvesz, tehát ilyen esetben saját testfehérjéit bontja le és üríti ki. *Nitrogénegyensúlyban* azok az állatok vannak, amelyeknél a takarmánnyal felvett, valamint a bélsárral, vizelettel és a termékkel ürített nitrogén mennyisége azonos. Ez az állapot a kifejlett állatokra jellemző, melyek nitrogénegyensúlyban vannak, és amelyek a fiziológiás készletük feltöltése során a felvett fehérjét nem

tudják visszatartani, hanem az aminosavak dezaminálása után kénytelenek azt a vizelettel kiüríteni (*exogén nitrogén*). A vizeletben ürülő nitrogén a szervezetben lebontott fehérjékből származik, melynek egy részét az életfenntartásra elhasználódott, újból be nem építhető aminosavak adják. Ezt a testfehérjék lebontásából származó nitrogénrészt *endogén nitrogénnek* nevezzük. A vizelet nitrogénjének másik részét a takarmány aminosavainak lebontása adja, mely az igény feletti, vagy az állat igényeinek nem megfelelő minőségű fehérjeetetés következtében áll elő (*exogén nitrogén*).

A vizelettel ürülő nitrogénhez hasonlóan a bélsár nitrogéntartalma is *exogén*, illetve *endogén* részre osztható. Az *exogén részt a takarmány emészthetetlen táplálóanyagai adják*, az *endogén részt* pedig a nitrogénmentes takarmány etetésekor is ürülő úgynevezett *anyagcsere-nitrogén*. A vizelet *endogén*-, valamint a bélsár *anyagcsere-nitrogén*-tartalma együtt adják az állat életfenntartó nitrogénszükségletét. E két nitrogénhányad meghatározását leggyakrabban fehérjementes takarmány etetése útján végzik. Az ekkor mért ürítés az úgynevezett *minimális ürítés*, mely a bélsárban a nitrogéntartalmú emésztőnedvekből, valamint a bélhámsejtek kopásából származik, a vizelet nitrogénjét pedig a testfehérjék átépítésekor már fel nem használt aminosavak adják. A *minimális nitrogénürítés* kisebb, mint az állat életfenntartó szüksége. Ha a fehérjementes takarmányhoz fokozatosan fehérjét adagolnak, egy ponton az állat nitrogénegyensúlyba hozható, melyet *minimális nitrogénegyensúlynak* hívunk. A nitrogénürítés ilyenkor valamivel nagyobb, mint a fehérjementes takarmány etetésekor, mert egyrészt az *endogén nitrogén* ürítését az etetett aminosavak növelik, de a takarmány fehérjéinek az enzimtermelést serkentő hatása folytán növekszik a bélsárban az *anyagcsere-nitrogén* mennyisége is. A *minimális nitrogénegyensúly* eléréséhez szükséges nitrogén lényegében azt a nitrogénmennyiséget jelenti, amely *az anyagforgalom normális fenntartásához szükséges*, ezért ez inkább tekinthető életfenntartó nitrogénszükségletnek, mint a fehérjementes takarmányon mért *minimális nitrogénürítés*.

6.4.4. A takarmányfehérjék hasznosulása

Az állati szervezet a takarmányban felvett tápanyagokat létfenntartásra és valamilyen termék előállítására fordítja. Gyakorlati megfontolásokból célszerű a létfenntartás és a termelés fehérjeszükségletét szétválasztani, és figyelemmel kell lenni arra, hogy a nem növekvő és nem

termelő állat fehérjeszükséglete nagyobb, mint a termelő állat létfenntartásához szükséges fehérjemennyiség. A tápanyagok közül a fehérjék a szervezet energiaigényének fedezésére is szolgálnak, melynek során az aminosavak aminocsoportjaikat dezaminálás során elveszítik, a keletkezett ammóniát pedig a szervezet karbamid vagy húgysav formájában detoxikálja.

Az energiatermeléssel ellentétben az állat a *testfehérje-állomány gyarapítására kizárólag fehérjéket tud felhasználni*, és kis mennyiségű fehérjét a stagnáló szervezet is igényel, különben testfehérjeit lassan veszíteni kezdi. Összegezve tehát energia- és zsírtermelésre a zsírok, a szénhidrátok és a fehérjék egyaránt felhasználhatók, fehérje viszont csak nitrogéntartalmú tápanyagból (amidok, aminosavak, peptidek, fehérjék) képződhet.

6.4.4.1. *Fehérjefelvétel, fehérjeemésztés, nitrogénürítés, emészthetőség, nitrogénretenció*

Az egygyomrú állatokban a gyomorban a sósav a fehérjéket denaturálja, a *pepszin* pedig peptidekké hasítja. A peptidek hasítását a vékonybélben a *tripszin* és a *kimotripszin* folytatja, majd az *endo- és exopeptidázok* fejezik be a peptidkötések hasítását, melyet követően az aminosavak a vékonybél falán felszívódva az anyagcserébe kerülnek.

Mind a növekvő és termelő, mind a stagnáló szervezet a bélsárban és a vizeletben rendszeresen ürít nitrogéntartalmú anyagokat, az anyagcsere-folyamatok termékeként nitrogéngáz nem szabadul fel. A *vizelettel ürített nitrogén* kizárólag a szervezet anyagcseréjéből származik, ezért ezt *metabolikus nitrogénürítésnek* nevezzük. Ez magában foglalja a létfenntartással együtt járó fehérjelebontás végtermékeit és a felszívódott aminosavak közül azok nitrogéntartalmát, amelyet a szervezet valamilyen okból nem tud felhasználni. A létfenntartással együtt járó fehérjelebontás során – melyet a *metabolikus nitrogén endogén részének* hívunk – a szervezet saját fehérjetartalékait is felhasználja. A fehérjék emésztése során a bélfalon átjutott, felszívódott, de be nem épített aminosavak bontásából származó rész a *metabolikus nitrogénürítés exogén* része.

A *bélsárral ürített nitrogéntartalmú anyagok* a takarmányfehérje fel nem szívódott maradékából és a szervezet saját fehérjetartalékából, belső endogén eredetű nitrogéntartalmú anyagokból származnak. Ez utóbbira bizonyíték, hogy a nitrogénmentes takarmányt fogyasztó,

sőt a koplaló állatok bélsarában is tartósan ürülnek nitrogéntartalmú anyagok. Ezek az emésztőcső nyálkahártyájának kopásából, az emésztőnedvek nitrogéntartalmából és a bélhám szekrétumából származnak. A bélsárral ürített nitrogénmennyiségnek ezt a szervezet saját fehérjetartalékaiból származó fehérjehányadát *bélsár-endogén-N-veszteségnek* hívjuk. Az endogén nitrogénürítés a szervezet korától, anyagcseréjétől, a tápanyagok mennyiségétől, valamint a fehérjehordozó minőségétől is függhet.

6.4.4.2. Az emészthetőség mutatói

Az emészthetőség mértékét úgy határozhatjuk meg, hogy a takarmányfehérje-bevitel és a bélsárban ürített nyersfehérje mennyiségének különbségéből kiszámítjuk az emésztőcsőből felszívódott nyersfehérje mennyiségét, amit a bevitt nyersfehérje mennyiségének százalékában adunk meg. Az így meghatározott emészthetőségi mutató, tehát a bevitel és a teljes bélsár N-ürítés összehasonlításából számolt együttható, az emészthetőség kifejezésére nem igazán alkalmas, mert a bélsárban ürülő N-tartalmú anyagok nemcsak a táplálékfehérje emésztetlen vagy lebontott és fel nem szívódott anyagaiból származnak, hanem a szervezet saját nitrogénkészletéből is, ezért ezt a mutatót *látszólagos emészthetőségnek* hívjuk, melyet a következő képlettel tudunk kifejezni:

$$\text{Látszólagos emészthetőség} = \frac{\text{N-bevitel} - \text{bélsár N-ürítés}}{\text{N-bevitel}} \cdot 100.$$

A takarmányfehérjék emészthetőségének elbírálásában a látszólagos emészthetőség kifejezi, hogy az elfogyasztott fehérje milyen mértékben áll az anyagcsere rendelkezésére. Hibája, hogy a *szervezet saját N-ürítését* nem vesszük figyelembe, amely így *növeli az emészthetetlenek mért nitrogén részarányát*.

A fehérjék *valódi emészthetőségének* meghatározásakor nemcsak a bélsárral ürített nitrogén teljes mennyiségét vesszük figyelembe, hanem a bélsár nitrogéntartalmát a takarmány fel nem szívódott nitrogéntartalmára és a szervezetből származó endogén bélsár-nitrogén tartalmára osztjuk fel. A valódi emészthetőség számolása során a nitrogénbevitelből levonjuk a bélsár-nitrogén endogén nitrogénnel csökkentett részét, így a valódi emészthetőséget a következő képlet szerint számoljuk:

$$\begin{aligned} \text{Valódi emészthetőség} &= \\ &= \frac{\text{N-bevitel} - (\text{bélvár N-ürítés} - \text{endogén N-ürítés})}{\text{N-bevitel}} \cdot 100. \end{aligned}$$

Az endogén nitrogénürítés direkt és indirekt módon határozható meg. A meghatározáshoz ismernünk kell a testfehérje bontásának kinetikáját teljes éheztetés esetén, illetve fehérjementes, de megfelelő energiatartalmú takarmány fogyasztása során. Mindkét esetben az állatok bélsarával és vizeletével rendszeresen ürülő nitrogén bizonyítja, hogy bizonyos mértékű fehérjebontás az anyagcsere-folyamatokkal szükségszerűen együtt jár. Mindkét esetben a N-ürítés csakis a szervezet saját tartalékainak rovására történhet, vagyis csak belső, endogén eredetű lehet.

Teljes éheztetés esetén a kezdeti szakaszban a nitrogénürítés nagymérvű, és függ attól, hogy mennyi fehérjét fogyasztott az állat az éhezés előtti periódus alatt. A szervezet ilyenkor a labilis fehérjéket használja fel. A szénhidrátartalékok felhasználását követően megkezdődik a zsírtartalékok felhasználása, és a lipidbontás következtében fokozódik a N-kiválasztás, hisz a szervezet csak fehérjéből tudja az idegszövet működéséhez elengedhetetlen glükózt szintetizálni. A második szakaszban a nitrogénkiválasztás mértéke kicsi és viszonylag állandó, mert a metabolizálható szöveti fehérjék elfogytak, és elkezdődik a vázizmok lebontása. Az éhhalált közvetlenül megelőző végső szakaszban a nitrogén-kiválasztás újra fokozódik.

Fehérjementes, de megfelelő energiatartalmú takarmányt fogyasztó állatok nitrogénürítésének kinetikája az éhezőkéhez hasonló. A kezdeti szakaszban itt is a labilis fehérjék bomlanak le, melynek során a test nitrogéntartalmának közelítőleg nyolc százalékát veszíti el. A második szakaszban a vizelettel ürülő nitrogén mennyisége állandóan csökken, és nem áll be egy olyan konstans értékre, mint teljes éhezéskor. Ez a szakasz 30–35 napig is eltarthat, melyet követően a test N-vesztesége már kb. 30%-os a kezdeti állapothoz képest. A harmadik szakaszra itt is a szöveti fehérjék általános lebontása a jellemző, ami az állat pusztulásához vezet. A fehérjementes tápot fogyasztó állatok lényegesen tovább életben maradnak, mint az éhezők, és az állatok csak akkor pusztulnak el, ha testfehérjéjük 50–54%-át felélték. Ez az idő függ az egyedi adottságoktól és a kísérlet előtti időszak tápláltsági állapotától, mely patkányoknál 50–200, kutyánál pedig 60–120 nap között változik. E két módszerrel meghatározott endogén N-ürítést kell a fehérje valódi emészthetőségének meghatározása során figyelembe venni.

6.4.4.3. Endogénnitrogén-ürítés a vizeletben

Éheztetéskor, illetve fehérjementes takarmányozáskor a vizelettel ürülő nitrogén mennyisége arányos a szervezet energiafelhasználásával és az állat testtömegével, pontosabban az anyagcsere-testméréssel, ami a testtömeg 0,66–0,75-dik hatványát jelenti. A szervezet endogénfehérjebontásának bizonyítéka a vizeletben *a fehérjeéhezés során kiválasztott kreatinin*, mely az izmokban lévő kreatin-foszfát bomlásterméke. A testtömeg és a kreatinin-kiválasztás arányos egymással, így a 24 óra alatt kiválasztott kreatinin mennyisége a testtömeghez viszonyítva konstans érték. Fehérjét tartalmazó takarmány fogyasztásakor a fehérje biológiai értéke és a kreatinin-nitrogén mennyisége között szoros összefüggés mutatható ki. A vizelet kreatinintartalma nő, ha a takarmányadag több fehérjét tartalmaz. A vizelet aminosav-tartalma normális veseműködéskor igen csekély, és nincs összefüggésben az endogénnitrogén-lebontással.

6.4.4.4. Endogénnitrogén-ürítés a bélsárban

Éhezéskor vagy nitrogénmentes takarmány fogyasztása esetén a bélsárban is kimutatható az endogén eredetű nitrogén, amely a bélbaktériumokból, a lekopott bélhámsejtekből és a fel nem szívódott emésztőnedvekből áll. Fehérjementes takarmányt fogyasztó állatok esetében a gyomor fehérjetartalékai az emésztőnedv-elválasztás következtében erősen kimerülnek, a vékonybél azonban kevésbé károsodik, mert felszívja a gyomor és a hasnyálmirigy váladékainak aminosavait. Kezdetben a bélsár nitrogéntartalma nagy, majd fokozatosan egy konstans szintre áll be, amely a kezdeti szint 20–30%-a. Az endogén bélsárnitrogén mennyisége 1,4–1,9 mg nitrogén/gramm szárazanyag, mely érték függ az életkortól, a test felületének nagyságától, a testtömegetől és a takarmány összetételétől.

6.4.4.5. A fehérje emészthetőségét befolyásoló tényezők

A fehérje emészthetősége függ a takarmánytól, az állattól és annak fiziológiai állapotától. A takarmányfehérjék valódi emészthetőségére hatással van a fehérje eredete, a takarmány feltártsága, hidratációs állapota, denaturációjának foka és a takarmányban jelenlévő kísérőanyagok mennyisége. Ugyanazon takarmányfehérjék valódi emészthetősége változhat aszerint, hogy milyen fajú, korú, élettani és egészségi állapotú

állatok fogyasztják. A *fehérjeadag növelésekor az emészthetőség általában csökken*, és ugyanazt a fehérjét az idősebb állatok valamivel jobban emésztik, mint a fiatalabbak. A tápanyagszintben és a minőségben történő változtatáskor jelentkező enzimadaptáció a fehérjék esetében az emészthetőség fokozatos javulásában nyilvánulhat meg. Ha a bélsár és a vizelet nitrogéntartalma kevesebb, mint a takarmányból felvett nitrogén mennyisége, akkor a szervezet a szöveteiben nitrogént tart vissza, a szöveti fehérjék gyarapodnak, a nitrogénmérleg ebben az esetben pozitív. A szervezet nitrogéntartalékainak csökkenése, vagy gyarapodása a nitrogénmérleggel határozható meg, minthogy a fehérjebevitel és fehérjeürítés mérlege kísérletesen a bélsár és a vizelet szétválasztásával meghatározható. A kísérletek azonban egyéb táplálékkomponensekkel együtt mennek végbe, ezért az ilyen kísérleteket általánosan anyagcsere-kísérletnek nevezik. A nitrogénbevitel és a nitrogénürítés különbözetéből számított nitrogénmérleg a takarmányfehérje termelésre fordított mennyiségét jelzi. Nitrogént tart vissza a szervezet a laktáció, a tojás- és gyapjútermelés során, fokozódik a nitrogén-retenció a vemhesség alatt. A magzatépítés nitrogénszükséglete azonban kisebb, mint a szöveteké.

6.5. Az állatok fehérjeminőség iránti igénye

A takarmányfehérjék minősége az esszenciális aminosavak koncentrációjával és azok arányával függ össze. A szervezet aminosavigényét optimálisan kielégítő összetételű komplett fehérje nemcsak a létfenntartás aminosavigényét képes fedezni, hanem növekedésre és termelésre is felhasználható. *Az ideális fehérjehasznosítás feltétele, hogy a takarmányban megfelelő mennyiségű energia álljon rendelkezésre*, hogy a fehérje energetikai célú lebontására ne kerüljön sor. Az optimálistól eltérő aminosav-összetételű, inkomplett fehérjékből származó aminosavak csak részben használódnak fel. A fehérjeszintézis biokémiai tevékenységébe nem illeszthető aminosavak dezaminálásra kerülnek, nitrogéntartalmú bomlástermékek pedig a vizelettel ürülnek. A legtöbb takarmányfehérjében a szervezet által igényelt esszenciális aminosavak csak korlátozottan állnak rendelkezésre, ezért *a fehérjék hasznosulása a legtöbb esetben nem teljes*. A hasznosulás javítható, ha a limitáló esszenciális aminosavval a takarmányfehérjét kiegészítjük, komplettáljuk. A limitáló aminosav növekvő adagjaival a fehérje hasznosulásának fokát csak egy határig lehet javítani, mert a hiány kielégítésével egy másik aminosav

viszonylagos hiánya válhat a hasznosulás korlátozó tényezőjévé. *Az optimális határon túl adagolt aminosav a fehérje hasznosulását rontja*, mert feleslege nem hasznosul, lebontása, valamint az aminocsoport karbamiddá vagy húgysavvá történő átalakítása pedig energiaveszteséggel jár. Kétféle fehérjét egyidejűleg adva, az esszenciális aminosavak szerencsés kombinálódása révén, az kedvezőbb hatékonysággal hasznosulhat, mint bármelyik külön-külön. Az egyik fehérje aminosav-összetétele szerencsés esetben a másikat kiegészítheti, ami valójában a komplettálásnak felel meg. A fehérjehasznosítás szempontjából olyankor a legkedvezőbb a helyzet, amikor az aminosavak teljes egészében beépülnek a szervezetbe, mert ilyenkor a létfenntartással együtt járó minimális nitrogénmennyiségeket ürítik ki. Ha viszont nagyon sok hasznosítatlan aminosav kerül az anyagcserébe, ezeket a szervezet dezaminálás útján lebontja és kiüríti, és a felesleges aminosavak mennyiségétől és arányától függően azok eltávolításához még a saját fehérjekészletéből is kénytelen aminosavakat felhasználni. *A nitrogén-anyagcsere egyensúlyának ilyen megbomlása negatív nitrogénmérleget, sőt tömegvesztést is okoz.*

Habár a megemésztett és aminosavformában felszívódott fehérje hasznosulása az aminosavaknak az állat igényeihez viszonyított mennyiségétől és arányától függ, a fehérje tényleges hasznosulását számos tényező befolyásolja. Ugyanígy befolyásolják a hasznosulást a fehérjét kísérő anyagok, a depresszíven ható antinutritív és toxikus komponensek is. A fehérje aminosav-összetétele tehát csak a minőség egyik komponense, *a takarmányfehérje minőségét annak aminosav-összetétele csak lehetőségként adja meg*, de hogy valójában milyen is a fehérje biológiai értéke, annak hasznosulása, azt az állat dönti el.

AZ ÉLELMISZER-FEHÉRJÉK MINŐSÍTÉSÉRE ALKALMAS VIZSGÁLATOK

7.1. Általános alapfogalmak, a fehérjék minősítésére alkalmas vizsgálatok rövid áttekintése

Az élelmiszer-fehérjék legfontosabb funkciója az ember aminosav-szükségletének kielégítése. *A fehérjék minősége, biológiai értéke*, attól függően, hogy mennyire tudják a szervezet esszenciális aminosavigényét kielégíteni, *különböző*, mivel az esszenciális aminosav-szükséglet állatfajonként más és más. Függ még az életkortól, az élettani állapottól és a hasznosítás irányától is, ezért amikor a fehérjét minősítjük, *nem hagyhatjuk figyelmen kívül az ember és az állat szerepét*, és mindig meg kell jelölni a konkrét célt, ami alapján a fehérjét minősíteni akarjuk. A fehérje szerkezete, a benne lévő kötéstípusok, az esszenciális és nem esszenciális aminosavak mennyisége és aránya, valamint a fehérje és az aminosavak emészthetősége megmutatja a fehérje *potenciális biológiai értékét*, de hogy ebből a maximális biológiai potenciálból *mi érvényesül* a szervezetben, azt a fehérje fogyasztásakor lejátszódó *élettani folyamatok döntik el*. A fehérje hasznosulását az aminosav-összetételen kívül befolyásolhatja a táplálék energiatartalma, a fehérjekoncentráció csökkenése vagy növekedése, a vitamin- és ásványianyag-ellátás, és a toxikus vagy antinutritív anyagok jelenléte a takarmányban. Ezért a fehérje minőségét mindig standardizált körülmények között kell vizsgálni, és csak az így vizsgált fehérjék biológiai értéke hasonlítható össze egymással.

A fehérje minőségét legpontosabban állatkísérletekkel állapíthatjuk meg, azonban e vizsgálatok meglehetősen drágák és lassúak, ezért nehezen adnak információt azelőtt, mielőtt a vizsgálati anyag elfogyna. A gyakorlatban rendszerint olyan laboratóriumi módszereket használunk a fehérje minőségének megállapítására, melyek eredményei szoros összefüggésben vannak az állatkísérletek során kapott minősítéssel. Vigyázni kell azonban a különböző módszerek összehasonlításával, mert míg a kémiai módszerek egészen kiváló egyezést adnak a hőhatást nem

szenvedett, toxikus vagy antinutritív anyagot nem tartalmazó és jól emészthető fehérjékkel végzett állatkísérletekkel, e módszerek általában nem jelzik a kisebb mértékű hőkárosodást, a toxikus vagy antinutritív anyagok jelenlétét, és a komplettáló hatást is nehéz előre jelezni kémiai módszerek segítségével. Ezért *a fehérje minőségét különböző értékmérő indexekkel jelöljük*, attól függően, hogy milyen vizsgálati módszert alkalmazunk. Egyetlen index sem jelöli komplex módon a fehérje tápértékét, mindegyik nyújt viszont valamilyen információt a fehérje minőségéről, és a céljainkat figyelembe véve nekünk kell a vizsgálati módszert úgy megválasztani, hogy a legtöbb információt adja a kérdésfeltevésünkre. A fehérje tápértéke, élelmezési értéke, biológiai értéke, minősége valójában mind ugyanazt jelenti; ezek szinonim fogalmak. Megállapításuk különböző *kémiai, in vitro enzimés, mikrobiológiai és biológiai módszerekkel lehetséges*. E módszerekkel képesek vagyunk mérni a fehérjék biológiai potenciálját, a fehérjehasznosulás hatásfokát, a komplettáló hatást és az aminosavak emészthetőségét. Összefüggéseket tudunk számolni a fehérje minőségét jellemző különféle indexek között, mely összefüggések a gyakorlati munkánkat jelentős mértékben megkönnyítik.

7.1.1. A fehérje biológiai potenciálját mérő módszerek

A fehérje minőségének meghatározása a nyersfehérje-tartalom, a valódi fehérje-tartalom és az emészthető nyersfehérje-tartalom meghatározásával kezdődik, majd folytatódik a fehérje aminosav-összetételének meghatározásával, melyet követhet a D-enantiomerek analízise, valamint a hasznosítható esszenciális aminosavak mennyiségének meghatározása. Az aminosav-összetételi adatokból a következő indexeket számolhatjuk:

$$E/N, I/D, E/T,$$

ahol:

E = az esszenciális aminosavak mennyisége a fehérjében,

N = a nem esszenciális aminosavak mennyisége a fehérjében,

I = a nélkülözhetetlen aminosavak mennyisége a fehérjében,

D = a nélkülözhető aminosavak mennyisége a fehérjében,

T = az összes aminosav mennyisége a fehérjében.

Az aminosav-összetételi adatokból megállapítható a fehérje *limitáló aminosava* a FAO/WHO ajánlásai szerint összeállított referenciafehérje aminosav-összetételéhez hasonlítva. A legkisebb százalékos mennyiségben előforduló aminosav a limitáló aminosav, melynek számértékét

kémiai indexnek (CS) hívjuk. Az aminosav-összetételből a CS mellett más indexek is számolhatók akkor, ha figyelembe vesszük a többi esszenciális és nem esszenciális aminosavat is. Az aminosav-analitikai módszerből következően *az indexek nem jelzik a fehérje emészthetőségét*, az aminosavak hasznosíthatóságában bekövetkező változásokat, az aminosav-inballansz kialakulását, az aminosavak toxicitását és antagonizmusát, valamint a toxikus és antinutritív anyagok jelenlétét. Ennek ellenére mégis *több információt adnak a fehérjéről, mintha csak az aminosav-összetételt szemlélnénk*. Az indexeken túl kémiai módszerekkel meghatározható az esszenciális aminosavak hasznosítható mennyisége, valamint a D-sztereoizomer aminosavak mennyisége és aránya.

A fehérjék minősítésekor az egyik legfontosabb feladat *emészthetőségének megállapítása*, melyet in vitro különböző proteázok felhasználásával lehet elvégezni. Az emészthetőség megállapítására használják a *pepszint*; a *pepszint* és a *pankreatint*; a *pepszint*, a *tripszint* és az *erepszint*; a *papaint*, a *leucinpeptidázt* és *prolidázt*, valamint a *papaint* és a *pronázt*. Az említett enzimek in vitro körülmények között egyensúlyra vezető kémiai folyamatban hidrolizálják a fehérjét, ezért a végtermékként felszabaduló aminosavak jelenléte miatt a hidrolízis foka soha nem éri el az in vivo körülmények között létrejöttet. In vitro környezetben egyrészt a hidrolízisállandó, másrészt az aminosavak feed-back gátlása akadályozza meg a fehérje teljes lebontását. In vitro körülmények között a feed-back gátlás kiküszöbölhető, ha a hidrolízist állandó dialízis mellett végzik, vagy a képződött aminosavakat ultraszűrővel eltávolítják. Vizsgálhatjuk az enzim hidrolízis során felszabaduló aminosavak mennyiségét is, melyből egyrészt következtetni tudunk a *hasznosítható aminosavak mennyiségére*, másrészt olyan *integrált indexeket számolhatunk*, melyek a fehérje hasznosíthatóságát előre jelzik. Ilyen indexek például a *pepszinhidrolizátum-maradék index* (PDR), a *pepszin-pankreatin-dialízis index* (PPDD) és a *pepszin-pankreatin-hidrolizátum index* (PPD). Ezek az integrált enzim-hidrolizátum indexek már az aminosavak hasznosíthatóságában bekövetkezett változásokat is jelzik, segítségükkel megállapítható a *fehérje nettó hasznosíthatósága* (NPU-index) és a limitáló aminosav is. Az in vitro enzim módszerek a gyakorlatban egyszerűségük folytán rendkívül elterjedtek, bár információtartalmuk nem mindig kielégítő. *Az integrált indexek legtöbbször jó egyezést mutatnak a biológiai módszerekkel meghatározott*

értékekkel, a módszerek hátránya viszont az, hogy túl bonyolultak, komoly műszerezettséget igényelnek, az indexek számítása körülményes, ezért a gyakorlatban széles körben nem terjedtek el.

Az *in vitro* enzimes módszereknél a *mikrobiológiai tesztek* még jobb közelítést adnak az *in vivo* vizsgálatok eredményeihez. Fehérjehidrolizátumokból az egyes aminosavak mennyiségét, a *fehérjék relatív tápértékét* (RNV), valamint az egyes *esszenciális aminosavak hasznosíthatóságát* mérni tudjuk mikrobiológiai vizsgálatokkal. A relatív tápérték meghatározása során fehérjehidrolizátumok összehasonlítására korábban proteolitikus aktivitás nélküli mikroorganizmusokat használtak, később pedig az enzimesen kezelt fehérjék relatív tápértékét proteolitikus aktivitású tesztorganizmusokkal vizsgálták. Ezen utóbbi tesztorganizmusok közé tartozik a *Tetrahymena pyriformis* W protozoon, melynek esszenciális aminosav-szükséglete hasonló a növekvő patkányéhoz, és tápközegben a fehérje minőségével arányosan szaporodik. A segítségükkel meghatározott RNV-érték a fehérjekárosodást, illetve a fehérje minőségét jól jelzi, és alkalmas az egyes esszenciális aminosavak hasznosítható mennyiségének mérésére is.

A *biológiai módszerekkel* mérhetjük a *szervezet tömegének*, a szervezet *nitrogéntartalmának* változását, vagy az *egyes szervekben a nitrogén-anyagcsere alakulását*. A szervezet tömegváltozása alapján meghatározott biológiai indexek a következők: *fehérjehatékonysági arány* (PER), *nettó fehérjehatékonyság* (NPR), *fehérjeretenció-hatékonyság* (PRE), *bruttó fehérjeérték* (GPV). A szervezet nitrogéntartalma alapján meghatározott biológiai indexek a következők: *biológiai érték* (BV), *nettó fehérjehasznosítás* (NPU), *nitrogénmérleg-index* (NBI), *relatív növekedési index* (RGI), *relatív tápérték* (RNV).

A biológiai módszerek közül legismertebbek és legegyszerűbbek a *testtömeg-változásának mérésén alapuló*k, melyek közül viszonylagos egyszerűsége miatt legszélesebb körben a PER-t alkalmazzák. Ez valójában az elfogyasztott fehérje által előidézett tömeggyarapodást méri, mely módszer elsősorban a tömeggyarapodást elősegítő fehérjék tesztelésére alkalmas. Mivel egy alacsonyabb értékű fehérje a tömeggyarapodást már nem segíti elő, ezért a PER-módszer a gyengébb minőségű fehérjéket jelentősen alulértékeli. A PER-módszer módosított formája az NPR-módszer, melynek meghatározása során a fehérjetartalmú és fehérjementes tápot fogyasztó állatcsoportoknak a kísérleti etetés végén mért tömegkülönbségét a fehérjetartalmú tápot fogyasztó csoport által

elfogyasztott fehérje mennyiségére vonatkoztatják. A *fehérjeretenció-hatékonyság* meghatározásakor az NPR-módszerrel meghatározott értéket a kísérleti állatok (patkányok) átlagos nitrogéntartalmának százalékkal szorozzák, melynek értéke így 0 és 100 közé esik. Az NPR- és a PER-módszer a rosszabb minőségű, a tömeggyarapodást elő nem segítő fehérjehordozók minősítését is lehetővé teszi, és mindkét index szoros korrelációt mutat az NPU-val.

A *bruttó fehérjeérték* (GPV) meghatározásakor a vizsgált fehérjét gabonafehérjével együtt vizsgáljuk, és így valójában annak lizin-komplettáló képességét mérjük. Fehérjeforrásként gabonaféléket tartalmazó kontroll tápot alkalmazunk, a kísérleti táp a kontroll táphoz adott tesztfehérjét tartalmazza, a kísérlet során pedig a két táp által előidézett tömeggyarapodást mérik, rendszerint brojlercsirkék segítségével. A fehérje GPV-értéke igen szoros korrelációt mutat a fehérje hasznosítható lizintartalmával.

A *szervezet nitrogéntartalma alapján meghatározott biológiai indexek* közül talán a BV-módszer a legismertebb, mely a megemésztett fehérjének a szervezetben hasznosuló százalékos mennyiségét méri. Ha a BV-értéket a fehérje emészthetőségével szorozzuk, akkor megkapjuk a nettó fehérjehasznosítást (NPU), mely az elfogyasztott fehérjének a szervezetben hasznosuló százalékos mennyiségét méri. Az NPU N-mérleg-kísérletekkel vagy a test N-tartalmának közvetlen analízise útján határozható meg.

A *N-mérleg-index* (NBI) meghatározásakor az állat által hasznosított nitrogénmennyiségeket az elfogyasztott nitrogén függvényében ábrázolják, majd mérik az egyenes hajlásszögét. Ha az elfogyasztott nitrogén függvényében a tömeggyarapodást ábrázoljuk, akkor az egyenes hajlásszögéből kiszámolható a *relatív növekedési index* (RGI), amelyet esetenként relatív tápértéknek (RNV) is hívnak. Az előzőekben felsorolt indexek (PER, NPR, BV, NPU, RGI, NBI) a fehérje minőségéről átfogó képet adnak, a fehérjéket azok limitáló aminosava alapján minősítik, de a kísérletekből az sajnos nem derül ki, hogy melyik a limitáló aminosav. Ezek a módszerek valójában a fehérjék rangsorolására, illetve különféle technológiai hatások nyomon követésére alkalmasak.

A *táplálékfehérje minősége és a különféle szervek nitrogén-anyagcseréje között összefüggés van*, melynek alapján a fehérje biológiai értéke meghatározható. A fehérjemínőség változására legérzékenyebb a vér, majd ezt követi a máj, az izom, a vese és az agy. A számos módszer közül leginkább a szérumfehérje és májfehérje regenerációjának mérése terjedt

el, melynek során a fehérjetartalékaitól megfosztott szervek táplálékfehérjék hatására bekövetkező regenerálódó képességét mérik. Az előzőekben felsorolt indexhez hasonlóan mérhető pl. a májfehérje-hasznosítás (LPU), mely a fehérje speciális élettani célokra való hasznosíthatóságáról informál. A fehérjék minőségére többek között következtetni lehet a *vérp plazma* táplálékfelvételt követő *szabadaminosav-tartalmából*, mely a táplálékfelvételt követően emelkedik. A szabad aminosavak koncentrációjának növekedése azonban a fehérje minősége mellett függ a fehérje mennyiségétől, a táplálék egyéb alkotóinak arányától, a fogyasztás és a mintavétel között eltelt időtől, ezért a vizsgálatokat igen nehéz standardizálni. Emiatt aztán a plazma szabadaminosav-koncentrációja és a fehérje NPU-értéke közötti összefüggés laza.

Hasonló összefüggés állapítható meg a szabadaminosav-koncentrációból számolt indexekre is, mivel a plazma szabadaminosav-koncentrációja az emésztés kezdeti szakaszában felszabadított és felszívódott aminosavak mennyiségétől függ. E módszer alkalmas a hőkárosodás során csökkent hasznosítható aminosav-tartalom kimutatására is. A vér, a plazma, valamint a *szérum karbamidkoncentrációja és a fehérje minősége között negatív az összefüggés*. A karbamid szintje függ az elfogyasztott fehérje minőségétől, mennyiségétől és az etetés után eltelt időtől. Minél rosszabb a fehérje minősége, minél kiegyensúlyozatlanabb a fehérje, annál több aminosav hasznosul a szervezetben energiaként, és annál több aminosoportot kell karbamiddá átalakítani. A vizelettel ürülő aminosavak mennyisége, a vizelet karbamid-, kreatinin-, allantoin- és szulfáttartalma nincs szoros összefüggésben a fogyasztott fehérje minőségével. Lehetőséget ad még a fehérje minőségének meghatározására a *szöveti enzimek aktivitásának mérése*, hisz az jelentős mértékben függ a táplálékfehérje minőségétől. E célból számításba jöhető szérumenzimek a máj *argináz* és *xantinoxidáz*, valamint a vese *transzamidináz* aktivitásának vizsgálata. Mivel az enzimek aktivitása a fehérje minőségén kívül számos egyéb tényezőtől is függ, a módszert igen gondosan kell standardizálni.

7.1.2. A fehérjehasznosulás határfokát mérő módszerek

A táplálék fehérjetartalmának növekedésével a fehérjeretenció határfoka csökken, ezért növekvő fehérjekoncentrációval a fehérje NPU-értéke is csökken. Az NPU olyan fehérjekoncentrációnál *maximális*, amely

az *életfenntartó fehérjeszükségletet még éppen fedezi*, ezért az NPU-index meghatározását célszerű az életfenntartó fehérjeszükségletet még éppen fedező fehérjekoncentrációnál standardizálni (NPU_{St}), más fehérjekoncentrációnál viszont az operatív NPU-t (NPU_{Op}) határozzuk meg. Így az NPU_{St} -index a fehérjeminőség jellemzésére, a különböző eredetű fehérjék rangsorolására, az NPU_{Op} pedig a fehérjehasználás hatásfokának mérésére alkalmas.

7.1.3. A komplettáló hatás meghatározása az esszenciális aminosavak hasznosítható mennyiségének mérésével

A különféle módszerekkel meghatározott aminosav-összetétel jelezheti ugyan a fehérjék tápértékét, hőkezelt fehérjéknél, illetve toxikus anyagok vagy proteináz inhibitorok jelenlétében azonban a fehérje valódi tápértéke kisebb annál, mint az a teljes aminosav-tartalom alapján várható lenne. Az egyes *aminosavaknak csak egy része hasznosul*, amelyet a szakirodalomban felhasználható, kihasználható, hozzáférhető vagy felvehető aminosav-tartalomnak nevezünk, amely kifejezések valójában ugyanazt jelentik. A hasznosítható aminosavak mennyisége attól függ, hogy az emésztés során mennyi aminosav szívódik fel a fehérjéből, azaz mekkora az aminosavak emészthetősége. Az aminosavak felszívódását akadályozhatják a különféle intermedier aminosav-származékok, a kimusz haladási sebessége az emésztőcsatornában és minden olyan tényező, amelyek pozitív vagy negatív hatással vannak az emésztésre. *Csak a felszívódott aminosavak hasznosulnak* a szervezetben, de bizonyos aminosav-származékok, mint amilyen például a fruktozil-lizin, a felszívódás után a vizelettel változatlan formában kiürülnek anélkül, hogy fehérjeszintézisre használódnának fel. Az energiaszükséglet fedezésére hasznosuló aminosavak a fehérjeszintézis céljaira ugyancsak elvesznek, ezért *hasznosítható aminosav-tartalomnak igazán csak az anabolitikus biokémiai folyamatokban részt vevő aminosav-mennyiségek számítanak*. A gyakorlatban az emészthető aminosav-tartalom meghatározása terjedt el, mert egyszerűbb, mint a hasznosítható aminosav-tartalom meghatározás, és a két érték igen szoros kapcsolatban van egymással. Az emészthető- és a hasznosítható aminosav-tartalom között nagyobb különbség csak a hőkárosodott fehérjék esetében van. Mivel ipari abrakkeverékekben az állatok szükségleteihez viszonyítva a lizin, a metionin, a triptofán és a treonin fordul elő legkisebb mennyiségben, ezért a takarmányozási gyakorlatban e négy aminosav hasznosítható mennyiségének

ismerete a fontos. A hasznosítható aminosav-tartalom mérésére kémiai és biológiai vizsgálatok is alkalmazhatók, de használható minden olyan *in vitro* módszer is, amelyek eredményei az állatkísérletekkel jó korrelációban állnak.

Kémiai módszerekkel a lizin és a metionin hasznosítható mennyiségét rutinszerűen is meg lehet határozni. A lizin hasznosítható mennyiségének meghatározásakor a szabad ϵ -amino-csoporttal rendelkező mennyiségeket mérik, a szubsztituált ϵ -amino-lizin ugyanis az állat számára nem vagy csak korlátozottan hasznosítható. A szabad ϵ -amino-csoport nukleofil reagensekkel, mint amilyen például a 2,4-dinitro-1-fluor-benzol (DNFB), lekötethető, és így meghatározható. A metionin könnyen oxidálódik metionin-szulfoxiddá, majd metionin-szulfonná, amely már nem hasznosul, így a metionin fel nem használható mennyiségének mérésére alkalmas. A hasznosítható metionin-tartalmat fotometriás, illetve gázkromatográfiás módszerekkel lehet mérni.

Amennyiben a fehérje enzim hidrolízise előtt és után az egyes aminosavakat is meghatározzuk, akkor a felszabaduló aminosav-mennyiségekből azok emészthetőségére, sőt hasznosíthatóságára is következtetni lehet. Ilyen módszer pl. a pepszin-pankreatin emészthetőségi index meghatározása. A hasznosítható aminosavak mennyisége *Tetrahymena pyriformis* W tesztorganizmussal is meghatározható, ha olyan közeget állítunk össze, amelyben a tesztorganizmus szaporodását a meghatározandó aminosav felhasználható mennyisége limitálja.

Amennyiben a táp limitáló aminosava a vizsgálandó aminosav, akkor a kísérleti állatok tömeggyarapodása arányos a fehérje kérdéses aminosavának hasznosítható mennyiségével. A szintetikus vagy természetes eredetű alaptáp a meghatározandó aminosavat az optimálisnál kisebb mennyiségben tartalmazza, ezért ha a vizsgálandó fehérjét az alaptáphoz keverjük, az állat tömeggyarapodása, egy standardhoz viszonyítva, a kérdéses esszenciális aminosav hasznosítható mennyiségét mutatja. Amennyiben ezt a mennyiséget az aminosav kémiai analízissel meghatározott összes mennyiségének százalékában fejezzük ki, akkor megkapjuk a *hasznosíthatósági százalékot*. A növekedésen alapuló módszerek az esszenciális növekedési faktorok meghatározásának elvén alapulnak, ezért csak az esszenciális aminosavak hasznosíthatóságának mérésére alkalmasak. Fiatal állatok tömeggyarapodásán alapuló módszereket mind a lizin, mind a metionin hasznosítható mennyiségének mérésére is kidolgoztak.

7.1.4. Az aminosavak emészthetőségének meghatározása

A fehérjék emészthetőségének meghatározása során mérhetjük az egyes aminosavak mennyiségét is, így az *egyes aminosavakra is meg lehet állapítani az emésztési együtthatókat*. A fekális emészthetőség mérésekor az endogénaminosav-ürítést is figyelembe kell venni, e módszert azonban a vastagbél mikroflórájának fehérjeszintézise jelentősen zavarhatja. Az aminosavak emészthetőségét a vékonybél-tartalom analízisével is meg lehet állapítani, melynek során a mikroflóra zavaró hatása elhanyagolható.

7.1.5. A fehérje értékének meghatározása termelő állományokkal

A fehérjehordozó *értéke termelő állományokban is meghatározható*. A különféle biológiai módszerekkel kapott minősítés eredménye gyakorlati szempontból csak tájékoztató jellegűnek tekinthető, mivel az értékek minden esetben megváltoznak, ha az adott takarmányt több takarmánnyal együtt, keverék formájában etetjük. A gyakorlatban a legfontosabb kérdés az, hogy egy új takarmányféle mennyire képes egy adott keverék értékét, hatékonyságát megváltoztatni, továbbá, hogy miként lehet az optimális arányokat kialakítani. Az ilyen vizsgálatokat legcélszerűbb termelő állományokkal beállított kísérletekkel elvégezni, melynek során az alábbi szempontokat kell betartani. A kiválasztott állatoknak egészségesnek, jó étvágyúaknak, életkorukkal arányos tömegűeknek és azonos ivarúaknak kell lenniük. Lényeges, hogy az összehasonlításra kerülő állatcsoportok tömege egyező legyen, a csoporton belül pedig az állatok tömege között ne legyen 10%-nál nagyobb különbség. Célszerű az állatcsoportokat azonos időpontban és azonos sorrendben mérni, ha lehet egyedi mérlegelést kell alkalmazni, és előnyös legalább kéthetente mérlegelni, mert a mérési adatok sok információval szolgálhatnak. Az állatok mérésével egyidejűleg az elfogyasztott takarmányt is mérni kell. Nagy figyelmet kell fordítani a kísérleti és a kontrolltáp összeállítására, melyet adagoltan vagy ad libitum lehet etetni. A kísérleti keverékből és a kontrolltápból átlagmintát kell venni, összetételüket kémiai analízissel kell megállapítani. A kísérletek során az állatokat naponta többször kell ellenőrizni, és a normális viselkedéstől eltérő minden változást fel

kell jegyezni. Helyettesítési kísérletekben a beltartalmi értékek analízisét mindig el kell végezni, a táblázatban megadott beltartalmi értékekkel soha sem szabad számolni.

7.1.6. Összefüggések a különböző indexek között

Ha jól végeztük vizsgálatainkat, illetve kísérleteinket, akkor *a fehérje minőségét jellemző különféle indexek között rendkívül szoros összefüggést kell kapnunk*. Az előzőekből nyilvánvaló, hogy egy fehérjehordozó tápértékét elsősorban aminosav-összetétele, ezen belül az esszenciális aminosavak mennyisége, az egyes aminosavak egymáshoz viszonyított aránya szabja meg. Ez a potenciális tápérték annak megfelelően realizálódik, hogy milyen az egyes esszenciális aminosavak hasznosíthatósága, milyen a táp fehérjekoncentrációja, és milyen az állat élettani állapota. Egy fehérjehordozót minősíteni lehet úgy is mint kizárólagos fehérjeforrás, és úgy is mint takarmány-kiegészítő. Ez utóbbi esetben ki kell deríteni, hogy van-e valamelyik esszenciális aminosavból – a gabona-félékhez viszonyítva – relatív felesleg, amennyiben igen, milyen annak a mennyisége és hasznosíthatósága.

Az ismertetett módszerek közül azt kell választani, amelyik a kérdésfeltevésre a korrekt választ adja. A sok rendelkezésre álló módszer közül referenciaként mindig az állatkísérletek eredményét kell tekinteni. *Csak azonos jellegű módszerek összehasonlításának van értelme*, hisz csak ezek adnak azonos jellegű információt függetlenül attól, hogy kémiai, mikrobiológiai vagy biológiai módszerről van-e szó. Ha a fehérje nitrogénretencióját kell megállapítani, referenciaként legtöbbször a BV- és az NPU-index szolgál. Az aminosav-összetételből számolt kémiai indexeknek rendkívül szoros korrelációban kell lenni a BV-indexszel. A szoros korreláció lehetőséget ad arra, hogy *a kémiai módszerrel meghatározott értékekből biológiai jellegű mutatószámhoz jussunk*. A BV-index és a mért értékek között negatív korreláció is lehet (pl. a vérplazma karbamidkoncentrációja és a BV-index között). A kalibrációs célból készített regressziós összefüggésnek rendkívül szorosnak kell lenni (a korrelációs koefficiens egyhez közeli, kis konfidencia-intervallummal), a szoros korrelációt a módszerek standardizálásával lehet elősegíteni.

Az NPU-indexet referencia módszerként általánosan használják, ugyanis a nitrogénretenciót nem a felszívódott, hanem az elfogyasztott fehérje százalékában fejezi ki. A fiatal, intenzív növekedési fázisban lévő kísérleti állatok tömege és N-tartalma szoros korrelációt mutat, mert

az állatok zsírdepót még nem halmoznak fel. A gyarapodás alapján számolt NPR-index ezért szoros korrelációban áll a N-tartalom-gyarapodás mérésén alapuló NPU-indexszel.

A mikrobiológiai módszerek gyorsaságuk, kis eszköz- és költségigényük miatt rutinszerű vizsgálatokra igen alkalmasak. Az ideális mikroorganizmus extracelluláris proteázokkal rendelkezik, és esszenciális aminosav-igénye hasonló az emlősállatokéhoz; ilyen például a *Tetrahymena pyriformis* W és a *Streptococcus zymogenes*. A *Tetrahymena*-teszttel meghatározott tápérték (RNV-index), és a fehérjehordozók minősítésére leggyakrabban használt indexek között szoros az összefüggés; a korrelációs együtthatók 0,63–0,80 között alakulnak. A fehérje hasznosulását jelző indexeket (BV, NPU, PER) nem lehet kapcsolatba hozni a fehérje in vitro vagy in vivo emészthetőségét kifejező egyszerű mutatókkal. A fehérje hasznosulását jelző indexek csak a fehérje limitáló esszenciális aminosav-tartalmával hozhatók kapcsolatba, bár ez a kapcsolat meglehetősen laza, mivel a fehérje hasznosulását a limitáló aminosavon kívül számos tényező (a többi esszenciális aminosav, a nem esszenciális aminosavak aránya és a fehérjekoncentráció) is befolyásolja. Egy esszenciális aminosav koncentrációja, annak relatív túlsúlya vagy hasznosítható mennyisége nem állítható kapcsolatba a BV-, az NPU- és a PER-indexekkel, mert nem azonos jellegű módszerekről van szó. Egy húsliszt hasznosítható lizintartalma pl. hőkezelés hatására már csökkenhet anélkül, hogy az NPU-indexben változás mutatkozna, mert az NPU-indexet leginkább a limitáló metionintartalom befolyásolja. A hasznosítható lizintartalmat mérő módszerek viszont egymással jól összehasonlíthatók, azaz a kémiai módszerrel mért DNFB-reaktív lizin-értékek, a festékkötési kapacitás (DBC), vagy a csirke GPV-tesztje szoros kapcsolatban állnak egymással. Összefoglalásul tehát elmondható, hogy a különböző fehérjeminősítő módszerek a rendelkezésre álló eszközöktől függően egymással helyettesíthetők.

7.2. Kémiai módszerek

Ebben a fejezetben azokat a módszereket válogattuk össze, amelyek egy átlagos felszereltségű kémiai-analitikai laboratóriumban megvalósíthatók. A legtöbb vizsgálat kivitelezéséhez csak analitikai mérleg, normál üvegeszközök, általánosan használt vegyszerek, mágneses keverő, esetleg UV/VIS spektrofotométer szükséges, az aminosav-analízis

elvégzéséhez azonban aminosav-analizátorra, nagyhatékonyságú folyadékromatográfra vagy gázkromatográfra is szükség lehet. Amint talán az az előzőekből kiderül, egyetlen optimális módszer sem létezik a fehérje minőségének meghatározására, hanem különféle kémiai, enzimes, mikrobiológiai és biológiai módszerek együttes alkalmazásától várhatunk kielégítő eredményt. A módszerek leírásánál a legtöbb esetben megadjuk azokat az anyagokat és eszközöket, amelyek a vizsgálat elvégzéséhez szükségesek. Ismertetjük a minta előkészítését, a vizsgálat pontos menetét, az eredmények számítását, a módszer hibahatárát, és végül javaslatot teszünk az eredmények értékelésére is.

7.2.1. A tápláléérték meghatározása szabványos kémiai módszerekkel

A tápláléérték laboratóriumi megállapítására használt módszereket az utóbbi időben jelentős mértékben átdolgozták. A korábban használt helyett jelenleg az alábbi szabványos módszereket alkalmazzák:

SR ISO 6498	Takarmányok vizsgálati mintáinak előkészítése
ISO 6498	Állati takarmányok – a vizsgálati minták előkészítése
SR ISO 6496	Állati takarmányok – a nedvesség- és az egyéb illóanyag-tartalom meghatározása
SR 13325	Nitrogéntartalom meghatározása a nyersfehérje-tartalom számításához
SR ISO 6492	Nyerszsír-tartalom meghatározása petroléteres kivonással
STAS 9597/5–77	A nyersrost-tartalom meghatározása
STAS 9597/4–76	A nyershamu-tartalom meghatározása
STAS 21/4–73	A sósavban oldhatatlan hamutartalom meghatározása
STAS 12266–84	A peroxidszám és a savszám meghatározása

7.2.2. A fehérjék oldhatóságának vizsgálata

A hőkezelt élelmiszer-alapanyagok, elsősorban az extrahált szójadarra minőségének ellenőrzésére, a hő hatására bekövetkezett denaturáció vizsgálatára a fehérje vízzoldhatóságából jól lehet következtetni. Ennek során a fehérjét vízzel oldjuk ki, és az oldatba ment fehérje mennyiségét *Kjeldahl*-módszerrel határozzuk meg. A fehérje oldhatóságát több módon is meghatározhatjuk; a *nitrogénoldhatósági index (NSI) esetében*

az oldható nitrogén mennyiségét a minta összes nitrogénjének százalékos arányában adjuk meg, a fehérjeoldhatósági index (PDI) esetében pedig az oldhatóságot az oldatban maradó fehérje és a minta összes fehérjéjének százalékában fejezzük ki. A módszerek a hődenaturáció mértékét jól jelzik, kivitelezésük egyszerű, hátrányuk azonban, hogy az eltérő keverő, illetve homogénező berendezések miatt nehéz a módszereket standardizálni, ezért az eredmények szórása nagy.

7.2.2.1. A nitrogénoldhatósági index meghatározása

A minta előkészítése során laboratóriumi őrlőberendezésekkel (Fritsch, Retsch, mikroculatti) a mintát olyan finomra daráljuk, hogy annak 95%-a átessen a 0,2 mm-es lyukbőségű szitán. Olajos magvak esetén megelégszünk azzal, hogy a minta 80%-a 0,3 mm-es, 90%-a pedig 0,4 mm-es szitán legyen átszítálható. Az őrlés alatt az őrlőberendezés felmelegedését, ha lehet, vízhűtéssel meg kell akadályozni, esetleg a mintát szárazjéggel együtt célszerű darálni, és felmelegedés után az őrlőberendezést minden alkalommal le kell hűteni.

A megfelelő szemcsenagyságú vizsgálati anyagból 5,00 g-ot mérünk be egy 400 cm³-es főzőpohárba, amihez apró részletekben, üvegbottal kevergetve, 200 cm³ 30 °C-os desztillált vizet adunk, végül a vízzel az üvegbotot is lemoszuk. A szuszpenziót 30 °C-os vízfürdőben 120 fordulat/perc sebességgel két óráig laboratóriumi keverővel keverjük, ezután a szuszpenziót egy 250 cm³-es mérőlombikba töltjük úgy, hogy a pohár falára tapadt maradékot is átöblítjük. Egy-két csepp habzágátlót adunk hozzá, desztillált vízzel jelig töltjük, felrázzuk, és a folyadék tisztájából kb. 40 cm³-t egy 50 cm³-es centrifugacsőbe töltünk, és 1500 percnkénti fordulattal 10 percig centrifugáljuk. A felülúszót 100 cm³-es főzőpohárba szűrjük, majd ennek 25 cm³-éből Kjeldahl-módszerrel meghatározzuk a nitrogéntartalmat. Ezzel párhuzamosan, vakpróbaként, a felhasznált víz nitrogéntartalmát is meghatározzuk. A hígításokat figyelembe véve a 25 cm³ oldat 0,5 g vizsgálati anyagból kioldódott nitrogéntartalmú vegyületet tartalmaz. Az oldat és a vakpróba nitrogéntartalmából a vízoldható nitrogénszázalékot, illetve a nitrogénoldhatósági indexet a következő képletekkel számoljuk:

$$\text{Vízoldható nitrogén (NSI, \%)} = \frac{(M - V) \cdot 10}{\text{minta tömege (g)}} \cdot 100,$$

ahol:

M = a minta 25 cm³-es kivonatából mért nitrogén mennyisége (g),

V = a vakpróba 25 cm³-es alikvotjában talált nitrogén mennyisége (g),

10 = hígítási faktor.

Ebből a nitrogénoldhatósági index a következő képlet szerint számolható:

$$\text{Nitrogénoldhatósági index (\%)} = \frac{\text{vízoldható nitrogén (\%)}}{\text{össznitrogén (\%)}} \cdot 100.$$

A nitrogénoldhatósági index megadásakor jelezni kell, hogy a vizsgálatot milyen finomságúra őrölt mintából végeztük el.

7.2.2.2. A fehérjeoldhatósági index meghatározása

Egy 300 cm³-es mérőlombikot jelig töltünk desztillált vízzel. 20 g darálatlan mintát bemérünk egy laboratóriumi homogenizátor serlegébe, majd a pontosan kimért 300 cm³ 25 °C-os desztillált vízből kb. 50 cm³-t töltünk hozzá, és spatulával péppé keverjük. A desztillált víz maradékát kevergetés közben hozzáöntjük, majd a készülék összeszerelése után a keverőt tíz percig 8500 fordulat/perc sebességgel működtetjük. Ezt követően a szuszpenziót egy 600 cm³-es főzőpohárba töltve ülepedni hagyjuk, a durvább részek ülepedése után a felülúszóból 40–50 cm³-t centrifugacsőbe töltünk, és 2700 fordulat/perc sebességgel tíz percig centrifugáljuk. 15 cm³ felülúszóból *Kjeldahl*-módszerrel meghatározzuk a nitrogéntartalmat. A hígításokat figyelembe véve, ez a mennyiség az 1 g mintából kioldódó fehérjének felel meg. Vakpróbaként meghatározzuk a hígításhoz használt desztillált víz nitrogéntartalmát is.

A kioldódó fehérjearányt a következő módon számoljuk:

$$\text{Vízoldható fehérje (\%)} = \frac{(M - V) \cdot 6,25 \cdot 20}{\text{minta tömege (g)}} \cdot 100,$$

ahol:

M = a minta 15 cm³-es kivonatából mért nitrogén mennyisége (g),

V = a vakpróba 15 cm³-es alikvotjában talált nitrogén mennyisége (g),

20 = a hígításból adódó faktor.

Ebből a fehérjeoldhatósági indexet az alábbiak szerint számoljuk:

$$\text{Fehérjeoldhatósági index (PDI, \%)} = \frac{\text{vízoldható fehérje (\%)}}{\text{összesfehérje (\%)}} \cdot 100.$$

A hőkezelt, denaturálatlan szójafehérjék NSI-értéke 70% feletti, PDI-értéke pedig nagyobb, mint 80%. Ha a PDI értéke 60% alá esik, az NSI pedig 20–40% között van, az már a fehérje enyhe, de a biológiai értéket még nem befolyásoló hőkezelésére utal. Intenzív hőkezelés esetén a PDI 20–40% között, az NSI pedig 10–20% között van, ami már némi fehérjekárosodást jelez, ezen értékek alatt viszont jelentős hőkárosodásra lehet számítani.

7.2.3. A hasznosítható lizintartalom meghatározása

7.2.3.1. A hasznosítható lizintartalom meghatározása 2,4-dinitro-1-fluor-benzollal történő származékképzés után aminosav-analízátorral

A 2,4-dinitro-1-fluor-benzol (DNFB) reakcióba lép a lizin ϵ -aminocsoportjával dinitrofenil- ϵ -amino-lizin (DNP-lizin) keletkezése közben, amely kötés a savas hidrolízis során sem bomlik el. A DNFB-lal történő reakció után a mintát 6M sósavval, 24 órán át, 110 °C-on hidrolizáljuk, majd a hozzá nem férhető lizint automatikus aminosav-analízátorral meghatározzuk. A minta összes lizintartalmát a DNFB-lal nem kezelt mintából határozzuk meg. A hozzáférhető, DNFB-hoz kötődő lizin mennyiségét pedig a két analízis különbségéből számoljuk. A meghatározáshoz a vonatkozó fejezetben leírt előkészítési eljárásokat, és az ott leírt ioncserés oszlopkromatográfiás aminosav-meghatározási módszereket használjuk. A módszer ezeken túlmutató kivitelezése a következőképpen történik.

A DNFB-lal kezelt fehérjehidrolizátum elkészítése során a finomra örölt mintából 0,1–0,2 g őrleményt mérünk egy mérőedénykébe. A minta mennyiségét úgy határozzuk meg, hogy a kész hidrolizátum nátrium-citrát pufferrel 100 cm³-re hígítva, köbcéntiméterenként 0,72–0,88 mg fehérje hidrolízistermékeit tartalmazza. A mintát és 4–5 üveggyöngyöt egy 500 cm³-es normál csiszolatú gömblombikba helyezük, majd 10 cm³ frissen készített 10%-os nátrium-hidrogén-karbonát-oldatot, 10 cm³ etanolt és 0,4 cm³ 2,4-dinitro-1-fluor-benzolt mérünk hozzá. Az edényt lezárás után legalább 3 órán keresztül rázógépen rázatjuk, majd 2 cm³ 6M sósavval savanyítjuk, és 40 °C-on rotációs gyorsbepárlón olajszerű konzisztenciáig beszáritjuk. 50–70 cm³ dietil-étert adunk hozzá, intenzíven

összerázzuk, majd az éteres fázist elöntjük, maradékát rotációs gyorsbepárlón elpárologtatjuk. Ezt a műveletet háromszor megismételjük, és a bepárolt száraz maradékhoz 125 cm^3 6M sósavat adunk, és óvatosan addig melegítjük, amíg a szén-dioxid felszabadulása befejeződik. Ezután 18 órán át visszafolyós hűtővel forraljuk az oldatot, felülete felett pedig kapillárisból állandó nitrogénáramot biztosítunk. Lehűlés után $40\text{ }^\circ\text{C}$ -os fűtéssel, rotációs gyorsbepárlón, kenőcsös konzisztenciáig pároljuk, 100 cm^3 desztillált vizet adunk hozzá, majd ismét bepároljuk. Ezt a műveletet még háromszor megismételjük, és az utolsó alkalommal a mintát szárazra pároljuk.

A DNFB-lal nem kezelt fehérjehidrolizátum elkészítése során a vizsgálandó mintából annyit mérünk be, hogy a hidrolízis végén a nátrium-citráttal 100 cm^3 -re hígított oldat köbcentiméterenként $0,18\text{--}0,22\text{ mg}$ fehérjét tartalmazzon. A mintát 4–5 üveggyönggyel együtt 500 cm^3 -es gömblombikba tesszük, 200 cm^3 6M sósavat adunk hozzá, amelyből 100 cm^3 -t eldesztillálunk. Ezt követően nitrogénáramban, 24 órán át hidrolizáljuk, majd rotációs gyorsbepárlóval $40\text{ }^\circ\text{C}$ -on bepároljuk, 100 cm^3 vízben a bepárlási maradékot feloldjuk, majd ismét bepároljuk. Ez utóbbi műveletet háromszor ismételjük, és az utolsó bepárlásnál a lombik tartalmát szárazra pároljuk. Mind a DNFB-lal kezelt, mind a nem kezelt, szárazra párolt mintákat 100 cm^3 -re hígítjuk fel, ügyelve arra, hogy az oldat köbcentiméterenként az első esetben $0,72\text{--}0,88\text{ mg}$, a második esetben pedig $0,18\text{--}0,22\text{ mg}$ fehérjét tartalmazzon. A mérőlombikot lezárjuk, 5 percig rázatjuk, majd az oldatot analitikai szűrőpapíron lezárható üvegekbe szűrjük, és az aminosav-analizátor típusától függően – az optimális érzékenység szem előtt tartásával – $0,1\text{--}0,5\text{ cm}^3$ mintát viszünk fel az ioncserélő oszlopra.

A vonatkozó fejezetben leírtak szerint mindkét minta lizintartalmát meghatározzuk, melynek során a bemérés, az oszlopra felvitt hidrolizátum mennyisége és a hidrolízis során alkalmazott hígítások ismeretében a DNFB-lal kezelt és a kezeletlen minta százalékos lizintartalma kiszámítható. A minta DNFB-lal reagált „hasznosítható” lizintartalmát úgy számoljuk ki, hogy *a kezeletlen mintában mért százalékos lizintartalomtól kivonjuk a DNFB-lal reagáltatott minta százalékos lizintartalmát*. A DNFB-lal reagált lizintartalom az összes lizintartalom százalékában kifejezve a hozzáférhető lizin százalékos mennyiségét adja meg.

A módszer alacsony szénhidráttartalmú minták esetében jól reprodukálható, a pontosságot a nagy szénhidráttartalom csökkenti. Amennyiben a lizin hozzáférhetőségében 10% csökkenés mutatkozik, akkor

az már a fehérje jelentős hőkárosodására utal, amely valószínűleg a fehérje biológiai értékének csökkenésében is megmutatkozik.

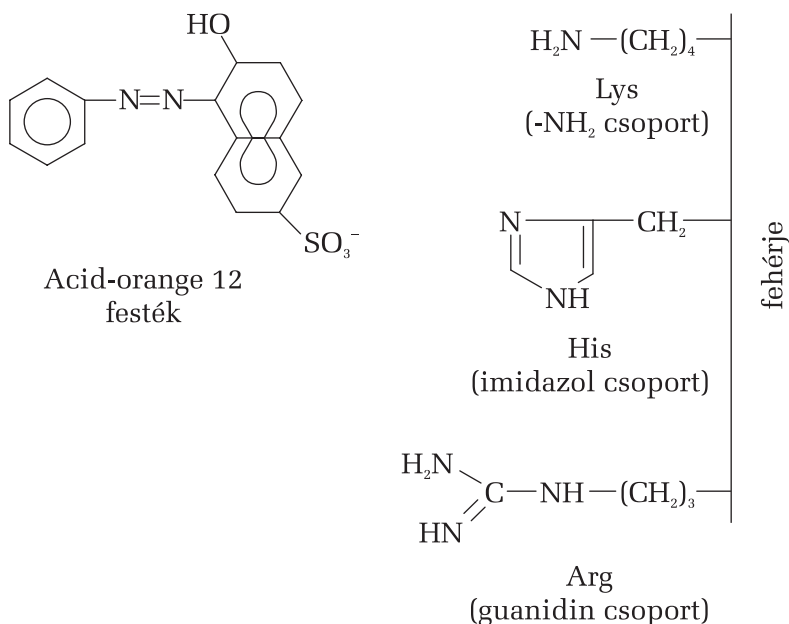
7.2.3.2. *A hasznosítható lizintartalom meghatározása festékkötés alapján*

A fehérjékben lévő aminosavak közül a lizin, a hisztidin és az arginin rendelkezik bázikus oldallánccal, melyek képesek különböző savanyú festékek megkötésére. A lizin ϵ -aminocsoportjának festékkötését a hisztidin imidazol- és az arginin guanidincsoportjának festékkötésével együtt lehet csak meghatározni, hisz mindhárom aminosav festékkötés tekintetében hasonló módon viselkedik. A három aminosav között különbséget csak úgy lehet tenni, hogy a lizin ϵ -aminocsoportjának blokkolását követően meghatározzuk a hisztidin és az arginin festékkötését, majd a három aminosav együttes festékkötéséből levonva a hisztidin és arginin festékkötését, megkapjuk a lizin szabad ϵ -aminocsoportja által megkötött festék mennyiségét.

Az eljárás során a finomra őrölt mintához az A vizsgálatnál nátrium-acetátot, ecetsavat és festékkoldatot adunk, majd 1 órán át rázógéppel rázatjuk. E vizsgálattal mindhárom aminosav festékkötését meg tudjuk határozni. Ezt követően ugyanehhez a mintához a B vizsgálatnál nátrium-acetátot és ecetsavanhidridet töltünk, mellyel blokkoljuk a lizin ϵ -aminocsoportját, festékkoldatot adunk hozzá, majd ismételt ráztatás következik. Az A-minta esetében a festéket a fehérje hisztidinje, argininje és szabad ϵ -aminocsoportú lizinje köti meg, a B esetben pedig a lizin szabad ϵ -aminocsoportjának ecetsavanhidriddel történő blokkolása után a hisztidin és arginin köti meg a festéket. A meg nem kötött festékkoldat koncentrációját mindkét esetben 475 nm hullámhossznál spektrofotométeren mérjük, az eredményt pedig kalibrációs görbe segítségével számítjuk. A festékkötő lizintartalmat megkapjuk, ha az összes bázikus aminosav festékkötő kapacitásából levonjuk a lizin acetilezéssel történő blokkolása után a hisztidin és az arginin festékkötő kapacitását. A festékkötés mechanizmusát a 7.1. ábra mutatja.

Az eljáráshoz az alábbi vegyszereket használjuk:

- acid-orange 12 festék (5-benzolazo-6-naftol-2-szulfonsav-nátrium),
- kálium-dihidrogén-foszfát,
- ecetsav, foszforsav, oxálsav, propionsav, desztillált víz,
- 96%-os etil-alkohol, ecetsavanhidrid, nátrium-acetát.



7.1. ábra. A bázikus aminosavak oldalláncainak festékkötése

Amennyiben nincs friss, analitikailag legtisztább minőségű *acid-orange 12* festékünk, akkor azt a következőképpen lehet *átkristályosítással megtisztítani*. 50 g festéket feloldunk egy kétliteres *Erlenmeyer*-lombikban 250 cm³ forró vízben, majd hozzáadunk 200 cm³ etanolt és enyhén melegítjük, míg a festék teljesen feloldódik. A festék feloldódása után az oldatot hagyjuk kihűlni, majd hűtőszekrénybe tesszük, és néhány órai állás után a kivált kristályokat leszűrjük, alkohollal többször átmoszuk, majd 100 °C-on megszárítjuk. A folyamatot kétszer megismételve a festék tisztasága megfelelő, ha a 0,04 mmol koncentrációjú pufferes oldat abszorbanciája 1 cm-es küvettában, 475 nm hullámhossznál, a pufferoldattal szemben mérve, 0,800.

A *pufferoldat készítése* során 1 dm³ 60 °C-os vízben feloldunk 17 g kálium-dihidrogén-foszfátot és 10 g oxálsavat, a lehűlés után ötliteres edénybe öntjük, hozzáadunk 15 cm³ 1:1 hígítású foszforsavat, 300 cm³ ecetsavat, 5 cm³ propionsavat és desztillált vízzel 5 literre egészítjük ki. A festékoldat készítése során 2,8024 g *acid-orange 12* festéket oldunk

fel 500 cm³ 60 °C-os pufferoldatban, lehűlés után kétliteres mérőlombikba töltjük, pufferoldattal feltöltjük, melynek következtében a kapott festékoldat koncentrációja 4 mmol.

A vizsgálati eljárás során a jól homogenizált 200 μm lyukbőségű szitán átesett anyagból A és B vizsgálatához mérünk be. Az A vizsgálat során 0,14 g vizsgálandó anyagot (x_1), 0,2 mg pontossággal bemérünk, 100 cm³-es polárlombikba tesszük, hozzáadunk 4 cm³ 5%-os nátrium-acetátoldatot, 0,8 cm³ ecetsavat, néhány üveggyöngyöt és 40 cm³ festékoldatot, lezárjuk és 1 órán át rázógéppel rázatjuk. Egy éjszakai állás után az oldat tisztáját dekantáljuk, amennyiben ez nem lehetséges, akkor fél óráig 2500–3000 g-n centrifugáljuk. A tükrös oldatból 0,5 cm³-t 50 cm³-re hígítunk, és mérjük a nem reagált festékoldat abszorbanciáját spektrofotométeren 475 nm hullámhossznál, 1 cm-es küvettában, a pufferoldattal szemben. A nem reagált festék koncentrációját (C) a kalibrációs görbéből számoljuk, melynek értéke 1,0–2,5 mmol közé kell hogy essen. A reakcióelegyben megkötött festék mennyiségét (d) a következő képlet szerint számoljuk, és mmol/dm³-ben adjuk meg:

$$d = C \left(4 \cdot \frac{40}{44,8} \right),$$

ahol:

40 = a festékoldat mennyisége (cm³),

44,8 = az oldat összterfogata (cm³),

4 = a felhasznált festékoldat koncentrációja (mmol).

Ennek ismeretében kiszámíthatjuk a 2,2 mmol/dm³ d -értékhez tartozó minta mennyiségét (x_2) grammban, a következő képlet szerint:

$$x_2 = \frac{2,2 \cdot x_1}{d}.$$

Ezt követően mérjük be két darab x_2 tömegű mintát, és ismételjük meg az előzőekben leírt műveleteket a nátrium-acetáttal, az ecetsavval és a festékoldattal, majd az így kapott értékeket használjuk a végső számításnál.

A B vizsgálat során mérjük 0,28 g vizsgálandó anyagot (y_1) 0,2 mg pontossággal egy 100 cm³-es polárlombikba, adjunk hozzá 4 cm³ 5%-os nátrium-acetátot, 0,8 cm³ ecetsavanhidridet és néhány üveggyöngyöt, zárjuk le és rázassuk 30 percig. Ezt követően adjunk hozzá 40 cm³ festékoldatot és rázassuk további 1 órán át. Egy éjszakán át állni hagyjuk,

melyet követően a tükrös oldatot dekantáljuk, amennyiben ez nem sikerül, akkor 30 percig 2500–3000 g-n centrifugáljuk. A tükrös oldatból százszoros hígítást készítünk, és mérjük a nem reagált festékolat abszorbanciáját spektrofotométeren, 475 nm hullámhosszon a pufferoldattal szemben. A nem reagált festékolat koncentrációját (C) az előbbieken leírt módon számítjuk. Ugyanúgy járunk el a megkötött festékolat-koncentráció (g) és az új bemerendő mennyiség (y_2) kiszámításánál is.

$$y_2 = \frac{2,2 \cdot y_1}{d}.$$

Mérjük be két y_2 tömegű mintát és ismételjük meg a műveleteket nátrium-acetáttal, az ecetsavanhidriddel és a festékolattal, és a végső számításnál a kapott értékeket használjuk.

A kalibrációs görbe készítésekor pipettázzunk 10, 20, 30, 40 cm³-ket a 4 mmólos festékolatból egy 50 cm³-es mérőlombikba, töltsük jelig pufferoldattal és rázzuk össze. Mindegyik így készített oldatból végezzünk egy százszoros hígítást pufferoldattal, rázzuk össze és mérjük az abszorbanciát 475 nm hullámhossznál, ábrázoljuk a koncentrációt (0,8; 1,6; 2,4; 3,2 mmol/dm³) az abszorbancia függvényében, vagy képezzük az 1 mmol festékkoncentrációhoz tartozó abszorbancia átlagot.

Az eredmények számítása során ügyelni kell arra, hogy a végső meghatározásnak az 1,37 mmol/dm³ (C) egyensúlyi festékkoncentrációhoz közel kell állnia, ami ekvivalens 2,2 mmol/dm³ megkötött festékkal. Ez biztosítja, hogy az egyensúlyi festékkoncentrációk az A- és B-meghatározások esetén 0,3 mmol/dm³-nél jobban nem térnek el egymástól. Ha ez nem így lenne A és B esetében, akkor az elemzést megfelelő tömegű beméréssel meg kell ismételni. A festékkötő-kapacitást (DBC, mmol megkötött festék/100 g minta) a következő képlettel lehet számolni:

$$4 \cdot \frac{40}{44,8} - \text{egyensúlyi festékkoncentráció} \cdot \frac{448}{1000} \cdot \frac{100}{\text{minta tömege (g)}},$$

vagy

$$\frac{4,48 \cdot d}{\text{minta tömege (g)}}.$$

A festékmegkötő lizin mennyiségét (DBL) mmol/100 g minta egységekben megkapjuk, ha a DBC A-módszerből kivonjuk a DBC B-módszert, azaz:

$$\text{DBL} = \text{DBC A-módszer} - \text{DBC B-módszer.}$$

A festékkötő lizin értékéből a *hasznosítható lizintartalmat* százalékban az alábbi képlet szerint számítjuk:

$$\text{hasznosítható lizintartalom \%} = \frac{\text{DBL} \cdot 146}{1000}.$$

Az azonos mintából végzett párhuzamos mérések között a megengedett legnagyobb eltérés az eredmények 10%-a lehet.

7.2.4. A hasznosítható metionintartalom meghatározása

A metionin rendkívüli módon érzékeny az oxidációra, melynek során tioéter-csoportja oxidálódik, a metioninból pedig metionin-szulfon, illetve metionin-szulfoxid keletkezik. A metionin-szulfonról tudjuk, hogy az állatok többsége nem tudja hasznosítani, a metionin-szulfoxid biológiai hasznossága pedig vitatott, és a különböző állatfajoknál más és más.

Aminosav-analizátorral, ha perhangyasavas oxidációt végzünk, csak a metionin összes mennyiségét tudjuk meghatározni metionin-szulfon formában, de nem tudjuk azt, hogy mennyi volt a mintában a metionin- és a különböző oxidált származékok mennyisége. Ha perhangyasavas oxidáció nélkül végezzük az aminosav-analízist – a hidrolíziskörülményektől függően –, a metionin tioéter-csoportja kisebb-nagyobb mértékben oxidálódhat, meghamisítva ezzel a metionin analízisét. Ha a hidrolizáló ágenshez redukáló anyagot adunk, vagy maga a hidrolizáló ágens redukáló anyag (pl. 3M merkapto-etán-szulfonsav), a fordított hatást érjük el, ekkor ugyanis az oxidált származékok redukálódva nagyobbak mutatják a hasznosítható metionin mennyiségét.

Fentiek miatt csak azok a módszerek jöhetnek szóba a *hasznosítható metionintartalom meghatározásakor*, melyek a metionin szabad tioéter-csoportjával létrehozott reakción alapulnak. Ilyen módszer például a metionin fotometriás meghatározására használt Holz-féle reakción alapuló eljárás, melynek során a metionin szabad tioéter-csoportja elszínteleníti a platina-jód komplexet, és az elszíntelenedés mértékéből a hasznosítható metionintartalomra lehet következtetni. A cisztein minimális zavaró hatásának kiküszöbölése után a módszer alkalmas a hasznosítható metionintartalom meghatározására (5.9. fejezet).

Ugyanebben a fejezetben található leírás a metionintartalom gázkromatográfiás meghatározására *brómcianos hasítás után*, melynek során *metil-tiocianát keletkezik a szabad tioéter-csoporttal ekvivalens mennyiségben*. A reakciót a metionin különböző oxidációs termékei nem adják, ezért ez a módszer is kiválóan alkalmas a hasznosítható metionintartalom meghatározására.

7.2.5. A bakteriális eredetű fehérje mennyiségének meghatározása

Kérődző állatok (szarvasmarha, kecske, juh stb.) bendőjében a takarmány fehérjetartalmának átlagosan 70%-a aminosavakra bomlik le, mely aminosavak vagy a mikrobafehérjék szintézisére használnak fel, vagy tovább bomlanak és a mikrobáknak testfehérjéjük felépítésére ammóniát szolgáltatnak. A fel nem használt ammónia felszívódik a bendőből, és a májban az ornitinciklusban karbamid képződik belőle. A szarvasmarha takarmányozásában az utóbbi évtizedben számos országban bevezetett új fehérjeértékelési rendszerek közös vonása, hogy a takarmányok fehérjetartalmát a belőlük a vékonybélben felszívódó aminosavak mennyisége alapján bírálják el. A felszívódó aminosav mennyiségét a csak kis hányadot kitevő endogén aminosavak mellett döntően két aminosavforrás, nevezetesen a bendőben szintetizálódó mikrobafehérje, valamint a takarmány fehérjéjének bendőben le nem bomló (by pass) hányada határozza meg. A bendőben termelődő mikrobafehérje ismerete azért is fontos, mert csak ennek ismeretében tudjuk a takarmányfehérje by pass hányadát megállapítani.

A bendőben szintetizálódott mikrobafehérje mennyiségének megismeréséhez szükséges, hogy a duodenális kimuszban szét tudjuk választani a mikrobiális fehérjét a takarmány by pass hányadától, valamint az endogén eredetű fehérjétől. Ez csak akkor lehetséges, ha *a fehérjében olyan komponenseket találunk, amelyek csak a mikrobafehérjére jellemzőek*. Az elmúlt években több módszert dolgoztak ki a bendőből az oltóba, illetve vékonybélbe jutó nitrogéntartalmú anyagok mikrobiális eredetű részének meghatározására. E módszerek olyan komponensek analíziséen alapulnak, melyekről a módszer kidolgozói azt gondolják, hogy ezek csak mikrobiális eredetűek lehetnek, vagy kapcsolatuk a mikrobiális eredetű fehérjével igen szoros. Vizsgálták e tekintetben a ribonukleinsavat (RNS), az adenzin-trifoszfátot (ATP), a 35-ös kén- (^{35}S) és a 15-ös nitrogénizotóp (^{15}N) baktériumfehérjébe történő beépülését, a 32-es (^{32}P)

és a 33-as (^{33}P) foszforizotóp beépülését a bakteriális foszfolipidekbe. Vizsgálták a duodenális kimusz aminosav-összetételét, az amino-etil-foszorsav (AEP) és a diamino-pimelinsav (DAPA), a D-alanin (D-Ala), legújabban pedig a D-aszparaginsav (D-Asp) és a D-glutaminsav (D-Glu) mennyiségét.

7.2.5.1. A ribonukleinsavak felhasználása

A ribonukleinsavakat *Smith* és *McAllan* használta először a bakteriális és a protozoa fehérjeszintézis mennyiségének meghatározására az RNS összes nitrogénhez viszonyított aránya alapján. Az RNS-meghatározás azonban nemcsak rendkívül körülményes és fárasztó, de még azt is feltételezi, hogy az összes takarmányeredetű RNS lebomlik a bendőben. Többen kétségüket fejezték ki a módszer megbízhatóságát illetően, illetve sokak véleménye szerint a módszer túlbecsli a mikrobiális fehérje mennyiségét, ami különösen akkor jelentős, ha a takarmányfehérje nagyobb mennyiségben tartalmaz nagy nukleinsav- és fehérjetartalommal rendelkező, a fehérjeoldhatóság csökkentése céljából hőkezelt takarmányokat. *Smith* szerint az RNS-módszer kissé túlbecsli a bakteriális fehérje mennyiségét a duodenumban, és problémaként jelzi még azt is, hogy az RNS-összesnitrogén arány, mely a meghatározás sarokpontja, függ a takarmányok minőségétől és a környezeti viszonyoktól is.

Smith és *McAllan* összehasonlítva az RNS- és a DAPA-módszert a duodenum bakteriális eredetű fehérjetartalmának meghatározására megállapították, hogy a két módszer között igen jó az egyezés akkor, ha protozoamentes állatokkal végezték a kísérleteiket, normál bendőflóra és fauna esetében viszont jelentős különbség volt a két módszer között. Levonták azt a következtetést, hogy a DAPA-módszer jelentősen alábecsli a kimuszfehérje mikrobiális eredetű részét, mert az nem számol a protozoák jelenlétével. Elképzelhető persze az is, hogy a takarmány RNS-tartalmának jelentős része nem bomlik le a bendőben, és nem a DAPA-módszer becsül alá, hanem az RNS-módszer becsül túl. Ezeket a hibákat részben kiküszöböli a *Broderick* és *Merchen* által leírt módszer, akik a bendőből izolált baktériumok purin-nitrogén arányát határozták meg a bendőben szintetizált fehérje mennyiségének mérésére.

7.2.5.2. Az adenzin-trifoszfát felhasználása

Forsberg és *Lamm* az ATP mikrobiális markerként történő felhasználhatóságát tanulmányozva megállapították, hogy az jó mikrobiális marker lehet, mert csak élő sejtekben fordul elő, a holt sejtekből nem mutatható ki. Az ATP mennyisége minden mikrobában nagyon hasonló, meghatározása relatíve egyszerű, megbízható és olcsó. Ugyanakkor azt is konstatálták, hogy az ATP kivonhatósága függ a vizsgált anyag minőségétől, és a mikrobák ATP-tartalmában is jelentős különbségeket figyeltek meg. Többek véleménye szerint az eredmények nagy szórást mutatnak, és egyesek szerint az ATP-koncentráció inkább a biomassza aktivitásával, mint annak tömegével hozható kapcsolatba. Megállapították, hogy a biomassza ATP-tartalma 0,07–0,25% között változik, és jelentős mértékben függ a takarmányfehérje minőségétől. Úgy tűnik, hogy ez a módszer még nem érett meg arra, hogy a mikrobiális eredetű fehérje mennyiségének becslésére rutinszerűen alkalmazható legyen.

7.2.5.3. A ^{35}S -izotóp beépülésének felhasználása

Henderich javasolta elsőként a ^{35}S -izotóp mikrobiális markerként történő használatát, melyet követően a radioizotóp módszerek közül e módszer terjedt el leginkább a kutatásban. *Walker* és *Naden* a radioaktív nátrium-szulfidot *in vitro* kísérletben használta a mikrobiális eredetű fehérje meghatározására. Elképzelésük szerint a baktériumfehérje összes kéntartalmú aminosava a kén-hidrogénen keresztül szintetizálódik, ami feltételezésük szerint Na_2^{35}S -ből keletkezik, így mennyisége a ^{35}S -tartalom alapján mérhetővé válik. Míg *in vitro* kísérletekben ez az elképzelés bevált, és a bakteriális fehérjébe csak elhanyagolhatóan kevés olyan kén épült be, amely nem a Na_2^{35}S -ből származott, addig *in vivo* kísérletekből kiderült, hogy a bakteriális fehérje kéntartalmú aminosavainak jelentős része a takarmány kéntartalmú aminosavaiból származik.

Ezt követően egy olyan módszert dolgoztak ki, melynek során a ^{35}S -tel jelzett inorganikus szulfátot folyamatosan juttatva be a bendőbe, mérték a mikrobiális fehérjeszintézist. E módszer előnye az, hogy nem a bomlékony nátrium-szulfidot használja, és nem követeli meg, hogy az összes mikrobiális fehérje kéntartalmú aminosava ^{35}S -ből származzon. A DAPA-val végzett összehasonlító kísérletekben szignifikáns összefüggést állapítottak meg a két módszer között. Kísérleteikben a DAPA

30%-kal kisebb értékeket adott a mikrobiális fehérjére a ^{35}S -módszerhez hasonlítva.

A ^{35}S -ös nyomjelzésnél mérhetjük a kimusz és a szeparált mikrobafrakció specifikus mikrobaaktivitás arányát a cisztintartalom, a metionintartalom vagy az összes kéntartalmú aminosav kéntartalma alapján. A módszer alkalmazásának csak az szab határt, hogy nem tudni pontosan, hogy a ^{35}S -ből mennyi épül be a mikrobiális fehérjébe. *Nikolic* a kéntartalmú aminosavak összes fehérjéhez való viszonyát használta fel a mikrobiális eredetű fehérje becslésére.

E két *izotópos módszernek* határt szab még az is, hogy *viszonylag drágák és igen munkaigényesek*, annak ellenére, hogy a kéntartalmú aminosavak elválasztása és kinyerése nem szükséges a specifikus aktivitás mérése miatt. A módszer *inkább alkalmas az összes mikrobiális fehérje mérésére*, és kevésbé alkalmas a bakteriális eredetű fehérje mennyiségének meghatározására, amint az a DAPA-val való összehasonlítás során kiderült.

7.2.5.4. A ^{15}N -izotóp beépülésének felhasználása

A mikrobiális fehérjeszintézist becsülni lehet a ^{15}N fehérjébe történő beépülésének mérésével. E módszer csak a ^{15}N beépülésével számol, és nem foglalkozik azzal, hogy a fehérjék egy része közvetlenül aminosavakból vagy peptidekből épül fel. Amellett, hogy a módszer drága, a ^{15}N mérése is jelentős hibával terhelt, ennek ellenére – mivel itt a nitrogén a marker – a módszer alkalmas a bendőben lejátszódo nitrogén-metabolizmus dinamikájának tanulmányozására. Egyesek a $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ alkalmazásával, mások pedig a $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ alkalmazásával próbálták a ^{15}N -t a fehérjébe bevinni. Összehasonlítva a ^{15}N - és a ^{35}S -módszert, hidegben tartott juhok esetében megállapították, hogy a ^{15}N -módszerrel mintegy 10%-kal kevesebb bakteriális eredetű fehérjét határoztak meg annál, mint amikor ^{35}S -t használtak bakteriális markerként.

7.2.5.5. A jelzett foszfor beépülésének felhasználása

Buch, Holtz és Bergen megfigyelése szerint a foszfor beépülése a mikrobiális foszfolipidekbe igen szoros kapcsolatban van a bendőben lejátszódo fehérjeszintézis mértékével, ezért javaslatot tettek a fehérjeszintézis mértékének becslésére a ^{32}P beépülése alapján in vitro körülmények

között. *Van Nevel* és *Demeyer* a ^{32}P jelzett extracelluláris foszfor mikrobiális foszforra történő beépülését mérve tudtak a mikrobiális növekedés mértékére következtetni. A módszer akkor ad megbízható eredményeket, ha az összes mikrobiális frakcióban beépült foszfor a jelzett inorganikus foszfortól származik; a specifikus aktivitás az intracelluláris foszforkészletnél ugyanaz, mint az extracellulárisnál; a jelöletlen sejtek nem pusztulnak el, és a sejtösszetétel is azonos marad a növekedés folyamán. *In vitro* kísérletekből kiderült azonban, hogy ezen utolsó állítás a bendőmikroorganizmusok esetében nem valósul meg, *Durand* és mtsai. az előző módszer segítségével kidolgozott lineáris regressziós egyenleteket használták a fehérjeszintézis mennyiségének előrejelzésére.

Harmeyer és mtsai. egy tanulmányban az izotóp-markerekkel (^{15}N , ^{35}S , ^{32}P) kapott eredményeket összehasonlítva megállapították, hogy mind a különböző kicserélődések, mind a különböző degradációk jelentős mértékben végbemennek a bendőben. Az izotóptechnika nem elég jó arra az esetre, ha nincs növekedés, illetve ha pusztulás van a bendőmikroorganizmusoknál. Negatív a növekedés akkor, ha a mikrobiális degradáció foka nagyobb, mint a szintézisé. *Smith* és mtsai. egy olyan módszert javasolnak, ahol a ^{32}P beépülését mérik a mikrobiális nukleinsavakba. Megállapították, hogy a ^{32}P -vel jelzett RNS csak mintegy 85%-át tette ki az összes RNS-nek, amit a takarmány le nem bomlott RNS-tartalmával tudtak magyarázni.

7.2.5.6. Az aminosav-összetétel felhasználása

Evans és mtsai. a kimusz aminosav-összetételének mérésével tudtak annak takarmány- és mikrobiális eredetű részére következtetni, melynek során a duodenumot elérő fehérjéket azok speciális aminosav-összetétele alapján azonosították. A kimusz aminosav-összetételét különböző komponensek alakítják ki, ezért az aminosav-összetétel alapján történő komputeres kiértékeléshez figyelembe kell venni az etetett takarmányok mennyiségét és aminosav-összetételét, valamint az endogén eredetű fehérje mennyiségét és összetételét is. A módszer feltételezi azt, hogy a mikrobiális fehérje mindig azonos minőségű, és azt is, hogy az egyes komponensek a takarmányban olyan hatást fejtenek ki, mintha egyedül lennének jelen. Összehasonlítva a duodenumon áthaladó mikrobiális eredetű fehérjét az aminosav-tartalom alapján mérve, illetve a DAPA-módszerrel meghatározva megállapították, hogy a két módszerrel kapott

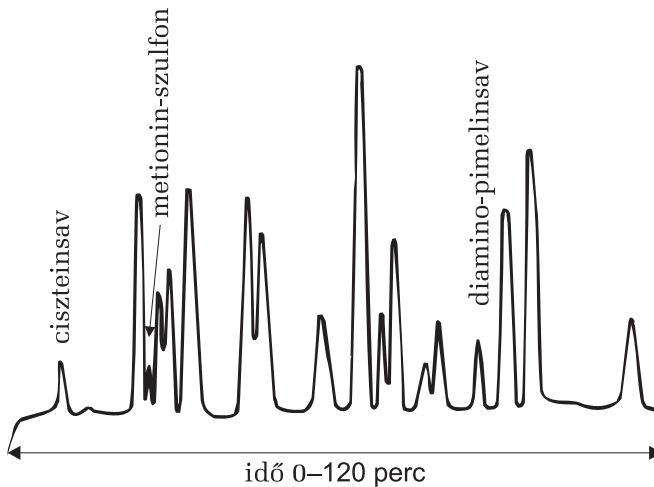
eredmények jó egyezést mutatnak. E módszer elterjedésének határt szabott az aminosav-analízis ára, a komputeres kiértékelés bonyolultsága, illetve az, hogy még nagyon keveset tudnak a hagyományos takarmányokban jelenlévő fehérjék lebonthatóságáról.

7.2.5.7. A diamino-pimelinsav és az aminoetil-foszfonosav felhasználása

A DAPA-t *Veller* és *mtsai.* használták először a baktériumok által szintetizált fehérje mennyiségének becslésére. A módszer előnye, hogy a DAPA a baktériumok sejtfalában lévő peptidoglikánok alkotórésze, kevés kivételtől eltekintve szinte minden baktériumban előfordul, nem alkotórésze viszont a természetes eredetű takarmányoknak. DAPA-t nyomokban a protozoákból is ki tudtak mutatni, ami valószínűleg a protozoák baktériumfogyasztásával áll kapcsolatban. A módszer alapja az, hogy meg kell határozni a DAPA–nitrogén arányt a bendőből előállított baktériummasszában és a béltartalomban, mely értékekből a kimusz bakteriális eredetű nitrogéntartalma számítható.

A DAPA meghatározására bendőfolyadékából, illetve béltartalomból többféle módszerrel is kísérleteztek. *Hutton* és *mtsai.* automatikus aminosav-analizátorral határozták meg a DAPA-t, kihasználva azt a tulajdonságát, hogy a prolinhoz hasonlóan savas ninhidrindattal sárgás színű színreakciót ad, melynek maximális fényelnyelése 420 nm-en mérhető. *Czerkawski* a DAPA meghatározásakor a fehérjét savval hidrolizálta, a hidrolizátumot csontszénoszlopon tisztította, anioncserélő oszlopon elválasztotta a DAPA-t a prolintól, majd a DAPA-t savas ninhidrinnel meghatározta. Megállapították, hogy a DAPA részaránya az összes baktériumfehérjéhez viszonyítva, állandó takarmányozási feltételek mellett, nem változik, ezért annak ellenére, hogy a DAPA mennyisége a sejtfalban a baktériumfajtól erőteljesen függ, a DAPA a béltartalomban található fehérje bakteriális eredetű részének becslésére összehasonlítható kísérletekben jól hasznosítható. *Edols* automatikus aminosav-analizátorral kétoszlopos módszert alkalmazva határozta meg a bendőfolyadék DAPA-tartalmát. A pufferek összetételének optimalizálásával a DAPA a metionin és az izoleucin között jelent meg a kromatogramon, ezektől az aminosavaktól jól elkülönülve, éles, jól értékelhető csúcs formájában. E módszer kiválóan alkalmas a DAPA meghatározására akkor, ha annak koncentrációja eléri a mintában lévő fehérjealkotó aminosavak koncentrációjának legalább 10%-át. Amennyiben a DAPA koncentrációja ennél kisebb,

az elválás romlik, és a szomszédos aminosavak a DAPA koncentrációját kiértékelhetetlenné teszik. Fentiek miatt *Csapó* és *mtsai.* a fehérje hidrolízise előtt azt perhangyasavval oxidálták, melynek következtében a metionin metionin-szulfonná alakult át, és a továbbiakban már nem zavarta a DAPA meghatározását (7.2. ábra).



7.2. ábra. A diamino-pimelinsav mennyiségének meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával perhangyasavas oxidáció után

A pufferrendszerek megváltoztatásával elérték, hogy a DAPA a metionin eredeti helyén, pontosan az izoleucin és a valin között jelent meg a kromatogramon. Így kiküszöbölve a szomszédos aminosavak zavaró hatását, a mintában nyomnyi mennyiségben jelenlévő DAPA-t is pontosan meg tudták határozni. Ezt követően *Csapó* és *mtsai.* – kihasználva a metionin és DAPA hasonló kromatográfiás tulajdonságait – *csak a DAPA meghatározására ioncserés oszlopkromatográfiával gyors módszert dolgoztak ki.*

Annak ellenére, hogy a DAPA alkalmazásáról a bakteriális eredetű fehérje becslésére többen jó eredményekről számoltak be, meg kell említeni azt is, hogy a módszer sok hibával terhelt, mely hibaforrásokat a meghatározások során figyelembe kell venni. Változik a DAPA-tartalom a baktérium növekedésével és a baktérium méretének megváltoztatásával, hisz a DAPA csak a sejtfal peptidoglikánjaiban fordul elő, mely a baktérium növekedésével a baktérium összes tömegéhez képest relatíve csökken, azaz a nagyobb méret relatíve kisebb sejtfal-tartalommal jár

együtt, ami a DAPA mennyiségét csökkenti. Változhat a DAPA–fehérje arány az etetés után eltelt idő függvényében még akkor is, ha ugyanarról az állatról és ugyanarról a takarmányról van szó. Még nagyobb problémát jelet az, hogy a DAPA esetenként a bakteriális tevékenység következtében a takarmányokban is előfordulhat. Problémát okozhat a helytelenül megválasztott analitikai módszer is. A D-allo-izoleucin bizonyos kromatográfiás körülmények között zavarhatja a DAPA meghatározását, azzal összeolvadva a ténylegesnél lényegesen nagyobb eredményt produkál. Ha a prolin és a DAPA elválasztása a savas ninhidrinnel történő meghatározáskor nem tökéletes, akkor a DAPA mennyiségét jelentősen felülbecsli.

A protozoák is jelentős mértékben tartalmazhatnak DAPA-t, vagy a baktériumok és a protozoák szétválasztására alkalmazott analitikai módszer hibája következtében, vagy mert olyan DAPA-t is meghatároznak, amely a protozoák által bekebelezett és még meg nem emésztődött baktériumból származik. Egy másik hibaforrás lehet, hogy a bendőben elpusztult baktériumok protoplazmája gyorsabban lebomlik, mint a sejt-falban találhatóké, melynek nyomán a bendőből távozó DAPA, mivel relatíve nagyobb mennyiségben van jelen, túlbecsli a baktériumok által szintetizált fehérje mennyiségét.

A 2-aminoetil-foszfonsavat (AEP) először csillós egysejtűekből izolálták, és azt gondolták róla, hogy a kérődzők takarmányában nem fordul elő. Többen nagy sorozatban használták a DAPA-t bakteriális eredetű, az AEP-t pedig a protozoák által termelt fehérjék mennyiségének becslésére, később azonban az AEP-ről is kiderült, hogy mennyisége más és más a különböző csillós egysejtűeknél. Annak ellenére, hogy az AEP-ről megállapították, hogy mind a bendőbaktériumokban, mind a takarmányokban előfordul, sőt a halliszt is tartalmaz fitoplanktonokból származó AEP-t, sokan alkalmazták protozoa markerként.

7.2.5.8. A D-aminosavak felhasználása

Schleifer és Kandler felfedezték, hogy a DAPA mellett a D-alanin is csak a baktériumok sejt-falában lévő peptidoglikánokban fordul elő, így a bakteriális eredetű fehérje jelzésére és mennyiségi meghatározására ez a vegyület is jól használható. Bendőfolyadékából meghatározva a D-alanin-tartalmat, becsülték a baktériumok által szintetizált fehérje mennyiségét, és az összehasonlító vizsgálatokból kiderült, hogy a D-alanin legalább olyan jó marker, mint a DAPA, sőt még jobb is, mivel

a D-alanin alapján kapott eredmények variációs koefficiense lényegesen kisebb volt. A D-alanin mellett szól még az is, hogy a koncentrációja a peptidoglikánokban lényegesen nagyobb, mint a DAPA-é, és a D-alanint még azokból a baktériumfajokból is ki tudták mutatni, amelyekben a DAPA nem fordul elő.

Egy vizsgálatsorozatban *Csapó* és mtsai. is arra a megállapításra jutottak, hogy a *bakteriális eredetű fehérje mennyiségének becslésére mind a DAPA, mind a D-alanin jól használható*. A két anyag között sem az analitikai módszer hibája, sem a markerből számolt fehérjemeghatározás hibája tekintetében nem találtak jelentős különbséget. Meghatározva a szarvasmarha, a kecske és a juh bendőjéből származó baktériumok DAPA- és D-alanin-tartalmát, a három faj között e markerek tekintetében szignifikáns különbséget nem tudtak kimutatni.

7.2.5.9. A D-aszparaginsav és D-glutaminsav felhasználása

Csapó és mtsai. korábbi vizsgálataiból kiderült, hogy a *bendőbaktériumok* a D-alanin mellett *jelentős mennyiségben tartalmaznak D-aszparaginsavat és D-glutaminsavat is*. Egy kísérletsorozatban arra kerestek választ, hogy a D-Asp és a D-Glu lehet-e hasonló markere a bakteriális fehérjeszintézisnek, mint a D-Ala és a DAPA. Bendő- és duodenum-fisztulával ellátott bikák kimuszát és bendőfolyadékát elemezve meghatározták annak DAPA-tartalmát ioncserés oszlopkromatográfiával, D-Ala-, D-Asp- és D-Glu-tartalmát pedig nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával.

A meghatározás során a bendőfolyadékot a takarmányrészecskék és az infuzóriumok elkülönítésére 3000 g-n 10 percig centrifugálták, majd a folyadékfázis 16 000 g-n 30 percig történő centrifugálásával elkülönítették a baktériummasszát, melyet többszöri mosás és centrifugálás után liofilezással megszárítottak. Ugyancsak liofilezték a duodenumból vett kimuszmintákat is az analízis előtt. A DAPA meghatározása során a fehérje perhangyasavas oxidációját követően a mintát 6M sósavval 24 órán át hidrolizálták. Sokkal elővigyázatosabban kellett eljárniuk akkor, mikor a három D-aminosav meghatározását végezték, hisz a meghatározás sarkalatos pontja, hogy a fehérje hidrolízise közben ne lépjen fel *racemizáció*, hisz az *a mérési eredményeket meghamisítja*. Ezért a D-aminosavak meghatározása előtt a fehérjét 170 °C-on, 30 percig 6M sósavval hidrolizálták a lehető legkisebb racemizáció elérése érdekében. A D-aminosavak meghatározását a vonatkozó fejezetben leírtak

szerint OPA/TATG oszlopelőtti származékképzéssel, nagyhatékonyságú folyadékromatográfiával végezték. Az analízisek elvégzése után lineáris regresszióval vizsgálták a kapcsolatot a három D-aminosav és a DAPA között, valamint a D-aminosavak között. Megállapították, hogy mind a kimusz, mind a bendőbaktérium mintáknál *igen szoros az összefüggés* ($r=0,70-0,95$ között). Az r értéke a kimusz DAPA–D-Glu tartalma közötti összefüggést vizsgálva volt a legkisebb 0,70-nel és a kimusz D-Asp–D-Glu-nál volt a legnagyobb 0,95-tel. A bendőbaktériumokat elemezve, a nyersfehérje és a markerek közötti kapcsolatokat vizsgálva, az r -érték 0,61 és 0,74 között változott. A kimusz esetében viszont nem kaptak összefüggést a vizsgált markerek és a nyersfehérje-tartalom között, sőt a lineáris regresszió-vizsgálat mindhárom esetben igen gyenge negatív összefüggést mutatott; az r -érték $-0,04$ és $-0,16$ között változott. Az összefüggés hiányára magyarázatul szolgálhat, hogy a kimuszban lévő fehérjének csak egy része származik a baktériumoktól, másik részét azok a takarmányfehérjék képezik, melyek nem szenvednek bakteriális bomlást, míg kis részük endogén eredetű fehérje.

A lineáris regresszió paramétereinek felhasználásával a bendőbaktériumok nyersfehérje-tartalmára, a D-aminosavak alapján számolva, 49,05–49,96%-ot kaptak, míg a DAPA alapján kapott eredmény 49,26% volt. Ezek az értékek rendkívül jól egybeestek a *Kjeldahl*-módszerrel meghatározott nyersfehérje-tartalommal. Több párhuzamos analízis alapján a bendőbaktériumok DAPA-tartalmát 0,61%-nak mérték, ami kissé kevesebb a szakirodalomban közölt adatoknál, ami a kísérleti állataik által fogyasztott takarmányok eltérő minőségével magyarázható. Mivel vizsgálataik további célja most már tudatosan új markerek keresése volt, a DAPA irodalmi adatokhoz viszonyított kisebb koncentrációja a D-Asp-ra és a D-Glu-ra kapott eredményeket nem befolyásolta. A bendőbaktériumok átlagos D-aszparaginsav-tartalmát 0,74%-nak, D-glutaminsav-tartalmát pedig 1,00%-nak mérték. A bendőbaktériumok analízise után a nyersfehérje-tartalom függvényében olyan *szorzófaktorokat képeztek*, melyek segítségével egy ismeretlen mintában lévő *fehérje bakteriális eredetű része a markerek alapján becsülhető*. A szorzófaktorok a DAPA és a két új marker esetén az alábbiak voltak: $DAPA=100/0,61=166,6$; $D-Asp=100/0,74=135,1$; $D-Glu=100/1,00=100,00$. Ebből következően tehát, ha egy ismeretlen anyag DAPA-tartalmát (%) 166,6-del, D-Asp-tartalmát (%) 135,1-del és D-Glu-tartalmát (%) pedig 100,00-val megszorozzák, akkor megkapják a bendőbaktériumok által szintetizált fehérje mennyiségét.

Annak eldöntésére, hogy az általuk kapott szorzószámok a gyakorlatban hogyan használhatók, két kísérletet végeztek. Az elsőben különböző kimuszminták DAPA-, D-Glu-, illetve D-Asp-tartalmát határozták meg, és alkalmazták a mért adatokra a szorzófaktorokat. A DAPA-tartalom alapján becsült értékek átlagosan 10%-kal voltak nagyobbak, összefüggésben azzal, hogy a bendőbaktériumok DAPA-tartalmát az irodalomban közöltekhez képest kisebbnek mérték. A D-Glu- és D-Asp-tartalom alapján kapott értékek szinte egybeestek.

A szorzófaktorok tesztelését célzó kísérlet második részében 17 liofilezett bendőbaktérium mintából egy átlagmintát állítottak elő, melynek nyersfehérje-tartalmát 49,52%-nak, DAPA-tartalmát 0,325%-nak, D-Asp-tartalmát 0,363%-nak, D-Glu-tartalmát pedig 0,492%-nak mérték. A kalkulált szorzófaktorok alkalmazásával a nyersfehérje-tartalmat sorrendben 53,59; 49,13; 49,88%-nak becsülték. Ezen túl módszerüket tesztelték a különböző mennyiségben húsliszthez kevert baktérium-massza segítségével is, hogy vizsgálják a módszer pontosságát kisebb koncentrációjú markerek esetén. Vizsgálataik, illetve az elvégzett tesztek bizonyítják, hogy a DAPA mellett *mind a D-Asp, mind a D-Glu alkalmas lehet a bakteriális eredetű fehérje mérésére*. A két új bakteriális marker alkalmazásával kapott eredmények mintegy 10%-kal kisebbek, mint amit a DAPA mérésekor kaptak, ami nem a két új marker hibájának, hanem inkább a DAPA-meghatározás bizonytalanságának köszönhető. Ismert bakteriális fehérjetartalmú mintával végzett analízisek bizonyítják, hogy a D-Asp és D-Glu gyakorlatilag azonos, a *Kjeldahl*-módszerrel meghatározott, vagy a kalkulált értékhez nagyon közel eső eredményt ad.

7.2.5.10. *Melyik az igazán jó marker?*

Az irodalmi adatokat elemezve úgy tűnik, hogy igazán jó bakteriális markert még mindig nem sikerült találni. A használt markerek egy részénél nehézkes az analitikai módszer, más részénél az alkalmazott markerek mind a baktériumokban, mind a protozoákban megtalálhatók, és vannak olyanok is, amelyekről az etetett takarmányok sem mentesek. Úgy tűnik, hogy *a legszélesebb körben alkalmazott DAPA analitikája jelenleg megoldott*, a *Csapó* és *mtsai*. által végzett módszerfejlesztés következtében a nyomnyi mennyiségben előforduló DAPA-t is pontosan meg lehet határozni. A szakirodalom tanulsága szerint ugyancsak *jól alkalmazható* a bakteriális eredetű fehérje mennyiségének mérésére *a D-Ala*, és alkalmas erre *a D-Asp* és *a D-Glu* is. Milyen előnyei

és hátrányai vannak a DAPA, valamint a D-aminosavak alkalmazásának? A DAPA-meghatározásnál a perhangyasavas kezelés az előkészítést ugyan hosszadalmassá teszi, de e nélkül a kis mennyiségben jelenlévő DAPA meghatározása, az esetenként nagyságrenddel nagyobb koncentrációban jelenlévő egyéb aminosavak miatt, bizonytalan. A DAPA analízisére alkalmas az ioncserés oszlopkromatográfia elvén működő aminosav-analizátor, míg a D-aminosavak ezzel a módszerrel nem határozhatók meg. A munkaigényesség mellett a DAPA meghatározása még idő- és vegyszerigényes is, tehát meglehetősen drága. A D-aminosavak meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával precízen megoldható, amennyiben csak a D-Asp és D-Glu mennyisége érdekel bennünket, akkor ezek analízise a *Csapó* és mtsai. által kifejlesztett gyors program alkalmazásával a DAPA-hoz képest negyed annyi idő alatt elvégezhető. A *D-aminosavak mérésénél* egy másik *probléma* jelentkezik, nevezetesen a *fehérje hidrolízise alatt fellépő racemizáció*, mely a vizsgálatok eredményeit meghamisíthatja, azaz a recemizációnak „köszönhetően” több D-Asp-t és D-Glu-t mérhetünk, amely alapján a bakteriális eredetű fehérje mennyiségét túlbecsüljük. Ennek kiküszöbölésére két módszer javasolható: egyrészt olyan hidrolízismódszert kell alkalmazni, melynek során a racemizáció csekély mértékű (160–170 °C, 30–45 perc, 6M HCl), másrészt az alkalmazni kívánt analitikai módszerrel meg kell határozni a bendőből nyert baktériumok D-aminosav-tartalmát, és *Csapó* és mtsai.-hoz hasonlóan szorzófaktorokat kell képezni a bakteriális eredetű fehérje mennyiségének becslésére. Ez utóbbi esetben ugyanis a fehérjehidrolízis során fellépő racemizáció egy konstans hibának tekinthető mind a szorzófaktorok megállapítása során, mind a tényleges minták analízisének, és így a meghatározás pontosságát lényegesen nem befolyásolja. A módszer akkor válik tökéletessé, ha egyrészt alacsony racemizációval járó fehérjehidrolízist használunk, másrészt az alkalmazott módszerrel meghatározzuk a szorzófaktorokat.

7.2.6. A valódi fehérje meghatározása

Élelmiszerek valódifehérje-tartalmát *Barnstein* módszere szerint határozzuk meg. A meghatározás során mindazokat a nitrogéntartalmú anyagokat – amidok, aminosavak, ammónia stb. –, amelyek nem fehérjéhez kötöttek, úgy távolítjuk el, hogy a *tiszta vagy valódi fehérjét* (a tiszta és a valódi ugyanazt jelenti, egymásnak szinonimái) *réz-szulfáttal és nátrium-hidroxiddal kicsapjuk*, a keletkezett fehérjecsapadékról

az egyéb nitrogéntartalmú anyagokat leszűrjük, a csapadékot bő vízzel többször kimossuk, majd a csapadék nitrogéntartalmát *Kjeldahl* szerint meghatározzuk.

A vizsgálati eljárás során a várható fehérjetartalom függvényében 1-2 g finomra őrölt, légszáraz anyagot 250 cm³-es *Griffin*-pohárban 100 cm³ desztillált vízzel felforralunk. A keményítődús anyagokat a desztillált víz hozzáadása után, a forralás előtt 30 percig 50 °C-os vízfürdőn melegítjük, mert különben az elegy nem, vagy nehezen szűrhető. Felforralás után 250 cm³ 6%-os réz-szulfát-oldatot, majd üvegbottal való keverés közben pár cm³-es adagokban 25 cm³ 1,25%-os nátronlúgot öntünk az elegyhez. A maradék ülepedése után a folyadék tisztáját nitrogénmentes szűrőpapíron átszűrjük, majd a csapadékot háromszori dekantálással, forró desztillált vízzel átmossuk. Ezután az egész csapadékot kvantitatíve a szűrőre visszük, és ott addig mossuk, amíg a szűrlet bárium-kloriddal szulfátreakciót nem ad. A szulfátionok 600 cm³ forró desztillált vízzel való mosás után már biztosan eltávoznak. A szűrést követően a szűrőpapírt a csapadékkal együtt henger formára csavarva *Kjeldahl*-lombikba tesszük, és a nitrogéntartalmat meghatározzuk. A valódifehérje-tartalom meghatározását a nyersfehérje-tartalom meghatározásához hasonlóan végezzük.

A kénsavas roncsolást követően meghatározott ammóniatartalomból az alábbi képlettel számoljuk a valódifehérje-tartalmat:

$$\text{valódifehérje-tartalom\%} = \frac{(S - L) \cdot 0,0028016 \cdot 6,25 \cdot 100}{b},$$

ahol:

S = a szedőlombikba tett 0,1 M H₂SO₄-oldat (cm³),

L = a titráláshoz fogyott 0,2 M NaOH-oldat (cm³),

0,0028016 = az 1 cm³ 0,1 M H₂SO₄-oldatnak megfelelő nitrogén tömege (g),

6,25 = az 1 g nitrogénnek megfelelő fehérje tömege (g),

b = a bemért anyag tömege (g).

7.3. Enzimes módszerek

7.3.1. Az emészthetőnyersfehérje-tartalom meghatározása in vitro pepszines hidrolízissel

A módszer alkalmas állati és növényi eredetű élelmiszerek emészthetőnyersfehérje-tartalmának meghatározására. Az eljárás során a vizsgálandó mintát sósavas *pepszinoldatban* szuszpendáljuk, és 39–40 °C-os hőmérsékletű termosztátba tesszük 48 órára. A sósavas *pepszinnel* oldatba vitt fehérje mennyiségét a szuszpenzió szűrletéből *Kjeldahl*-módszerrel határozzuk meg.

A vizsgálati eljárás során a 10%-nál nagyobb zsírtartalmú élelmiszert a sósavas *pepszinnel* való emésztés előtt zsírtalanítani kell. Ezt követően az előkészített vizsgálati anyagból 2 g-ot mérünk be egy 500 cm³-es *Stohman*-lombikba, hozzáadunk 0,83 g *pepszint*, és körkörös mozgással összekeverjük. Hozzáadunk néhány cm³ 39 °C-os hőmérsékletű, 0,075 M-os sósavoldatot, és ismételt körkörös mozdulattal a lombikban lévő anyagokat szuszpendáljuk úgy, hogy a minta teljes mennyisége átnedvesedjen, majd ezt követően a sósav térfogatát 450 cm³-re egészítjük ki. Ezután a lombikot vattával bedugjuk, és 39 °C-os hőmérsékletű termosztátba helyezzük 48 órára, amely időtartam alatt naponta többször, körkörös mozgatással a lombik tartalmát összekeverjük. 48 óra múlva a lombikot a termosztátból kivesszük, és 15 cm³ 25%-os HCl-oldatot töltünk rá, 20 °C-ra lehűtjük, majd jelig töltjük desztillált vízzel. A lombik tartalmát alaposan összerázzuk, szűrjük, a szűrlet aliquot részéből a nyersfehérje-tartalmat *Kjeldahl*-módszerrel meghatározzuk. A vizsgálat során vakpróbát is végzünk, amikor a mesterséges emésztést a minta nélkül, csupán az eljáráshoz használt vegyszerekkel végezzük el. A vakpróba emészthetőnyersfehérje-tartalmára kapott értéket le kell vonni a minta emészthetőnyersfehérje-tartalmának értékéből.

Az emészthetőnyersfehérje-tartalom kiszámításánál a nyersfehérje-tartalom meghatározásánál ismertetett módszer szerint kell eljárni:

$$\text{emészthetőnyersfehérje-tartalom\%} = \frac{(S - L) \cdot 0,0028016 \cdot 6,25 \cdot 100}{b},$$

ahol:

S = a szedőlombikba tett 0,1 M H₂SO₄-oldat (cm³),

L = a titráláshoz fogyott 0,2 M NaOH-oldat (cm³),

0,0028016 = az 1 cm³ 0,1 M H₂SO₄-oldatnak megfelelő nitrogén tömege (g),

$6,25$ = az 1 g nitrogénnek megfelelő fehérje tömege (g),

b = a bemért anyag tömege (g).

A kapott eredményt a hígítással korrigálva kapjuk meg az élelmiszer emészthetőségszámát.

A meghatározás során ügyelni kell arra, hogy a *pepszin* minősége megfelelő legyen, a csökkent aktivitású enzim ugyanis az eredményeket meghamisíthatja. A módszer sorozatvizsgálatokra alkalmas, azonban a fehérjeminőségét csak közelítő módon jelzi. A *pepszin* in vitro emészthetőségi értéke az NPU-értékkel rendszerint nem mutat szoros korrelációt, ezért a fehérjék minőségének ellenőrzésére nem igazán alkalmas.

7.3.2. Az emészthetőségszám meghatározása in vitro *pepszin-tripszin*-hidrolízissel

A mintát *pepszinnel*, majd *tripszinnel* hidrolizáljuk, majd az emészthetetlen maradék nitrogéntartalmát *Kjeldahl* szerint meghatározzuk. A módszer alkalmas állati és növényi eredetű élelmiszerek fehérje-emészthetőségének meghatározására. Az eljárást elsősorban növényi eredetű fehérjék, levélfehérje-koncentrátumok in vitro emészthetőségének meghatározására használják.

A vizsgálati eljárás során 1 g vizsgálandó anyagot centrifugacsőben 20 cm^3 0,1 M sósavban szuszpendálunk, majd $0,1\text{ cm}^3$ 0,01 M sósavban oldott 50 mg *pepszinnel* összekeverjük. A keveréket 37 °C -on 48 órán át enyhén rázatjuk, majd centrifugáljuk. Az üledéket 10 cm^3 desztillált vízben szuszpendáljuk, és 8,0 pH-jú 0,1 M nátrium-foszfát puffert és 5 mg *tripszint* adunk hozzá. A keveréket 23 °C -on 16 órán át gyengén rázatjuk, majd centrifugáljuk. Az üledéket $5 \times 30\text{ cm}^3$ vízzel újra szuszpendáljuk, majd centrifugáljuk, és a felülúszót minden lépés után elöntjük. Az utolsó 20 000 g -on, 5 percig végzett centrifugálás után, a szilárd maradékot nitrogénmentes szűrőpapíron szűrjük, levegőn megszáradtjuk, majd *Kjeldahl* szerint meghatározzuk a nitrogéntartalmát.

A fehérje emészthetőségét %-ban az alábbi képlet alapján számoljuk:

$$\text{a fehérje emészthetősége (\%)} = \frac{(a - b) \cdot 100}{a},$$

ahol:

a = a minta nitrogéntartalma,

b = a minta emészthetetlen részének nitrogéntartalma.

Esetenként a *tripszin* helyett *pankreatint* használnak, és a fehérje *pepszin-pankreatin*-hidrolízist követő emészthetőségét határozzák meg.

A módszer elsősorban levélfehérje-koncentrátumok *in vitro* emészthetőségének meghatározására alkalmas. A módszerrel meghatározott *in vitro* emészthetőség szoros korrelációt mutat a patkánykísérletekben mért *in vivo* emészthetőséggel.

7.3.3. Multienzimés módszer a fehérje *in vitro* emészthetőségének megállapítására

Az előző két pontban ismertetett módszer szerint a fehérje *in vitro* emészthetőségét egy, illetve két enzimmel határozzák meg. Újabban három vagy több enzimet használnak a fehérje *in vitro* emészthetőségének meghatározására, amely eljárásokat *multienzimés módszereknek* nevezik. A multienzimés módszerekkel a fehérje emészthetősége pontosabban meghatározható, mint az egy vagy két enzim használatát előíró eljárások esetében.

A vizsgálati eljárás során 1 g légszáraz, megfelelő méretűre őrölt vizsgálati anyagot mérünk be egy 100 cm³-es centrifugacsőbe, és 25 cm³ sósavas *pepszinoldatot* adunk hozzá (3 g *pepszint* oldunk 500 cm³ 0,15 mol/dm³ sósavoldatban), majd 90 percig, 40 °C-on gyengén rázatjuk. Ezt követően 220 mg nátrium-hidrogén-karbonáttal a sósavat semlegesítjük, a centrifugacső tartalmához 25 cm³ *pankreatinoldatot* adunk (3 g *pankreatin*, 30 mg *lipáz*, 57 mg epesavas nátrium, 3 g *aminoglükózidáz* feloldva 750 cm³ 6,8 pH-jú foszfátpufferben), és 60 percig, 40 °C-on inkubáljuk. Az inkubálás után 5 cm³ 10%-os nátrium-karbonátot adunk hozzá, és 5000 g-on 15 percig centrifugáljuk. Az üledéket 25 cm³ desztillált vízzel átmosva szuszpendáljuk, majd a felülúszóval együtt molnár selyemszítán átszűrjük. Desztillált vízzel való többszöri átmosás után a szűrőn visszamaradt csapadék nitrogéntartalmát *Kjeldahl* szerint meghatározzuk. Az emésztési együtthatót az emészthetetlen fehérjetartalom alapján a következő képlettel számoljuk ki:

$$EmE_{nyfeh} = 100 - \left[\frac{A}{B} \right] \cdot 100,$$

ahol:

EmE_{nyfeh} = a vizsgált minta nyersfehérje-tartalmának emésztési együtthatója,

A = a csapadék nyersfehérje-tartalma (%),
 B = a vizsgált anyag nyersfehérje-tartalma (%).

7.3.4. A fehérje in vitro emészthetőségének meghatározása *pankreatinos* hidrolízissel és aminosav-analízissel

A módszer alkalmas állati és növényi eredetű élelmiszerek fehérjei in vitro emészthetőségének meghatározására. Az eljárás során *pankreatinnal* 37 °C-on, 15 órán át hidrolizáljuk a fehérjét, majd mérjük a lehasadó aminosavak mennyiségét ioncserés oszlopkromatográfiával.

A vizsgálati eljárás során a 10%-nál nagyobb zsírtartalmú mintát éterrel vagy petroléterrel extraháljuk, majd meghatározzuk a nitrogéntartalmát. A 200 mg fehérjének megfelelő mintát 15 órán át, 37 °C-on, 100 mg *pankreatin* és 10 cm³ 8,2 pH-jú foszfátpuffer elegyével inkubáljuk, amelynek során az elegyet 20 cm³-es *Erlenmeyer*-lombikban, mágneses keverőn állandóan keverjük. Ezt követően 10 cm³ hidrolizátumhoz 5 cm³ 20%-os cink-szulfát-oldatot és 5 cm³ 1%-os nátrium-hidroxid-oldatot adunk, amelynek következtében az oldott állapotú hidrolizálatlan fehérjék és peptidek a keletkező cink-hidroxiddal kicsapódnak. Az elegyet szűrjük, majd a szűrlethez 1 cm³ 1%-os kénsavat és 4 cm³ 2,2 pH-jú citrát-puffert adunk. Ebből az oldatból az aminosav-analizátor érzékenységtől függően 0,1–1,0 cm³-nyi mennyiséget használunk fel az aminosav-tartalom meghatározására.

A minta eredeti aminosav-összetételét alapul véve kiszámíthatjuk a *pankreatinos* hidrolízis során felszabaduló aminosavak százalékos mennyiségét. Az eredeti aminosav-tartalom százalékában kifejezett felszabaduló aminosav-mennyiséget biológiailag hasznosítható aminosav-tartalomnak tekintjük. A módszer alkalmas a fehérje károsodásának nyomon követésére, a hőkezelések és az egyéb technológiai paraméterek aminosavak hasznosíthatóságára gyakorolt hatásának mérésére.

A módszer elsősorban a hőkezelések és a technológiai beavatkozások hatását képes megmutatni az aminosavak hasznosíthatóságára. Mivel a *pankreatin* különböző hatású enzimeket tartalmaz, ezért in vitro kísérletekben rendkívül előnyösen használható.

7.3.5. A *pepszin*-emészthetőségi index meghatározása

Az eljárás során a fehérjét *pepszinnel* hidrolizáljuk, majd meghatározzuk a felszabadult és az emészthetetlen részben maradt esszenciális

aminosavak mennyiségét, amelyből a *pepszin-emészthetőségi* index (PDR) kiszámítható.

A kivitelezés során 1 g nyersfehérjét tartalmazó, finomra őrölt min-tát 30 cm^3 0,05 M kénsavban oldott 25 g *pepszinnel* 24 órán át, $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on termosztálunk. Az inkubációs idő végén a hidrolizátumot forrás-ban lévő vízfürdőn 10 percig melegítjük, majd lehűlés után pH-ját 2-re állítjuk be. 8 cm^3 hidrolizátumhoz 1 cm^3 10%-os Na-wolframátot és 1 cm^3 0,33 M-os kénsavat adunk, 10 percig állni hagyjuk, szűrjük, és a szűrlet pH-ját 6,8-re állítjuk be, majd $-25\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároljuk az aminosav-analízis kezdetéig. A vizsgált táplálék aminosav-összetételének meghatározásakor az előzőekben leírtak szerint járunk el, azaz a megfelelően végzett fehérjehidrolízist követően az aminosavakat ioncserés oszlop-kromatográfiával, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával, esetleg gázkromatográfiával is meghatározhatjuk. Enzimes vakoldatot tízszeres mennyiségű *pepszinnel* készítünk.

A PDR-index számításához *standardként vagy kazeint, vagy teljes, liofilezett és extrahált tojásport használunk*. A kazein PDR-indexének meghatározása során vizsgáljuk a teljes tojás és a kazein 11 esszenciális és félig esszenciális aminosavát (His, Lys, Met, Cys, Phe, Tyr, Leu, Ile, Val, Thr, Trp) az enzimes kezelés előtt, a hidrolizátumban és az emészthetetlen maradékban. Az egyes aminosavak mennyiségét az aminosavak összegének százalékában fejezzük ki. A tesztfehérje százalékában kifejezett aminosav mennyiségeit a teljes tojás megfelelő aminosavainak százalékában adjuk meg. A számításnál a metionint és a cisztint, valamint a fenil-alanint és a tirozint együtt értékeljük. Ha a tesztfehérje (kazein) valamelyik aminosava nagyobb mennyiségben fordul elő a tojásnál, akkor azt 100%-nak tekintjük. Ezt követően *Oser*-módszer szerint képezzük az egyes aminosavnak a teljes tojásfehérje megfelelő aminosavaihoz viszonyított arányainak geometriai középértékét, majd ezt a proteolízis fokával korrigáljuk. A tesztfehérjéből felszabadult aminosav mennyiségét a standard fehérjéből felszabadult aminosav mennyiségére vonatkoztatjuk, majd ezzel a faktorral szorozzuk a *pepszines* hidrolizátum esetében a kapott relatív aminosav-mennyiségek geometriai átlagát. Hasonló módon járunk el az emészthetetlen maradékban lévő aminosav-mennyiségek geometriai átlagának korrigálásakor is. A szorzófaktort ekkor úgy kapjuk meg, hogy a tesztfehérje emészthetetlen részében lévő aminosavak mennyiségét a standard fehérje emészthetetlen részében lévő aminosavak mennyiségére vonatkoztatjuk. További korrekciókat kell

még végezni annak alapján, hogy a tojásfehérje aminosavai hogyan oszlanak meg a hidrolizátumban és az emészthetetlen maradékban az eredeti összes aminosav mennyiségéhez képest.

A PDR-index az NPU-értékkel szignifikáns összefüggést mutat, ezért a PDR számértéke a fehérje nettó hasznosíthatóságát jelzi. Mivel az aminosav-analízist megelőzi az enzimes hidrolízis, az ebből származó *PDR-index* valójában a hasznosítható aminosav-tartalmat méri, és jól jelzi a fehérje hőkárosodása következtében fellépő minőségromlást. A gyakorlatban való alkalmazását nehézkessé teszi az előkészítés bonyolultsága, a sok aminosav-analízis és a körülményes számítás, melynek kiküszöbölésére kidolgozták a *rövidített PDR-index* meghatározásának módszerét. Ennek során csak a lizin-, a metionin- és a triptofántartalmat vesszük figyelembe, melynek következtében az egyszerűsített módszer sorozatvizsgálatokra inkább alkalmas. A PDR-index és a rövidített PDR-index egymáshoz igen közelálló eredményt ad. Ha a mintát a *pepszin* után *pankreatinnal* is hidrolizálják, és meghatározzák a felszabaduló, valamint az emészthetetlen részben maradó esszenciális aminosav-tartalmat, akkor a *pepszin-pankreatin-emészthetőségi indexet* (PPDI) kapják.

7.3.6. A *pepszin-pankreatin-emészthetőségi index* meghatározása

Az eljárás során a mintát *pepszinnel*, majd *pankreatinnal* hidrolizáljuk, a felszabaduló aminosavak mennyiségét aminosav-analizátorral mérjük, majd a PDR-indexhez hasonlóan számítjuk a *pepszin-pankreatin-emészthetőségi* (PPDI) indexet.

A lisztfinomságúra őrölt mintából a *pepszin-pankreatinos* hidrolízishez annyit mérünk be, hogy a minta 100 mg fehérjét tartalmazzon. Ehhez hozzáteszünk 15 cm³ 0,1 M sósavban oldott 1,5 mg *pepszint*, majd 3 órán át 37 °C-os termosztátban tartjuk. Ezt követően 7,5 cm³ 0,2 M-os NaOH-oldattal semlegesítjük, majd nyolcas pH-jú foszfátpufferben oldott 4 mg *pankreatint* adunk hozzá, és az elegyet 24 órán át 37 °C-os termosztátban tartjuk. A vakpróbát ugyanígy készítjük, minta hozzáadása nélkül. Az inkubálást követően 10 cm³ oldathoz 50 cm³ 1%-os pikrinsavat adunk, majd a kicsapódott fehérjét 30 percig 1000 g-on centrifugáljuk. A felülúszóból 50 cm³-t kloridfázisú anioncserélő gyantával töltött oszlopon engedünk át, az oszlopot háromszor 5–5 cm³ 0,02 M sósavval mossuk, majd az eluátumot liofilezzük. A száraz mintát 10 cm³

2,2 pH-jú citrátpufferben feloldjuk, majd az aminosavak mennyiségét aminosav-analizátorral meghatározzuk. A minta teljes aminosav-tartalmát a vonatkozó fejezetben leírtak szerint ugyancsak meghatározzuk.

A PPDI-indexet a PDR-index meghatározásánál ismertetett módon számoljuk ki, azzal a különbséggel, hogy az aminosavakat g/100 g fehérjeértékben adjuk meg. A számításhoz a lizint, a fenil-alanin+tirozint, a metionint, a treonint, a valint, az izoleucint és a hisztidint vesszük figyelembe. A triptofán a pikrinsavas fehérjekicsapás során elbomlik, így mennyiségét a PPDI-index számolásakor nem tudjuk figyelembe venni.

A PPDI-index *a fehérjék esszenciális aminosav-tartalma alapján úgy jelzi a fehérje minőségét, hogy figyelembe veszi az egyes aminosavak hasznosíthatóságát is*. Ennek következtében szorosabb összefüggést mutat a biológiai értékkel, akár a kémiai indexnél (CS), akár az EAA-indexnél. A PPDI-módszer nemcsak a fehérjék minőség szerinti rangsorolására alkalmas, de megmutatja a technológiai hatások következményeit is, és jelzi a fehérje limitáló aminosavát. A módszer hátránya bonyolultsága, előnye viszont az, hogy kis mennyiségű mintából is képes információt adni.

A módszer minőségét javítani lehet, ha a fehérjék kicsapására szulfoszalicilsavat használunk, mert ekkor a szabad triptofán nem bomlik el, mennyisége az indexbe bevonható. A szulfoszalicilsavas fehérjekicsapás során 50 cm³ hidrolíziselegyhez 15 cm³ 14%-os szulfoszalicilsavas oldatot adunk, mely a végső térfogatban 3,0–3,5%-os szulfoszalicilsavkoncentrációt jelent.

7.4. Mikrobiológiai módszerek

7.4.1. A relatív táplálkozási érték meghatározása *Tetrahymena pyriformis* W tesztorganizmussal

A *Tetrahymena pyriformis* W rendszertanilag a holotrich ciliátákhoz tartozik, mely növekedéséhez *ugyanazokat az esszenciális aminosavakat igényli, mint a patkány*. Megfelelő összetételű, és fehérjeforrásként kizárólag a referencia- és a tesztfehérjét tartalmazó tápközegben, megegyező fehérjekoncentrációk esetén, a fehérjék minőségével arányosan szaporodik. A vizsgálandó fehérje esetében kapott sejtszámot a tojásfehérjével nyert érték százalékában kifejezve a *relatív táplálkozási érték*- (RNV-) indexet kapjuk.

A *Tetrahymena pyriformis* W törzset pepton alapú folyékony táptalajon, kémcsőben, steril körülmények között, 25 °C-on inkubálva tenyésztjük sötét körülmények között, mivel a protozoon megvilágítást nem igényel. A törzsfenntartó táptalaj 1 dm³-re 20 g peptont, 5 g glükózt, 1 g élesztőkivonatot és 1 g NaCl-ot tartalmaz, pH-ja pedig 7,1. A tápközeget az egysejtű igényeinek megfelelően összeállított tápoldat és a vizsgálandó fehérje alkotja. A tápközeget nukleotidokat, ásványi anyagokat, fehérjeszuspenziót, vitamint, illetve glükózt tartalmazó olyan oldatokból állítjuk össze, melyet külön-külön 121 °C-on 10 percig hőkezelünk, majd steril körülmények között összemérünk.

A nukleotidoldat 100 cm³-re 75,0 mg guanilsavat, 62,5 mg citidilsavat, 50 mg adenilsavat és 25 mg uracilt tartalmaz. Az ásványianyag-oldat MgSO₄ · 7 H₂O-t, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ · 6 H₂O-t, MnCl₂ · 4 H₂O-t, ZnCl₂-t, CaCl₂ · 2 H₂O-t, CuCl₂ · 2 H₂O-t, FeCl₃ · 6 H₂O-t, KH₂PO₄-t és K₂HPO₄-t tartalmaz. A vitaminoldat készítéséhez 25 mg Ca-pantotenátot, 25 mg nikotinsavamidot, 250 mg piridoxin-HCl-t, 25 mg piridoxál-HCl-t, 25 mg piridoxamin-HCl-t, 25 mg riboflavin-HCl-t, 250 mg tiamin-HCl-t, 25 mg mezo-inozidot és 25 mg p-amino-benzoetsavat mérünk össze. Ebből a száraz vitaminkeverékből 33,8 mg-ot mérünk be egy 200 cm³-es mérőlombikba, hozzáadunk 50 cm³ desztillált vizet, forró vízfürdőn feloldjuk, majd lehűlés után hozzáadunk 2 cm³ kolin-klorid-oldatot (625 mg kolin-kloridot 100 cm³ desztillált vízben oldunk fel), 2 cm³ folsavoldatot (31,3 mg folsavat 10 cm³ 0,1 M NaOH-ban oldunk, 50 cm³-re feltöltjük, majd az így kapott oldatot felhasználás előtt tízszeresére hígítjuk), 2 cm³ biotinoldatot (31,3 mg biotint 500 cm³ desztillált vízben oldunk) és 2 cm³ DL- α -liponsav-oldatot (10 mg DL- α -liponsavat 50 cm³-es mérőlombikban néhány csepp 96%-os etil-alkoholban feloldunk, desztillált vízzel jelre töltjük, a felhasználás előtt pedig tízszeresére hígítjuk). Ezt követően desztillált vízzel 200 cm³-re feltöltjük, *Erlenmeyer*-lombikban 121 °C-on sterilizáljuk, majd hűtőszekrényben tároljuk. A glükózoldat készítése során 15 g D-glükózt desztillált vízben feloldunk, majd a 100 cm³-re történő kiegészítés után 121 °C-on 10 percig sterilizáljuk, ezt követően hűtőszekrényben tároljuk.

A vizsgálat kivitelezésekor a légszáraz mintát előaprítjuk, zsírtartalmát Soxhlet-készülékben 8 órán keresztül éterrel extraháljuk, az étergőzök eltávolítása után ismételten aprítjuk, majd 0,2 mm lyukbőségű szitán átszitáljuk, és nitrogéntartalmát *Kjeldahl*-módszerrel meghatározzuk. A vizsgálatokat 10 cm³-es végtérfogatban 100 cm³-es *Erlenmeyer*-lombikban végezzük. A minta és a tápoldat steril elegyét háromnapos

Tetrahymena tenyészet 0,2 cm³-ével beoltjuk, mely átlagosan 1000 sejtet tartalmaz a kiindulási anyagban. Beoltás után a mintákat négy napon keresztül 25 °C-on tarjuk, néha összerázzuk, majd a három párhuzamos bemérést összeöntjük. A sejtszámok meghatározása előtt a törzsoldatokból megfelelő hígítási sorozatot készítünk. A sejtszámokat vagy azonnal megszámláljuk, vagy számlálókamrában mikroszkópon keresztül lefényképezzük, melyet követően az eredményeket bármikor értékelhetjük. A sejtszám-értékeket a hígítások függvényében ábrázoljuk, és grafikusan nulla hígításra extrapolálunk. *A tesztfehérje vizsgálatokon kapott sejtszámot a tojás esetében kapott sejtszám százalékában kifejezve a relatív táplálkozási értékindexet kapjuk.*

Mivel a *Tetrahymena pyriformis* W ugyanazokat az esszenciális aminosavakat igényli, mint a növekedésben lévő patkány, ezért az RNV- és a PER-módszer szoros kapcsolatban van egymással. A protozoon szaporodását a tápközeg magas szénhidrátartalma gátolja, ezért a módszer a keményítőben dús gabonafélék minőségét általában alulértékeli. Ugyancsak alulértékeli a húsfehérjéket is, mert *extra- és intracelluláris proteázai* a húsfehérjét nehezen tudják bontani, azonban a minta enzimes előkezelésével e nehézség kiküszöbölhető. A módszer érzékeny és nagy teljesítőképességű eljárás a fehérje minőségváltozásainak kimutatására. A meghatározás során lényeges a minta finom őrlése és egyenletes szemcsemérete; oldható fehérjék vizsgálatakor a reprodukálhatóság lényegesen jobb. A módszer rendkívüli előnye, hogy biológiailag specifikus, hátránya viszont, hogy elsősorban a fehérjeminőség relatív változásainak követésére használható, ezért *az RNV-indexet magasabb rendű állatokra csak fenntartással lehet alkalmazni.*

7.4.2. A fehérje hasznosíthatólizin- és hasznosíthatómetionin-tartalmának meghatározása *Tetrahymena pyriformis* W tesztorganizmussal

A Tetrahymena pyriformis W protozoon szaporodása megfelelő tápközegben a vizsgált fehérje hasznosíthatóaminosav-tartalmával arányos. A hasznosíthatóaminosav-tartalom mérése során a tápközeg hasonló koncentrációban ugyanazokat az alapanyagokat tartalmazza, amelyeket az előző fejezetben a relatív táplálkozási érték meghatározásakor ismerttünk. A tápoldatokon kívül ebben az esetben még aminosav-oldatot is adunk a táptalajhoz, amelyik csak azt az aminosavat nem tartalmazza, aminek a hasznosíthatóságáról szeretnénk információt kapni.

Az aminosavoldat 1 dm³-re az alábbi aminosavakat tartalmazza: DL-alanin: 3,912 g; L-arginin-HCl: 3,720 g; L-aszparaginsav: 4,348 g; glicin: 0,356 g; L-glutaminsav: 8,288 g; L-hisztidin-HCl: 1,848 g; L-izoleucin: 2,240 g; L-fenil-alanin: 3,560 g; L-metionin: 1,212 g; L-prolin: 6,256 g; L-leucin: 6,920 g; L-cisztin: 0,800 g; DL-szerin: 5,496 g; L-treonin: 3,136 g; L-triptofán: 0,852 g; DL-valin: 4,704 g; L-lizin-HCl: 6,668 g. Az oldat pH-ja 7,1.

A hasznosíthatólizin-, illetve -metionin-tartalom meghatározásához lizin-, illetve metionin standardoldatot kell készíteni. A lizin standardoldat 180 µg L-lizint, a metionin standardoldat pedig 80 µg L-metionint tartalmaz köbcentiméterenként. A mintaoldat előkészítése során 100 mg nitrogénnek megfelelő mennyiségű mintához 80 mg *papain* adunk 2 cm³ szuszpenzióban, majd hozzáteszünk még 20 cm³ 7,2-es pH-jú nátrium-citrát puffert, mely literenként 5 g trinátrium-citrátot és 30 mg nátrium-cianidot tartalmaz, és a pH-ját foszforsavval állítjuk be. A *papainos* hidrolízist 3 órán át, 56 °C-os inkubálás mellett végezzük az edények rázogatóásával, majd a kapott oldatot úgy hígítjuk meg, hogy az 300 µg nitrogént tartalmazzon köbcentiméterenként. Az így előkészített standard- és mintaoldatból az alábbi sorozatot állítjuk össze: alaptáplóoldat és aminosavoldat 1–1 cm³, standardoldat 0, 0,5, 1, 2, 4 és 8 cm³, majd mindegyik standardsorozatot desztillált vízzel 10 cm³-re egészítünk ki. A mintaoldatot tartalmazó tesztorozat ugyancsak 1–1 cm³ alaptáplóoldatot és aminosavoldatot tartalmaz, a mintaoldatból pedig 0,5, 1, 2, 4 és 8 cm³-t adunk hozzá. Desztillált vízzel itt is mindegyik sorozatot 10 cm³-re egészítünk ki. A 25 cm³-es *Erlenmeyer*-lombikban lévő standardsorozatot és tesztorozatot 10 percig 110 °C-on autoklávban sterilizálunk, majd steril körülmények között 0,5 cm³ háromnapos *Tetrahymena* tenyészzel oltjuk be. Az inkubálást 96 órán át 25 °C-on, állandó rázatás közben végezzük, melyet követően a kémcsöveket gőzáramban 10 percig melegítjük, majd hűtjük és a tesztorganizmus szaporodását jelző zavarosodást 580 nm hullámhosszon extinkcióméréssel határozzuk meg. Minden meghatározás során *papainos* vakoldatot futtatunk és mérünk. A standardoldatokkal kapott extinkcióértékeket az aminosavkoncentráció függvényében ábrázoljuk, és az így nyert kalibrációs görbén a mintaoldat esetében mért extinkcióértékből a hasznosítható aminosav-tartalmat leolvassuk. A turbidimetriás kiértékelést elsősorban a jól oldódó, és a viszonylag tiszta oldatot adó fehérjeminták esetében lehet használni. Ha a fehérjeoldat nem elég tiszta, a sejtszámot számlálással kell meghatározni. Az ismertetett módszerrel kapott eredmények jól

egyeznek a patkánytesztek adataival, ugyanis mind a hasznosítható lizin-tartalom meghatározásakor, mind a hasznosítható metionin-tartalom meghatározásakor a korrelációs együttható 0,94–0,96 között alakul.

A mintaoldat enzimes előemésztésekor a *papain* helyett *pronáz* is eredményesen alkalmazható. A *pronázos* eljárás során a finomra őrölt minta 100 mg nitrogénnek megfelelő mennyiségéhez 25 cm³ 7,4 pH-jú, 0,2 mólos nátrium-foszfát puffert és 5 mg *pronázt* adunk, majd az így kapott szuszpenziót 40 °C-on, 24 órán át, rázatás közben inkubáljuk. Az inkubáció után az elegyet desztillált vízzel 50 cm³-re töltjük fel, majd a tesztorganizmussal végzett inkubációt és az értékelést a *papainhoz* hasonlóan végezzük.

7.4.3. A hasznosítható metionin-tartalom meghatározása *Streptococcus zymogenes* tesztorganizmussal

A *Streptococcus zymogenes* baktérium szaporodása megfelelő tápközegben arányos a fehérje hasznosítható metionin-tartalmával. A *Streptococcus zymogenes* egy olyan erős, proteolitikus aktivitású törzs, mely számára a lizin, a treonin és a fenil-alanin nem esszenciális, viszont *esszenciális neki a metionin*, a triptofán, az arginin, a hisztidin, a leucin, az izoleucin, a valin és a glutaminsav is. A vizsgálat során a tápközeg a tesztápolddatból és a vizsgált fehérje *papainos* hidrolizátumából áll. A tesztápolddatot alapoldatból és aminosav-oldatból a következők szerint állítjuk össze. Az alapoldat 200 cm³-re az alábbi anyagokat tartalmazza: glükóz 12 g, K₂HPO₄ 18 g, citromsav 0,5 g, nátrium-acetát · 3 H₂O 2,5 g, polioxietilén-szorbitán-monooleát 1 cm³, ásványianyag-oldat 10 cm³, adenin, guanin, uracil, xantin 5–5 mg, tiamin, piridoxál-etilacetát · HCl, riboflavin, nikotinsav, kalcium-pantotenát, p-amino-benzoésav 2–2 mg, folsav 0,2 mg, biotin 10 µg, aszkorbinsav 0,5 g, B₁₂-vitamin 2 µg, az oldat pH-ja pedig 7,2. Az ásványianyag-oldat 1000 cm³-e 20 g MgCO₃ · 6 H₂O-t, 5 g CaCl₂-ot, 0,5 g FeCl₃ · 6 H₂O-t, 0,5 g ZnSO₄ · 7 H₂O-t, 0,25 g MnSO₄ · 4 H₂O-t, 0,25 CoCl₂ · 6 H₂O-t, 0,25 g CuSO₄ · 5 H₂O-t, 0,25 g VSO₄-ot és 0,25 g Na₂MoO₄-ot tartalmaz.

Az aminosavoldat 250 cm³-e 1 g glutaminsavat, 0,5–0,5 g L-leucint, L-izoleucint, L-valint, L-lizint, L-arginint és L-aszparaginsavat, valamint 0,2–0,2 g L-alanint, L-metionint, glicint, L-cisztint, L-szerint, L-tirozint,

L-prolint, L-hisztidint, L-fenil-alanint, L-treonint és L-triptofánt tartalmaz. A hasznosítható metionin-tartalom meghatározásakor az aminosavoldatból a metionint elhagyjuk. *A módszer a hasznosítható metionin-tartalom mellett alkalmazható a leucin, az izoleucin, az arginin, a hisztidin, a triptofán és a valin hasznosítható mennyiségének meghatározására is,* ilyenkor azonban a mérni kívánt aminosavat az aminosavoldatból el kell hagyni. A tesztoldat előállításakor egy térfogatnyi aminosavoldatot 2 térfogatnyi alapoldathoz keverünk. Az alapoldatot és az aminosavoldatot mélyhűtőpultban $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároljuk.

A *Streptococcus zymogenes* folyékony és agaros tápközegben is fenntartható. A folyékony tápközeg készítése során 100 cm^3 alapoldathoz 200 mg triptont adunk, az agaros táptalaj készítésekor pedig a 100 cm^3 alapoldatot 150 mg kazeinnel, 15 mg nátrium-glutamáttal és $1,5\text{ g}$ agarral egészítjük ki. Az átoltást havonta egyszer szükséges elvégezni, melynek során az inkubáció $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 24 órán át tart. Az átoltások közötti időben a törzset hűtőszekrényben kell tartani.

A méréskor a megfelelően összeállított tápközeget tartalmazó kémcsöveket $1-1$ csepp oltóoldattal oltjuk be. Az oltóoldatot úgy állítjuk elő, hogy 100 cm^3 alapoldatot 150 mg kazeinnel és 15 mg nátrium-glutamáttal egészítünk ki, melyet törzstenyészettel beoltunk, majd 24 órán át $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubálunk. Az aktív oltószuszpenzió nyerésekor a törzset naponta átoltjuk a folyékony tápoldatba.

A *Streptococcus zymogenes* mind a növényi, mind az állati eredetű fehérjék hasznosítható metionin-tartalmának vizsgálatára alkalmas. A minta előkészítése során a vizsgálandó anyagot lisztfinomságúra kell őrölni, $0,1\text{ mm}$ átmérőjű szitán kell átszitálni, a nitrogéntartalmat Kjeldahl-módszer szerint meg kell határozni, majd az összes- és a hasznosítható metionin-tartalom méréséhez minden mintából párhuzamosan annyit mérünk be, hogy abban $100-100\text{ mg}$ nitrogén legyen. Az összes metionin-tartalom meghatározásakor a 25 mm átmérőjű és 200 mm hosszúságú kémcsövekbe bemért mintához 40 cm^3 2 M sósavat adunk, leforrasztjuk, majd vízszintes helyzetben 5 órán át $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os autoklávban hőkezeljük. Hűtés után a kémcsöveket kinyitjuk, az oldat pH-ját 10 M NaOH -dal $7,00$ -ra állítjuk be, majd desztillált vízzel 100 cm^3 -re hígítjuk. Az így kapott oldat 10 cm^3 -ét desztillált vízzel ismételtelen 100 cm^3 -re hígítjuk, melynek következtében a hidrolizátum sötétedése minimális, és a hallisztekben lévő NaCl is oly mértékben felhígul, hogy a tesztorganizmust nem zavarja.

A hasznosíthatómetionin-tartalom meghatározásakor a 100 mg nitrogénnek megfelelő mintához 50 cm³-es térfogatú, üvegdugós kémcsövekbe 20 cm³ puffert adunk, amely literenként 5 g nátrium-citrátot, 30 mg nátrium-cianidot és annyi 0,33 M foszforsavat tartalmaz, hogy pH-ja 7,00 legyen. A hetes pH-jú szuszpenziókat 56 °C-os vízfürdőbe helyezzük, majd mindegyikbe 1 cm³ 1%-os *papain*oldatot adunk. Rázatás közben 2 órán át inkubáljuk, desztillált vízzel 100 cm³-re feltöltjük, majd 10 cm³-ét újra 100 cm³-re hígítjuk. A felhasznált *papain* mennyisége 1 mg nitrogénnek felel meg, ami a 100 mg nitrogént tartalmazó minta mellett elhanyagolható.

A kalibrációs görbéhez 2 mg/cm³ koncentrációjú L-metionin-oldatot készítünk 10 térfogat%-os etanolos vízzel, mely törzsoldatból desztillált vízzel 20 µg/cm³ koncentrációjú L-metionin-oldatot hígítunk. A mérés kivitelezése során a standardsorozatot úgy állítjuk össze, hogy a standardoldatból 3–3 cm³ teszt-tápdathoz 1, 2, 4 és 8 cm³-t mérünk, majd a térfogatokat desztillált vízzel 10 cm³-re egészítjük ki. A kémcsöveket kémcsőtartóba helyezzük, alumíniumkupakkal lefedjük, majd 20 percen keresztül 100 °C-os autoklávban sterilizzuk, ezt követően 37 °C-os vízfürdőben lehűtjük, beoltjuk, majd 37 °C-on 48 órán át inkubáljuk. Az inkubáció után a kémcsöveket 10 percig 100 °C-os autoklávban hőkezeljük, majd szobahőmérsékletűre hűtjük. A szaporodás mértékét turbidimetrián 580 nm hullámhosszon fotométerrel mérjük. A standard metioninoldattal kapott extinkcióértékeket a metionintartalom függvényében ábrázoljuk, majd a tesztoldattal kapott extinkcióból leolvashatjuk a hasznosíthatómetionin-tartalom értékét, melyet a hígítások figyelembevételével a minta, a nyersfehérje-, valamint az összesmetionin-tartalom százalékában fejezünk ki.

A *Streptococcus zymogenes* tesztel a hasznosíthatómetionin-tartalom 7–10%-os pontossággal meghatározható. A százalékos hasznosíthatóság megállapításához a minta összesmetionin-tartalmát ugyancsak mikrobiológiai tesztel célszerű meghatározni. A mikrobiológiai aminosav-meghatározások előnye, hogy egy időben párhuzamosan viszonylag nagy létszámú minta vizsgálata végezhető el.

7.5. Biológiai módszerek

7.5.1. A fehérjehatékonysági arány meghatározása

A testtömeg és a nitrogénbeépülés mérésével azt vizsgáljuk, hogy a fehérjék mennyire képesek az állatok növekedésének fehérjeszükségletét fedezni. E vizsgálat folyamán csak a fehérje beépülését nézzük a fehérje-anyagcseréből, és nem foglalkozunk a nitrogénfelszívódás és a nitrogénürítés részleteivel. A szervezet nitrogénbeépítésének mértékét indirekt mérésrel is meghatározhatjuk úgy, hogy mérjük a kísérleti szakaszban felvett táplálékfehérje nitrogéntartalmát, valamint a bélsárban és a vizeletben mért nitrogénvesztésüket. *A felvett és az ürített nitrogén különbözete a visszatartott, beépített nitrogén mennyiségét jelzi*, mert az anyagcsere-folyamatok során elemi nitrogén nem keletkezik. *A növekedést és gyarapodást a felvett nitrogénmennyiséghez képest kisebb nitrogénvesztés, azaz a nitrogénretenció jelzi.* A vizelettel ürülő nitrogén a létfenntartás során az élettani állapot által meghatározott fehérje-leépítésből, az aminosav-beépítés során feleslegben maradt és lebontott aminosavakból, valamint energiahiány esetén az energiatermelésre elhasznált fehérjéből ered. A bélsárral ürülő nitrogén mennyisége a fehérje az emésztőnedvekkel fel nem szívódott maradékból, valamint a bél kopása során elveszített nitrogéntartalmú vegyületekből, az endogennitrogén-vesztéséből tevődik össze.

A nitrogénbevitel és a nitrogénvesztés mérésén alapuló biológiai fehérjeértékelési módszerekre a nitrogén-anyagcsere- vagy nitrogénmérleg-meghatározás kifejezéseket használjuk. Az elfogyasztott és a bélsárral ürített nitrogénmennyiségek különbözeteként az emésztőrendszerben megemésztett és felszívódott fehérje mennyisége is kiszámítható, ami lehetővé teszi *a tesztfehérje biológiai értékének meghatározását.* Ez azt fejezi ki, hogy *a megemésztett és felszívódott fehérje hány százaléka képes a testbe beépülni.* A fehérje biológiai értékére nulla nitrogénmérleg esetén is kedvező eredmény jöhet ki akkor, ha a szervezet fehérjéinek kopását a tesztfehérjék kis mennyiségei is jó hatásfokkal képesek pótolni. A nitrogénmérleg mérésén alapuló módszerek előnye, hogy sok adatot szolgáltat a fehérje minőségéről. A nitrogénürítés arányaiból következtetni lehet arra, hogy a tesztfehérje minőségét mennyiben határozza meg annak emészthetősége, aminosav-összetétele, esetleg antinutritív tulajdonságai. Lehetőség van a komplettálás mérésére, és az aminosav-

analízisekkel kombinálva a látszólagos aminosav-emészthetőség vizsgálatára is. Az *anyagcsere-kísérletek* ezzel szemben *hosszadalmasak, drágák és munkaerőigényesek*, jelentős technikai és laboratóriumi felkészültséget igényelnek. Az állatokat egyedileg kell elhelyezni olyan ketrecekben, amelyekben a vizelet és a bélsár külön gyűjthető anélkül, hogy azok a táplálékkal szennyeződnenek, a kimért takarmányt az állat szóródásmentesen fogyasztja, annak maradéka pontosan visszamérhető, és nem utolsósorban követelmény az is, hogy az állat elfogadhatóan érezze magát a kísérlet során. A nitrogénmérleg meghatározása laboratóriumi albínó patkányokon széles körben elterjedt, de jelentős mértékben végeznek anyagcsere-kísérleteket növekvő sertésekkel is.

7.5.1.1. A fehérjehatékonysági arány meghatározása növendék patkányokon

A vizsgálat során a növendék patkányok egyedi fehérjefogyasztását és testtömeg-gyarapodását mérjük. A *testtömeg-gyarapodás és fehérjefogyasztás hányadosa a fehérjehatékonysági arány* (PER). A növekvő állat tömegének gyarapodása a fehérjebeépüléssel arányos, így az egységnyi fehérje felvételére eső tömeggyarapodás jellemzi a fehérje minőségét. A vizsgálandó fehérje PER-értékét a kazeinnel, valamint a referenciafehérjével kapott PER-értékhez viszonyítjuk. A PER a fehérje minőségén kívül a fehérjehordozó antinutritív, toxikus vagy növekedést serkentő hatásait is méri. A *módszer alkalmas állati és növényi eredetű száraz fehérjetakarmányok biológiai tesztelésére*.

Az eljáráshoz szükséges kb. 800 g fehérjét tartalmazó légszáraz minta, melynek mikrobiológiai állapota laboratóriumi méréssel megfelelőnek mondható. A vizsgálatához szükség van kazeinstandardra, ásványianyag- és vitaminkeverékekre, növényi olajra, cellulózra, kukoricakeményítőre és szacharózra. Az ásványianyag-keverék az alábbi komponenseket tartalmazza: 100 g NaCl, 389 g KH_2PO_4 , 57,3 g vízmentes MgSO_4 , 381,4 g CaCO_3 , 27 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 4,01 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,548 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,477 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ és 0,023 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$. A komponenseket nagyméretű dörzsmozsárban homogénre keverjük, majd összemérünk még 39,3 g NaCl-ot 0,79 g KI-dal, és a két keveréket finom porrá homogénezzük. A vitaminkeverék az alábbi komponenseket tartalmazza: A-vitamin 0,6 mg, D-vitamin 5,0 μg , E-vitamin 10 mg, kolin 200 mg, p-amino-benzoésav 10 mg, inozitol 10 mg, niacin 4 mg, kalciumpatoténát 4 mg, riboflavin 0,8 mg, tiamin·HCl 0,5 mg, piridoxin·HCl 0,5

mg, folsav 0,2 mg, biotin 0,04 mg, B₁₂-vitamin 0,003 mg, az egész 1 kg-ra kiegészítve glükózzal.

Növényi olajként gyapotmagolaj vagy hozzá hasonló zsírsavösszetelű egyéb növényi olajok, esetleg sertészsír is használható. A cellulóz lehet fehéritett papíripari színcellulóz vagy cellulózpor.

A takarmány összetételének vizsgálatánál meghatározzuk a vizsgálandó és a standard fehérjehordozó nitrogén-, zsír-, hamu-, szárazanyag- és nyersrosttartalmát. A kísérleti és a standard takarmánykeveréket lehetőleg úgy kell összeállítani, hogy azok nitrogén-, zsír-, hamu-, nyersrost- és szárazanyag-tartalma azonos legyen, és a különbség lehetőség szerint csak a fehérje minőségében mutakozzon. A beltartalmi előírások: 95% szárazanyag, 1% nyersrost, 10% nyersfehérje, a maradék pedig nitrogénmentes kivonható anyag, valamint ez tartalmazza az ásványianyag- és a vitaminkeveréket is. Ha a vizsgálandó fehérjehordozó összetételéből adódóan az ajánlott táplálóanyagszinttől el kell térni, akkor a kontrolltakarmány összetételét is úgy kell megállapítani, hogy a táplálóanyag-szintek a kísérleti csoportok szintjeivel megegyezzenek.

A kísérleteket 21–28 napos, 44–55 g tömegű, azonos genetikai hátterű, hím albínó patkányokkal kell végezni. A kísérletekhez a jó körülmények közt tartott tenyészetből származó, elválasztott és a száraztakarmány fogyasztásához hozzászoktatott állatok alkalmasak. Az egyedek közötti tömegeltérés 10 g-nál ne legyen nagyobb. A kísérletek végzéséhez 10 egyedből álló vagy annál nagyobb csoportokat kell kialakítani. *A kontrollcsoport a standard összetételű, kazeinnel készült takarmányt kapja, míg a többi csoport a vizsgálati fehérjével készült kísérleti takarmányt fogyasztja.* Több vizsgálandó fehérjehordozó teszteléséhez egyetlen referenciacsoport beállítása elegendő. A csoportokat az állatok véletlenszerű kiválogatásával úgy kell összeállítani, hogy a kísérlet indítása napján a csoportok átlagtömege közötti különbség az 5 g-ot ne haladja meg.

A kísérleti etetés tartama 28 nap, melynek során gondoskodni kell arról, hogy minden patkány egyedi ketrecben, a csoportjának megfelelő takarmányt és vizet ad libitum fogyaszthassa. A kísérleti csoportok tartási és környezeti körülményeinek teljes mértékben azonosnak kell lennie. Egyedi tömegmérést az indulás napján, majd a kísérleti periódus alatt 4–6 naponként, végül a kísérlet végén a 28. napon kell végezni. A maradék takarmány visszamérését és az új adag kimérését 4 naponként kell elvégezni. Ha a kísérleti körülmények megfelelőek voltak, 28 nap alatt a 10% kazeint fogyasztó referenciacsoportban 90–130 g tömeggyarapodás várható.

A kísérlet értékelése során csoportonként kiszámítjuk a 28 nap alatti tömeggyarapodás és a kísérleti periódus alatt elfogyasztott fehérje mennyiségének átlagát, majd ezekből kiszámítjuk a PER-t. Ezt követően megállapítjuk, hogy a kísérleti csoportokban megállapított PER-érték hány százaléka a standard fehérjét fogyasztó csoport PER-értékének. Ezután kiszámítjuk a korrigált PER-értéket úgy, hogy a vizsgálandó fehérjére kapott PER-értéket megszorozzuk 2,5-del, és a vizsgálatban a kazeinre kapott PER-érték hányadosával. A vizsgálandó minta fehérjeminőségét a referenciafehérjéhez viszonyított százalékos értékkel és a korrigált PER-rel számolva adjuk meg. A csoportonként kapott PER-értékek közötti különbségeket statisztikai analízisekkel is igazolhatjuk, hisz méréseinket az egyedi tömegmérésre és az egyedi takarmányfelvételi adatokra alapoztuk.

A módszer fejlesztése során rájöttek arra, hogy *fiatalabb állatokkal nagyobb PER-értékekhez juthatnak*, a növényi fehérjék kisebb biológiai értékét pedig a korrigált PER jelzi érzékenyebben. Megállapították, hogy 7 és 28 nap között a tényleges vizsgálati szakasz időtartama nem befolyásolja sem a takarmányfelvételt, sem a PER-, valamint a korrigált PER-értéket. A vizsgálati időtartam meghosszabbításával azonban a szórás lényegesen csökkenthető, így a csoportok közötti kisebb eltérések is statisztikailag bizonyíthatók. 32 napnál hosszabb etetési időtartam esetén a kumulatív adatokból számolt PER csökken, a korrigált PER viszont változatlan marad. 10%-nál nagyobb növényi fehérjetartalom a ténylegesnél nagyobb PER-értéket ad, a 10%-nál kisebb fehérjetartalom pedig az állati eredetű fehérjéket kisebb PER-értékűnek méri. A takarmány nedvességtartalmának növelése fokozza a takarmányfelvételt, és ugyanarra a fehérjére nagyobb PER-értéket állapít meg. Nagy zsírtartalmú fehérjehordozók tesztelésekor a standard takarmánykeverékben is hasonló összetételű zsiradékot kell használni, hogy a zsírsavösszetétel különbségéből adódó hatást elkerüljük. A zsiradékok peroxidszáma a PER-értékét csökkenti, mely hatást antioxidánsok adagolásával lehet kivédeni. A 8%-nál nagyobb zsírtartalom a tápokban a módszert nem befolyásolja, de a 16%-nál nagyobb zsírtartalomnál a fogyasztás és a tömeggyarapodás is csökkenni kezd. A rost 30%-ig történő növelése fokozza a takarmányfelvételt, javítja a tömeggyarapodást, növeli a PER-t, nem befolyásolja viszont a korrigált PER-értéket. Az ásványianyag-tartalom nincs befolyással a módszerre, az 5%-os szinttől kisebb mértékben el lehet térni. Ismeretlen minta esetén a szervesen toxikus komponensek előfordulása nem zárható ki.

7.5.1.2. A fehérjehatékonysági arány meghatározása malacokkal

A módszer a fehérje értékét azon az állatfajon méri, amellyel később a takarmányt fel akarja etetni, ezért a *sertéshizlalás céljaira szánt takarmány fehérjeértékét a leghitelesebben jelzi*. Előnye, hogy a kísérleti táp összetételének vizsgálatán kívül laboratóriumi vizsgálókapacitást nem igényel, a kísérleti állatok tovább hizlalhatók vagy tenyészthetők. A fogyasztott takarmány és a tömeggyarapodás alapján számított fehérjehatékonysági arány (PER-érték) a fehérje biológiai értékén kívül az antinutritív anyagok és egyéb fehérjeértékesülést akadályozó tényezők jelenlétét jelzi, de jelzi a fehérjeértékesítést segítő anyagok (vitaminok, ízletesség) hatását is.

Az eljárás során standard körülmények között tartott 9–11 kg-os malacok tömegének növekedését vizsgáljuk a 14–28 napos kísérleti periódus alatt, majd a felvett fehérje mennyiségéből és a tömegváltozából a PER-érték kiszámítható. A vizsgálandó takarmányból olyan egyöntetű, légszáraz mennyiség szükséges a vizsgálatokhoz, amely legalább 65 kg emészthető nyersfehérjét tartalmaz.

A kísérlet kezdetekor gondoskodni kell a megfelelő légcseréről, megvilágításról, illetve ketrecekről. Olyan helyiséget kell kialakítani, mely megfelelően szellőztethető, fűthető, fertőtleníthető, és amelyben legalább hat, 1,5–2 m² alapterületű battéria helyezhető el. Szükséges, hogy a helyiségben legyen folyóvíz, szennyvízelvezetés, elektromos hálózat és célszerű, ha az állatok mérésére szolgáló mérleg is a helyiségben található. Az állatok 10–15 kg testtömeg között 21 °C hőmérsékletet, 63% relatív páratartalmat, 15–30 kg testtömeg között 19 °C-ot és 75% relatív páratartalmat igényelnek. A légcserét úgy kell megoldani, hogy télen legalább 0,3–0,5 m³, nyáron 1,0–1,5 m³ legyen óránként 1 kg tömegré vonatkoztatva, miközben a légmozgás sebessége sehol se haladja meg az 0,1–0,3 m/s értéket. Az állatokat mind mesterséges, mind természetes világítás esetén 30–50 luxszal célszerű megvilágítani. A ketrecek kialakításakor ügyelni kell arra, hogy abban minden egyednek elegendő hely legyen, és mindegyiknek teljes etetőférőhely álljon rendelkezésére még ad libitum etetéskor is. A ketrecek vályúí legyenek alkalmasak a maradéktakarmány összegyűjtésére és visszamérésére, és legyen lehetőség a kiszórt takarmány felfogására és összegyűjtésére. Az ivóvíz hőmérséklete 10 °C-nál ne legyen alacsonyabb, melyet fémszelepes önitatókból fogyasztanak az állatok. Lehetőséget kell biztosítani, hogy az állatok

keményfa pihenőlapon pihenhessenek, és meg kell akadályozni, hogy egymás ketreceibe átugrálhassanak.

A kísérletekben ismert származású, azonos korú, 35–45 napos, 9–11 kg-os fajtatizta tenyészetből (fehér húsertés, lapály) származó olyan malacokat válasszunk, amelyek kocatejet, tejpótló tápszereket már nem igényelnek, és a szilárd takarmányt gond nélkül fogyasztják. Az állatokat fültetoválással egyedileg jelöljük, majd ezt követően egy battériába hat állatot telepítsünk. A kísérleti és a kontrollcsoportokban a battériákon belül az ivararány azonos legyen, és a fejlettségbeli eltérés az 5–10%-ot ne haladja meg. A kísérletekhez szükséges a malacok egyedi tömegmérésére alkalmas mérleg, a takarmányok tárolására szükséges edényzet, a takarmányadagok mérésére, illetve visszamérésére gyorsmérleg. A kísérlet kivitelezése során célszerű a vizsgálatokat 14–28 napig végezni, bár a hosszabb kísérlet és a több állat (több csoport) megbízhatóbb adatokat szolgáltat. Kontrolltakarmányként olyan összetételű tápot célszerű etetni, mely 88% szárazanyag-tartalomban legalább 12,66% emészthető nyersfehérjét tartalmaz. A tesztfehérjéből olyan tápot kell összeállítani, amelynek energiatartalma és emészthetőnyersfehérje-tartalma a kontrolltápéval megegyezik. Tanácsos a kísérleti periódus előtt 3–6 napos előtetetési szakaszt beiktatni, melynek során az állatok helyükhöz, a környezetükhöz, illetve az új takarmányhoz szoknak. A kísérlet az indulótömeg mérésével és az adatfelvétellel kezdődik, melyet követően az állatokat naponta hatszor, de minimálisan négyszer etetjük a pontosan kimért takarmánnyal. Az előző etetésből megmaradt takarmányt pontosan mérjük vissza, és mennyiségét jegyezzük fel. A kísérlet során arra kell törekedni, hogy a kísérleti és a kontrollcsoportok takarmányfelvétele azonos legyen. Hetenként, de legalább 10 naponként mérjük le az állatokat a reggeli etetés előtt. A kísérletek méréssel fejeződnek be, melyet követően a malacok tenyésztési, illetve hizlalási célra használhatók. A kísérleti eredményekből a fehérjehatékonysági arányt a következő képlettel számoljuk:

$$\text{PER} = \frac{\text{testtömeggyarapodás}}{\text{elfogyasztott fehérje}} = \frac{\text{átlagos végső testtömeg} - \text{kezdeti testtömeg}}{\text{elfogyasztott fehérje}}$$

Az elfogyasztott fehérje mennyisége a táp összetétele, a kiadagolt mennyiségek és a visszamért maradvány alapján határozható meg.

A PER-értéken kívül a kísérleti adatokból kiszámítható az átlagos napi gyarapodás, a takarmányfelvétel és az energiahasznosítás is. A takarmányok közül a tejfehérje PER-értéke 3,5–4,0 közötti, a közepes minőségű szójafehérjéé 2,6–3,1 közötti, a kommersz malactápoké pedig 2,4–2,9 közötti. *A módszer alkalmas kis rost- és nagy lizintartalmú, 12%-nál nagyobb fehérjetartalmú takarmány-alapanyagok fehérjemínőségének vizsgálatára, az antinutritív anyagok jelenlétének jelzésére és a humán felhasználásra szánt élelmiszerek fehérjéi biológiai értékének ellenőrzésére.*

7.5.2. A nettó fehérjehasznosítás meghatározása növendék patkányokkal, a test nitrogéntartalmának közvetlen mérésével

A nettó fehérjehasznosítás- (NPU-) index az elfogyasztott fehérje szervezetben hasznosuló részét mutatja az alábbiak szerint:

$$\text{NPU} = \frac{\text{hasznosult nitrogén}}{\text{elfogyasztott nitrogén}} \cdot 100.$$

A meghatározás során a fehérjét nem tartalmazó kontrolltápot, valamint a 10% fehérjének megfelelő tesztfehérjét tartalmazó kísérleti tápot fogyasztó állatcsoportok nitrogéntartalmát 10 napos etetés után meghatározzuk, majd a kapott különbségeket a tesztcsoport által elfogyasztott nitrogénmennyiségre vonatkoztatjuk. A kísérletekhez 23 napos, választott, vegyes ivarú patkányokat használunk. Az állatokat az előnevelőtáppal kezdjük etetni, melynek során célszerű, ha az összetételben hasonlít a kísérleti táphoz, fehérjetartalma pedig a patkánytáphoz hasonlóan 20–22%. A tesztáp összetételét a következőképpen célszerű összeállítani: sertészsír 15%, burgonyakeményítő 10%, glükóz 15%, vitaminkeverék vívíanyaggal 5%, ásványianyag-keverék 5%, tesztfehérje 10% nyersfehérjének megfelelő mennyiség, majd az egészet 100%-ra egészítjük ki kukoricakeményítővel. A kontrolltáp a tesztfehérje kivételével ugyanezeket az anyagokat tartalmazza. A vitaminkeverék az alábbi komponensekből áll: tiamin-HCl 0,06 g, kalcium-patotenát 1,2 g, nikotinsav 4,0 g, inozitol 4,0 g, p-amino-benzoészav 12,0 g, biotin 0,04 g, folsav 0,04 g, B₁₂-vitamin 0,001 g, kolin 12 g, majd az egészet kukoricakeményítővel 1 kg-ra egészítjük ki. A sókeverék 60%-a Ca₃(PO₄)₂, 25%-a NaCl és 15%-a KCl, amelyhez még hozzá kell adni 2% mikroelem-keveréket, melynek összetétele a következő: Fe(II)-citrát · 3 H₂O 30%, MgCO₃ 30%,

$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 30%, bázisos réz-karbonát 7%, ZnCO_3 2,8%, NaIO_3 0,1% és NaF 0,1%.

A módszerrel azoknak a fehérjehordozóknak az NPU-értéke határozható meg, amelyeknek nyersfehérje-tartalma legalább 10%. Egy kísérletre 500 g homogén minta elegendő, ha előtte nitrogéntartalmát, esetleg beltartalmát meghatározták. A minták zsírtartalma 10%-ig nem zavar, e felett azonban vagy a mintát kell zsírtalanítani, vagy a sertészsír mennyiségét kell arányosan csökkenteni. A kísérleti körülmények a következők: a patkányszoba hőmérséklete 28 ± 1 °C, relatív páratartalma 50–80%, a ketrecek megvilágítása azonos, és minden ketrecben biztosítani kell az ad libitum etetést és itatást. A hőmérsékletet pontosan be kell tartani, mert alacsonyabb hőmérsékleten a fehérje energiaként használódhat fel, ami kisebb NPU-értéket eredményez. Mintánként két ketrec, ketrecenként négy patkány szükséges, az egyedileg tartott patkányok tápfogyasztása ugyanis nagyobb. A kísérlet kezdetén a patkányok 6–7 napig a tesztáphoz hasonló, de annál nagyobb fehérjetartalmú tápot kapnak. A tömegmérést követően olyan vegyes ivarú csoportokat alakítunk ki, amelyeken belül az állatok testtömeg-különbsége nem haladja meg az 5 g-ot, és az egyes csoportok átlagtömegei 2 g-nál jobban nem térnek el egymástól. A koprofágia megakadályozása miatt négy-négy állatot dróthálón helyezünk el a ketrecben. Az etető olyan szerkezetű, ami lehetővé teszi a por alakú táp könnyű elérését, ugyanakkor minimálisra csökkenti a szóródást. A kiszóródott tápot fémtálcákra helyezett papíron összegyűjtjük és visszamérjük. A kontrollcsoportok fehérjét nem tartalmazó, de ugyanolyan energia- és hatóanyag-tartalmú tápot kapnak, mint a 10% fehérjetartalomra beállított tesztápok. A kísérleti etetést 10 napig végezzük, melynek során a tömegeket naponta mérjük, és a relatív gyarapodást az idő függvényében ábrázoljuk. A 10. napon az állatokat kloroformmal vagy szén-dioxiddal megöljük, a koponyát, a mellkast és a testüreget bemetszéssel felnyitva a patkányokat 20×20 cm-es, 4 cm magas oldalfalú fémtálcákra helyezzük. Tömegük lemérése után a patkánytestet 105 °C-on, 48 órán át szárítószekrényben szárítjuk, majd a szárazanyag-tartalmat kiszámítjuk. A száraz patkánytetemeket húsdarálón ledarálva homogenizáljuk, majd meghatározzuk a homogén anyag aliquot részének nitrogéntartalmát. Az elfogyasztott és az elszóródott táp szárazanyag-tartalmának mérésével meghatározzuk az elfogyasztott N-mennyiséget. A nettó fehérjehasznosítást a következő képlet szerint számoljuk:

$$\text{NPU} = \frac{(B - B_k + I_k) \cdot 100}{I},$$

ahol:

B = a kísérleti tápot fogyasztó patkányok átlagos N-tartalma a 10. napon,

B_k = a kontrolltápot fogyasztó patkányok átlagos N-tartalma a 10. napon,

I_k = a kontrollcsoport N-fogyasztása,

I = a tesztcsoport N-fogyasztása.

A módszer pontossága nagymértékben függ az elfogyasztott nitrogénmennyiségtől, ezért a táp mérésére és visszamérésére rendkívül nagy gondot kell fordítani. Kevésbé befolyásolja a pontosságot a tápok energiatartalma (16,3–17,6 MJ/kg szárazanyag) és fehérjetartalmának kis-mértékű (9–11%) ingadozása. Nincs hatással az NPU-értékre a közölttől eltérő, de az állat szükségleteit egyébként kielégítő más ásványianyag- vagy vitaminkeverék sem. A tápban szereplő nyers burgonyakeményítő nem emészthető, ezért szükség szerint cellulózporral is helyettesíthető, és ugyancsak helyettesíthető a kukoricakeményítő rizskeményítővel is. Az NPU-érték annál pontosabban meghatározható, minél kisebb a csoportokon belüli szórás, vagyis minél kisebb az állatok tömege közötti különbség a kísérlet indulásakor. A kiszárított patkánytesteket húsdarálással a szőr- és zsírtartalom miatt rendkívül nehéz homogénezzni, ezért célszerűbb az állatokat kiirtásuk után 200 cm³ 6M sósavban, 0,2 MPa nyomáson egy órán át autoklávban üvegedényben hidrolizálni, majd a kapott oldatot 1 dm³-re feltölteni, és ennek aliquot részéből meghatározni a nitrogént. A módszer ugyan több időt vesz igénybe, de a teljестest analízis így jóval pontosabban végezhető el.

7.5.3. A nettó fehérjearány meghatározása növendék patkányokkal

A nettó fehérjearány- (NPR-) index a 10% fehérjetartalmú tesztápot és fehérjementes kontrolltápot fogyasztó patkánycsoportok tömege közötti különbséget mutatja az etetés végén, a tesztcsoport által elfogyasztott nitrogén mennyiségére vonatkoztatva. Az NPR-indexet a következő képlet szerint számítjuk:

$$\text{NPR} = \frac{\text{tesztcsoport tömege} - \text{kontrollcsoport tömege}}{\text{tesztcsoport N-fogyasztása}}.$$

Az NPR-index az elfogyasztott fehérje hatására bekövetkező tömeggyarapodást mutatja a fehérjementes tápot fogyasztó csoportokhoz képest, melyből megtudható, hogy a fehérje a tömeggyarapodásra nézve, a kontrollhoz viszonyítva, mennyire hatékony. A módszer együtt méri a létfenntartó és a növekedési fehérjeszükséglet kielégítését, ezért vele a tömeggyarapodást elő nem segítő fehérjék is minősíthetők.

A kísérletekhez 20–23 napos választott hím patkányok kellenek, melyekből tízes csoportokat alakítunk ki. A kontrolltáp 10% kukoricaolajat, 5% cellulózport, 4% ásványianyag-keveréket, 1% vitaminpremixet, valamint 80% kukoricakeményítőt tartalmaz, a táp fehérjetartalma nulla. A tesztáp összetétele ugyanennyi, azzal a különbséggel, hogy 10% nyersfehérjének megfelelő mennyiségű kísérleti anyagot tartalmaz, és a táp kiegészítése ennek a mennyiségnek megfelelő kukoricakeményítővel történik. A vitaminkeverék összetétele az alábbi: A-vitamin 0,3 mg, D-vitamin 2,5 μg , E-vitamin 10 mg, menadion 0,5 mg, tiamin 0,5 mg, riboflavin 1 mg, piridoxin 0,4 mg, pantoténsav 4 mg, niacin 4 mg, kolin 200 mg, inozit 25 mg, p-amino-benzoésav 10 mg, B₁₂-vitamin 2 μg , biotin 20 μg , folsav 200 μg , és az egész cellulózzal 1 g-ra van kiegészítve.

A kísérlethez bármely ketrec megfelel, mely egyedi elhelyezést tesz lehetővé. A kísérletekhez homogén mintából 1–2 kg elegendő. A tesztáp összeállítása során ismernünk kell a fehérjehordozó nitrogéntartalmát és annak zsírtartalmát, hogy a kísérleti és a kontrolltáp energiáját azonos szintre tudjuk beállítani. Az etetés véletlenszerű blokkrendezésben 10 napig tart, melynek során háromnaponként mérjük a tömegeket, a tápfogyasztást pedig a kísérlet végén határozzuk meg. Az értékeléskor a kísérleti csoport 10. napon mért tömegének átlagából levonjuk a kontrollcsoportét, majd a különbségeket a tesztcsoport nitrogénfogyasztására vonatkoztatjuk, azaz *kiszámoljuk az 1 g elfogyasztott fehérje hatására bekövetkező tömegkülönbségeket*. Az NPR- és a PER-indexek mértékegysége g/g, az NPU és BV mértékegysége pedig százalék. Az NPR-értéket 16-tal megszorozva kapjuk a *fehérjeretenció hatékonysági indexet* (PRE), melynek értéke közvetlenül az NPU-hoz hasonlítható. A 16-tal történő szorzással a tömeggyarapodást a fehérjetartalom növekedésre számoljuk át, mert a patkánytest átlagos fehérjetartalma 16%.

A meghatározás során hibát követünk el akkor, ha nem vigyázunk a kontroll- és a tesztápok azonos energiaszintjére, ekkor ugyanis az állat gyarapodása nem lesz arányos fehérjetartalmának növekedésével, és a zsírfelrakódás mértéke a különböző csoportokban eltérő lehet. *Az NPR-index a növekedést elő nem segítő fehérjék minősítésére is alkalmas,*

míg a PER-index csak akkor használható, ha a tesztfehérje a kiindulási tömeghez képest tömeggyarapodást idéz elő. Az NPR- és az NPU-indexek erősen szignifikáns kapcsolatban ($r=0,99$) állnak egymással, így sorozatvizsgálatban az NPR-módszer alkalmas az NPU-módszer helyettesítésére.

7.5.4. A nettó fehérjeérték meghatározása csirkékkel a test nitrogéntartalmának mérése alapján

A baromfiak ürülékében a bélsár és a vizelet összekeveredik, ezért velük – operációs beavatkozás nélkül – klasszikus nitrogénmérleg-kísérleteket végezni nem lehet, a testnitrogén közvetlen analízisén alapuló módszerrel viszont az NPU-index csirkéknél is mérhető. A kísérletekhez napos, bármely fajtájú vagy hibrid, szexált csibék megfelelőek. A kísérleti táp 28% kukoricakeményítőt, 5% dextrint, 5,9% ásványianyag-keveréket, 3% cellulózt, 3% kukoricaolajat, 0,2% kolin-kloridot, 0,25% vitaminkeveréket tartalmaz, és az egészet 100%-ra egészítik ki glükózzal. A tesztfehérjét a glükóz egy része helyett adjuk a takarmányhoz oly módon, hogy a kész táp nyersfehérje-tartalma 13% legyen. Az ásványianyag-keverék az alábbi komponensekből áll: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 17%, KH_2PO_4 22%, NaCl 16,1%, CaCO_3 38%, Fe-glükonát 1%, MgSO_4 5%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,44%, KI 0,02%, CuSO_4 0,02%, ZnCO_3 0,40%, $\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,02%. A vitaminkeverék az alábbi komponensekből áll (a mértékegység minden esetben mg/kg): tiamin-HCl 25, riboflavin 16, Ca-pantotenát 20, B₁₂-vitamin 0,02, piridoxin-HCl 6, biotin 0,6, folsav 4, 2-metil-naftokinon 5, aszkorbinsav 250, niacin 150, A-vitamin 3,0, D₃-vitamin 0,015, α -tokoferol-szukcinát 5,0. A vitamin-, illetve ásványianyag-keverék helyett más egyéb ajánlott csirkeindító egysegű premix is keverhető a tápba. A vizsgálat során a naposcsibék egy hétig standard kereskedelmi indítótápot kapnak, majd ezt követően azonos testtömegű, 5–5 csibéből álló csoportokat alakítunk ki. A tesztfehérjét négy különböző csoporttal vizsgáljuk, míg a négy kontrollcsoport fehérjementes tápot kap. Kéthetes etetés után a kísérlet vége előtt 12 órával a tápokot eltávolítjuk, az állatok tömegét mérjük, majd a csibéket szén-dioxiddal kiirtjuk. Ezt követően 85 °C-on a csirketesteket szárítószekrényben tömegállandóságig szárítjuk, utána pedig meghatározzuk szárazanyag-tartalmukat. A száraz tetemeket homogénezzük, majd a minta aliquot részéből meghatározzuk a nitrogéntartalmat. A nettó fehérjeértéket a következő képlet szerint számítjuk:

$$\text{NPV} = \frac{B_f - B_k + I_k}{I_f},$$

ahol:

B_f = a kísérleti csoport testnitrogén-tartalma (g),

B_k = a kontrollcsoport testnitrogén-tartalma (g),

I_f = a kísérleti csoport nitrogénfogyasztása (g),

I_k = a kontrollcsoport nitrogénfogyasztása (g).

A fehérjeretenció hatékonyságát a következő képlettel számoljuk:

$$\text{PRE} = \frac{G_f - G_k}{I_f} \cdot 18,0,$$

ahol:

G_f = a kísérleti csoport végső testtömege (g),

G_k = a kontrollcsoport végső testtömege (g),

I_f = a kísérleti csoport nitrogénfogyasztása (g).

Mivel a nedves csirketest átlagos fehérjetartalma 18%, ezzel a testtömeget beszorozva a PRE-értéket az NPV-indexhez hasonlíthatóvá tesszük.

Az NPV-index meghatározása valójában az NPU-indexszel azonos módon történik, ezért a módszer alkalmazási területe az NPU-éval azonos. A tömegkülönbségből számított PRE-indexek jól egyeznek az NPV-értékkel, ezért sorozatmeghatározásokra inkább a PRE javasolható. A csirke testének nitrogéntartalma 6M sósavval történő, 0,2 MPa nyomáson, egy órán át végzett előhidrolízis után, homogénezést követően pontosabban meghatározható. A homogén oldat aliquot részéből *Kjeldahl*-módszerrel a nitrogén mérhető. A csirketest nitrogéntartalmát meghatározhatjuk úgy is, hogy a tollazatot eltávolítva és megszáritva annak nitrogéntartalmát 14,8%-kal vesszük figyelembe, a toll szárazanyagában ugyanis a nitrogéntartalom ingadozása elhanyagolható. A toll eltávolítása után a test nitrogéntartalma már könnyebben meghatározható.

7.5.5. A produktív fehérjeérték meghatározása növendék patkányokkal

A produktív fehérjeérték- (PPW-) index a testnitrogén-tartalom gyarapodását az elfogyasztott nitrogénmennyiség százalékában méri az alábbi képlet szerint:

$$\text{PPW} = \frac{\text{a test N-tartalmának gyarapodása}}{\text{elfogyasztott nitrogén}} \cdot 100.$$

A test nitrogéntartalmának gyarapodását a teljes test analízisével határozhatjuk meg, melynek során a kísérlet végén mért értékből levonják a kísérlet elején az indulótömegre jellemző számított értéket. A kísérletek folyamán 21 napos választott hím patkányokat használnak, melyekből tízes csoportokat alakítanak ki. A tesztáp összetétele az alábbi: cukor 10%, ásványianyag-premix 6%, vitaminpremix 2%, szójaolaj 5%, cellulózpor 4%, a tesztáp 10% nyersfehérjét tartalmaz, melyet rizskeményítővel 100%-ra egészítenek ki. A nyersfehérje számításakor a szorzófaktor 6,25, a standard fehérje a kazein, melyet 5% DL-metioninnal kell kiegészíteni. A kísérlet során az állatokat 23 °C hőmérsékletű, 50–60% relatív páratartalmú patkányszobában tartják, napi 12 órás megvilágítással. Az etetés és az itatás ad libitum történik. A vizsgálat kivitelezésekor az első három nap alatt az állatok a standard patkánytápból és a kísérleti tápból készített 50–50%-os keveréket kapják. Három nap múlva a tápot eltávolítják, majd hat óra múlva az állatokat lemérik. A randomizált csoportokat úgy kell kialakítani, hogy a csoportok átlagtömege lehetőleg azonos legyen, az egyedi ketrecek pedig blokkrendezéssel úgy kell elhelyezni, hogy a környezeti hatások kiegyenlítődjenek. A kontrollcsoport szén-dioxiddal történő leölését a test nitrogéntartalmának meghatározása követi. Ezt követően hét napra elegendő tápot adunk mindegyik állatnak, majd az ad libitum etetés után az el nem fogyasztott tápot a 7. nap elteltével visszamérjük. A patkányok tömegét ugyanúgy, mint a kísérlet kezdetén, lemérjük, majd a továbbiakban az etetést hetenkénti testtömegméréssel még két hétig folytatjuk. A szén-dioxiddal történő leölést követően a testek N-tartalmát az autoklávban végzett feltárás után meghatározzuk. A produktív fehérjeérték indexet az alábbi képlet szerint számoljuk:

$$PPW = \frac{B - B_0}{I} \cdot 100,$$

ahol:

B = a patkányok nitrogéntartalma a kísérlet végén,

B_0 = a patkányok nitrogéntartalma a kísérlet kezdetén.

(Ezt a következőképpen állapítjuk meg: meghatározzuk a kontrollcsoport patkányainak átlagos N-tartalmát, majd a mg N/g állat dimenzióban kifejezett értékkel besorozzuk a tesztcsoport patkányainak kiindulási testtömegét.)

I = az elfogyasztott nitrogén mennyisége.

7.5.6. A bruttó fehérjeérték meghatározása csirkékkel

A bruttó fehérjeérték (GPV) a koncentrált fehérjehordozók komplettáló hatását méri gabona alaptakarmány mellett. A meghatározás során a 8% nyersfehérje-tartalmú alaptápot 3% tesztfehérjével egészítik ki, majd a tömeggyarapodást az elfogyasztott táp tömegegységére vonatkoztatják, a kapott értéket pedig a kazeinstandarddal mért eredmény százalékában fejezik ki. *A GPV-érték tehát azt adja meg, hogy a tesztfehérje cereáliákat komplettáló hatása hány százaléka a kazeinénak.* A kísérlethez légkondicionált állatházra és olyan battériákra van szükség, amelyek alja dróthálóból készült, és az etetővályúk kialakítása a táp kiszóródását megakadályozza. A kísérlet bármely fajtatiszta vagy hibrid, szexált naposcsibével végezhető. Az etetéshez olyan alapkeveréket készítünk, amely depletálótápot, kontrolltápot, kazeines tápot és tesztápot is tartalmaz. Az alaptápkeverék nyersfehérje-tartalma 12–13%, melyből 160 kg szükséges a kísérlethez 320 állatra számolva. Az alapkeverék a következő komponenseket tartalmazza: búzakorpa 25%, kukoricaliszt 17,5%, árpaliszt 25%, zabliszt 16,6%, tejsavópor 8,4%, takarmányélesztő 5%, ásványi anyagok 0,75%, vitaminpremix 1,75%. A vitaminpremix grammonként legalább 0,3 g A-vitamint és 5 μg D₃-vitamint tartalmazzon.

A depletálótápot az alaptápból keményítővel, zabliszttel, Ca₃(PO₄)₂-tal és CaCO₃-tal hígítjuk, hogy a kész táp fehérjetartalma 8%, nyersrost-tartalma 7%, foszfortartalma 0,72%, kalciumtartalma pedig 1,10% legyen. E tápból mintegy 120 kg szükséges, melyet 360 mg E-vitaminnal kell kiegészíteni. A kontrolltáp 19,8 kg depletálótápot és 0,2 kg keményítőt kell tartalmazzon, melyet 60 mg E-vitaminnal egészítünk ki. A tesztápot az alaptápkeverékből készítjük oly módon, hogy azt 3% nyersfehérjének megfelelő tesztfehérjével egészítjük ki. Referenciaként az egyik tesztápot mindig 3% nyersfehérjének megfelelő kazeinből kell álljon, melyet kazeines tápnek hívunk. A tesztápot összetétele tehát a következő: tesztfehérje vagy kazein olyan mennyiségben, hogy a kész tápban 3% nyersfehérjét képviseljen, alapkeverék és zabliszt olyan mennyiségben, hogy a kész tápban 8% nyersfehérjét képviseljen, és a nyersrost-tartalom 7%-ra növekedjen. Ca₃(PO₄)₂ olyan mennyiségben, hogy a táp foszfortartalma 0,72% legyen, CaCO₃ olyan mennyiségben, hogy a kész táp kalciumtartalma 1,10%-ot tegyen ki. Hozzáadunk ezenkívül még 60 mg E-vitamint, és keményítővel 20 kg-ra egészítjük ki.

A vizsgálathoz legalább 20–60 kg homogenizált minta szükséges, melyet a kísérletek megkezdéséig lehetőleg levegőtől elzárva, hűvös helyen kell tárolni. A kísérlet kezdetén a szexált napos kakascsibék búza- és kukoricadara egyenlő arányú keverékét ad libitum fogyasztják három napig, majd ezt követően tíz napon át depletálótápot fogyasztanak. A 11. napon a csirkéket pontosan lemérjük, majd 600 db naposcsibéből kiindulva – a legnagyobb és a legkisebb tömegű egyedeket kiválogatva – 320 db majdnem azonos tömegű állatot állítunk a kísérletbe. Ezekből véletlenszerű kiválasztással 32 db, tíz egyedből álló csoportot alakítunk ki, ami nyolc tesztfehérje vizsgálatát teszi lehetővé négyszeres ismétlésben. A csoportokat úgy kell elhelyezni, hogy az elhelyezési különbségekből adódó hatás lehetőleg mindegyik csoportnál azonos legyen. Ezt követően 14 napon át a csirkék a tesztápot, a kontrolltápot és a kazeines tápot ad libitum fogyasztják, miközben a 4., a 7., a 11., a 13. és a 14. napon mérjük tömegüket és a tápfogyasztást. A GPV-indexet a következő képlet segítségével számoljuk ki:

$$\text{GPV} = \frac{\Delta S_t / F_t}{\Delta S_k / F_k} \cdot 100,$$

ahol:

$$\Delta S_t = S_t - S_c,$$

$$\Delta S_k = S_k - S_c,$$

$$F_t = I_t \cdot f_t,$$

$$F_k = I_k \cdot f_k,$$

ΔS_t = a tesztápot fogyasztó csoport átlagos tömegének (S_t) és a kontrolltápot fogyasztó csoport átlagos tömegének (S_c) a különbsége: azaz a tesztcsoport többletgyarapodása a kontrollcsoportéhoz képest (g),

ΔS_k = a kazeines tápot és a kontrolltápot fogyasztó csoportok átlagtömegének különbsége (g),

F_t = a tesztáppal elfogyasztott nyersfehérje mennyisége egy csirkére vonatkoztatva (g),

F_k = a kazeines táppal elfogyasztott nyersfehérje mennyisége egy csirkére vonatkoztatva (g),

I_t = egy csirkére számított tesztáp mennyisége (g),

I_k = egy csirkére számított kazeines táp mennyisége (g),

f_t = a tesztáp nyersfehérje-tartalma (%),

f_k = a kazeines táp nyersfehérje-tartalma (%).

Az értékelés során kiszámítjuk a *kiegészítőként adott tesztfehérje 1 g-ja által előidézett gyarapodást, melyet a kazein 1 g-ja által kapott tömeggyarapodás százalékában fejezünk ki*. A meghatározáskor hibaként jelentkezhethet, hogy a referenciaként használt kazein tápértéke függ a gyártótól és a beszerzési forrástól, amit sorozatvizsgálatban figyelembe kell venni. A GPV-indexszel a fehérjekoncentrátumok (olajos magvak darái, szójaliszt, tejpör, halliszt) gabonafélék fehérjéit komplettáló hatását lehet mérni, ezért a GPV-index a takarmány-összeállítási kérdésekre közvetlen választ ad. A GPV-érték főleg a tesztfehérje hasznosítható lizintartalmának feleslegét jelzi, ezért igen szoros korrelációt mutat a tesztfehérje más módszerrel meghatározott hasznosítható lizintartalmával. Fentiek miatt az idő- és munkaigényes GPV-teszt gyors minőségellenőrzésre nem használható, erre a lizintartalom meghatározására szolgáló egyéb módszerek alkalmasabbak.

7.5.7. A relatív növekedési index meghatározása növendék patkányokkal

A relatív növekedési index (RGI) meghatározása során méri a tesztfehérjét különböző koncentrációban tartalmazó tápok által kiváltott tömeggyarapodást. A nitrogénfogyasztás függvényében ábrázolt tömeggyarapodási görbe hajlásszögét a laktalbumin esetén nyert hajlásszög százalékában fejezik ki. A kísérletekhez kellően homogén törzsből választott hím patkányokat használnak. A testtáp összetétele a következő: zsír 8%, ásványianyag-keverék 4%, tőkehal-máj-olaj 2%, vitaminkeverék 1%, tesztfehérje hét különböző koncentrációban, és az egészet kukoricakeményítővel 100%-ra egészítik ki. A tesztfehérje-koncentráció tartománya laktalbumin esetében 2–15%, kazeinnél 3–26%, szójafehérjénél 8–42%, búzasikérnél pedig 11–40%. Az elfogyasztott táp mennyisége alapján a nitrogénfogyasztás kiszámítható.

Egy tesztfehérje vizsgálatához hét patkánycsoportot kell beállítani; minden csoport hat állatból áll. A kísérleti etetés három hétig tart, a testtömeget hetenként, a tápfogyasztást a kísérlet végén kell mérni. A testtápokkal párhuzamosan laktalbumintartalmú referenciatápot és fehérjementes, de azonos energiájú és hatóanyagtartalmú tápot is etetni kell. Az értékelés során a táp fehérjekoncentrációját a tömegváltozás függvényében ábrázolva, a görbe kezdeti szakasza szigmoid jellegű, lineárisrá válik viszont, ha a napi nitrogénfogyasztást ábrázoljuk a tömegváltozás függvényében. A görbe hajlásszögét regresszióanalízissel számítjuk

ki, kezdőpontját a fehérjementes táp etetésekor mért tömegváltozási érték adja. A tesztfehérje vizsgálatokor mért hajlásszöget a laktalbuminnál nyert érték százalékában kifejezve kapjuk az RGI-indexet.

A BV- és az NPU-indexek a rossz minőségű, lizinhiányos fehérjéket értékesebbnek ítélik valódi értéküknél. A triptofánt egyáltalán nem tartalmazó zselatin BV-értéke 25 körüli, a lizint nem tartalmazó tápok NPU-értéke pedig 30–40% is lehet a szervezet kompenzációs mechanizmusa folytán. Ezek a fehérjék viszont a növekedést nem segítik elő. A fehérje hasznosulásának mérésére a PER sem ideális, mert a rosszabb minőségű fehérjéket alulértékeli, ezzel szemben az RGI-index a rossz minőségű fehérje hordozók vizsgálatában az előző indexek hibáit korrigálja, hátránya viszont, hogy többdózisos jellegénél fogva rendkívül munkaigényes, termelékenysége csekély, ezért a módszer sorozatvizsgálatra nem alkalmas.

7.5.8. A relatív nitrogénhasznosítás meghatározása növények patkányokkal

A relatív nitrogénhasznosítás (RNU) – az NPR-indexhez hasonlóan – a 8–10% nyersfehérje-tartalmú tesztápot fogyasztó állatcsoport tömegváltozását a két hét alatt elfogyasztott nitrogénmennyiségre vonatkoztatja. A létfenntartás fehérjeszükségletét számítással veszi figyelembe, a kapott értéket pedig a laktalbumintartalmú táppal nyert érték százalékában fejezi ki.

A kísérletek során 21–23 napos, választott hím patkányokat használnak, melyeket egyedileg helyeznek el drótháló aljú ketrecekben, melyekben az etető lehetőleg olyan legyen, mely a táp kiszóródását a minimálisra csökkenti. Az állatház hőmérséklete 24 °C-os, relatív páratartalma pedig 60–80%. A tesztápot összetétele a következő: kukoricaolaj 10%, cellulózpor 5%, vitaminkeverék 1%, ásványianyag-keverék 3%, tesztfehérje 8–10% nyersfehérjének megfelelő mennyiség, majd az egészet 100%-ra egészítik ki kukoricakeményítővel. A vitaminkeverék összetétele mg/g egységekben az alábbi: tiamin-HCl 6,5; riboflavin 12,5; piridoxin-HCl 6,0; niacin 75,0; Ca-pantotenát 40,0; 2-metil-naftokinon 0,5; biotin 0,5; folsav 2,0; aszkorbinsav 50,0; p-amino-benzoésav 100,0; inozit 100,0; DL- α -tokoferol 120,0; B₁₂-vitamin 0,025, A-vitamin-palmitát 1,8; D₂-vitamin 0,075. Az ásványianyag-keverék esetében minden olyan összeállítást

használható, amely a patkány ásványianyag-szükségletét fedezi. A vizsgálat során a 21–23 napos, választott hím patkányokat két napig csoportosan tartva kereskedelmi standard patkánytáppal ad libitum etetik. Ezt követően 8–10 patkányt tartalmazó, közel azonos tömegű csoportokat alakítanak ki. A kísérleti csoport a tesztápot, a kontrollcsoport pedig a 8% nyersfehérjének megfelelő laktalbumint tartalmazó tápot fogyasztja. A kísérleti etetés két hétig tart, a testtömegeket és a tápfogyasztást hetenként mérik. A nitrogénhasznosítást (NU) a következő képlettel számíthatjuk:

$$NU = \frac{\text{testtömegváltozás (g)} + 0,1 (\text{kezdőtömeg (g)} + \text{végső testtömeg (g)})}{\text{elfogyasztott nitrogén (g)}}$$

Az NU-ból az RNU-indexet a laktalbuminhoz való hasonlítással a következők szerint kalkulálhatjuk:

$$RNU = \frac{NU\text{-teszt}}{NU\text{-laktalbumin}} \cdot 100.$$

Ebben a lépésben az endogénnitrogén-veszteséget a létfenntartó nitrogénszükségletre jellemző faktorról – $0,1 \cdot (\text{kezdőtömeg} + \text{végtömeg})$ – vesszük figyelembe. A faktor kiszámítása azon alapszik, hogy a fehérjementes tápot fogyasztó patkányok a kéthetes etetési idő alatt átlagos testtömegük 20%-át veszítik el.

Az RNU meghatározásakor a kísérleti elrendezés egyszerű, mert nem kell fehérjementes tápot fogyasztó csoportot beiktatni. A létfenntartó nitrogénszükségletre jellemző faktor jó közelítéssel adja az endogénnitrogén-veszteséget. Az RNU valójában a PER és az RPN továbbfejlesztett változata, a szervezet tömegváltozásán alapuló módszer. Figyelembe veszi a patkány endogénnitrogén-veszteségét, és a tesztfehérje minőségét a teljes mértékben hasznosulónak feltételezett referenciafehérje százalékában fejezi ki. Az RNU-módszer előnye a PER-módszerhez képest, hogy a kísérleti etetés ideje csak fele annak, a növekedést elő nem segítő fehérjék is vizsgálhatók vele, nem értékeli alul a rosszabb minőségű fehérjét, realisabb értéket ad, mint a PER, és kevésbé befolyásolja a táp lipidtartalmának változása. Az RNU-módszer szériavizsgálatokra alkalmas, és hasonló eredményeket ad, mint a jóval munkaigényesebb, több dózisos RGI-módszer.

7.5.9. A biológiai érték meghatározása

7.5.9.1. A fehérjék minősítése a kémiai indexek alapján

A fehérjék biológiai értékét alapvetően aminosav-összetételük határozza meg. Meghatározására többféle módszert dolgoztak ki, melyek közül az *in vivo* módszerek mellett elterjedtek a kémiai analízisen alapuló *in vitro* módszerek is. Ezek az eljárások főként *a fehérjék esszenciális aminosavainak meghatározásán alapulnak*, és olyan eredményeket adnak, melyek szoros kapcsolatban állnak a fehérjék biológiai értékével. Az *in vitro* biológiaiérték-meghatározás hiányosságait kiküszöbölhetik azok a kémiai módszerek, melyek nemcsak az aminosavak mennyiségét, hanem az aminosavak felhasználhatóságát is vizsgálják. Ma már a hasznosítható lizintartalom mellett meghatározzák a hasznosítható metionin- és a hasznosítható triptofántartalmat is, melyek a különböző kémiai indexekkel együtt valós képet adnak a fehérje biológiai értékéről.

A különböző szerzők által kidolgozott *kémiai indexek, képletek, formulák kivétel nélkül az esszenciális aminosavakon alapulnak*. Kezdetben problémát jelentett az, hogy mely aminosavakat tekintsük esszenciálisoknak, hisz köztudott, hogy a különböző élőlények esszenciálisaminosav-igénye eltérő, és esetenként az ivar, a fiziológias állapot vagy a kor is befolyással lehet az esszenciális aminosavakra. Figyelembe kell néha azt is venni, hogy a szervezet az esszenciális aminosavak átalakításával úgynevezett félig esszenciális aminosavakat is elő tud állítani, pl. képes metioninból cisztint, fenil-alaninból pedig tirozint képezni, fordítva viszont csak nagyon csekély hatásfokkal képes a szintézist megvalósítani. Az ember és a legtöbb állatfaj esetében esszenciális aminosavnak tekintik a treonint, a valint, az izoleucint, a leucint, a lizint, a hisztidint, a triptofánt, a metionint és a fenil-alanint. A kémiai indexek egy részénél ezentúl figyelembe veszik a cisztin- és a tirozin mennyiségét, esetenként a metionin és a cisztin, valamint a tirozin és a fenil-alanin együttes összegével számolnak. Valamennyi kémiai index kidolgozása során *a minta aminosav-összetételű adatait egy vonatkoztatási alapul választott teljes értékű fehérje adataival hasonlítják össze*. Ez a teljes értékű fehérje némely esetben a tojásfehérje, más esetekben pedig egy mesterségesen kialakított ideális aminosav-összetételű fehérje, melyet az emberi és állati szervezet is teljes mértékben hasznosítani tud, a növekedést optimálisan elősegíti és bármelyik esszenciális aminosavval

kiegészítve hatékonysága nem nő. *(A feleslegben lévő esszenciális aminosavakat néhány index biológiai értéket csökkentő tényezőként veszi figyelembe, hisz a feleslegben lévő esszenciális aminosavtól a szervezetnek meg kell szabadulni, hisz a dezaminálás és az ammónia detoxikálása energiafelhasználással jár.)*

Mitchell a teljes tojásfehérjében vélte felfedezni az ideális fehérjét, amit a későbbiek során sokan megerősítettek, sőt bizonyos tanulmányok arra az eredményre vezettek, hogy a tojásban mintegy 10–15% esszenciális aminosav-felesleg van. A biológiai érték meghatározásánál, a tojásfehérje mellett, a FAO/WHO által ajánlott hipotetikus aminosav-összetételt is alapul lehet venni. Ezt az ideális esszenciális aminosav-összetételt a FAO/WHO az újabb kísérleti adatok figyelembevételével folyamatosan változtatja.

Az aminosav-összetétel alapján számolt első kémiai index (Chemical Score) *Mitchell* és *Block* nevéhez fűződik. Ez az index az esszenciális aminosavakban hiányos fehérjék esetén megfelelő egyezést ad az állatkísérletek során meghatározott biológiai értékkel. A kémiai index számolásakor a kérdéses minta aminosav-tartalmából számított aminonitrogén-tartalmat elosztják a tojás 16% nitrogénre vonatkoztatott aminonitrogén-tartalmával, melynek során egy f-faktort kapnak. A minta aminosav-százalék értékeit szorozzák az f-faktoral, majd a minta aminonitrogén-tartalmát azonos alapra hozzák a vonatkoztatási alapként használt teljes értékű fehérjével. Ezt követően *az egyes esszenciális aminosav-százalék értékeket a megfelelő tojás aminosav-százalékkal osztva kikeresik a minimálisnak adódó értéket*, majd ezt 100-zal megszorozva megkapják a Chemical Score-t. A módszer a gyakorlatban nagyon jól alkalmazható, hisz rendkívül szoros egyezést kaptak az állatkísérletek alapján mért biológiai érték és a Chemical Score között. E módszer valójában a limitáló aminosav(ak) mérésén alapszik, hisz *a legkisebb arányban jelenlévő esszenciális aminosav alapján adja meg a minta biológiai értékét*.

Az *Oser* által kidolgozott kémiai eljárás *az esszenciális aminosavak tojáshoz viszonyított értékeinek geometriai átlaga alapján határozta meg a fehérje biológiai értékét*. Hasonló elvvel *Mitchell* az integrált aminosav indexet, a MEAA-indexet dolgozta ki, amelynek a biológiai értékkel még szorosabb a kapcsolata. A MEAA-index számítása a következő összefüggés alapján történik.

$$\text{MEAA-index} = \left[\frac{\frac{9}{\pi}}{i=1} \left(\frac{a_{i,j}}{a_{i,t}} \right) \right]^{1/9},$$

ahol:

$a_{i,j}$ = a minta i -edik esszenciális aminosavának mennyisége (%),

$a_{i,t}$ = a tojás i -edik esszenciális aminosavának mennyisége (%).

i = futókoordináta (egyres értékeihez a megfelelő esszenciális aminosavértékek tartoznak).

Az index hibájára többen felhívták a figyelmet, ugyanis kimutatták, hogy *a fehérje biológiai értékének meghatározásakor* nem elég csak az esszenciális aminosavakat figyelembe venni, hanem legalább 25%-ban a *nem esszenciális aminosavakat is*. A Mitchell-féle index másik hibája az, hogy ha a minta esszenciális aminosavai közül valamelyik nagyobb koncentrációban van jelen, mint a tojásban, akkor ezt az értéket 100%-nak veszi, holott jobb lenne ilyen esetben a tört reciprokéval számolni, hisz *a feleslegben lévő aminosavtól a szervezet csak energia-befektetéssel tud megszabadulni*.

A két ismertetett módszert értékelve megállapítható, hogy a Mitchell és Block által használt eljárás szélsőségesen csak egy aminosavra alapozva határozza meg a fehérje biológiai értékét, így nagyon gyakran kisebbre értékeli azt a ténylegesnél. A Mitchell-féle MEAA-index azért vezetheti félre a használóját, mert *amennyiben a fehérje bizonyos esszenciális aminosavakból sokat tartalmaz, akkor ez elfedheti más létfontosságú aminosavak hiánya miatt várható biológiaiérték-csökkenést*. Az Oser-féle eljárás tekinthető talán a legjobbnak, mert valamennyi esszenciális aminosavra azonos módon van tekintettel. Korpácsi és mtsai. egy módosított biológiaiérték-meghatározási módszert dolgoztak ki, melynek alapjául ugyancsak a teljes tyúktojás aminosav-összetételét választották, hisz ennek aminosav-összetétele a kísérletek szerint mind az állatok, mind az emberek esetében harmonikusan összehangolt. A módszer nemcsak az esszenciális aminosavakat, hanem a nem esszenciális aminosavakat is figyelembe veszi a biológiai érték számolása során. Ők Oser módszerével kiszámolják a biológiai értéket az esszenciális aminosavakra, és ugyancsak kiszámolják hasonló módszerrel a nem esszenciális aminosavakra is, majd a biológiai értéket a következő képlet alapján kalkulálják:

$$\text{biológiai érték (Korpácsi-index)} = 75A + 25B,$$

ahol:

$$A = \left[\frac{\frac{8}{\pi}}{i=1} (b_{i,j}) \right]^{1/8} ; b_{i,j} = \frac{a_{i,j}}{a_{i,t}}, \text{ ha } a_{i,j} > a_{i,t}; b_{i,j} = \frac{a_{i,t}}{a_{i,j}} \text{ ha } a_{i,j} < a_{i,t}.$$

$$B = \frac{c_x - c_t}{c_t};$$

ahol:

$a_{i,j}$, illetve $a_{i,t}$ = a minta i -edik esszenciális aminosavának mennyisége (%), illetve a tojás i -edik esszenciális aminosavának mennyisége (%),

$c_x = 100 - a_{i,j}$; azaz a kérdéses anyag nem esszenciális aminosavainak mennyisége,

$c_t = 100 - a_{i,t}$; azaz a tojás nem esszenciális aminosavainak mennyisége.

A nem esszenciális aminosavakat a biológiai érték számításánál azért kell figyelembe venni, mert embereket huzamosabb időn keresztül *kizárólag esszenciális aminosavakkal táplálva, a N-anyagcserében zavarok következhetnek be*, negatív N-egyensúly léphet fel, amely csak akkor szűnik meg, ha a táplálékkal bevitt nitrogén legalább 25%-a nem esszenciális aminosavak nitrogénjéből származik. A *Korpácsi-index* kiküszöböli, hogy az esszenciális aminosav túlsúlya esetén a 100-as értéket jóval meghaladó eredményt adó aminosav megbontsa az aminosavak kívánatos egyensúlyát. Ennek a hiányosságnak a kiküszöbölésére javasolják, hogy ha valamely aminosav koncentrációja kisebb a vizsgálandó fehérjében, mint ugyanennek az aminosavnak a koncentrációja a teljes tyúktojás összes fehérjében, akkor az $\frac{a_x}{a_t} \cdot 100$ képletet használják, ahol a_x a vizsgált fehérje valamelyik aminosavának, az a_t pedig a teljes tyúktojás-fehérje ugyanazon aminosavának koncentrációját jelenti az összes fehérjében. Abban az esetben viszont, ha a vizsgált fehérje valamelyik aminosavának koncentrációja nagyobb a tojásban lévő ugyanazon aminosav koncentrációjánál, akkor a $\frac{b_t}{b_x} \cdot 100$ képlettel számolnak, ahol: b_x = a vizsgált fehérje olyan aminosavának koncentrációja, amely nagyobb a tojásban lévő ugyanazon aminosav b_t koncentrációjánál.

Az előző képleteket összevonva, *Korpácsi szerint a fehérje biológiai értékét* most már a következő képlettel lehet számolni:

$$\text{BÉ} = 0,75 \sqrt[n+m]{\frac{a_{x1}}{a_{t1}}} \cdot 100 \dots \frac{a_{xn}}{a_{tn}} \cdot 100 \cdot \frac{b_{t1}}{b_{x1}} \cdot 100 \dots \frac{b_{tn}}{t_{xn}} \cdot 100 +$$

$$+ 0,25 \left(100 - \frac{\Sigma c_x - \Sigma c_t}{\Sigma c_t} \cdot 100 \right) \dots$$

Ez a módosított módszer arra is alkalmas, hogy vele a fehérjék várható biológiai értékét is számítani lehessen.

A limitáló esszenciális aminosavak meghatározásán alapuló fehérjeértékelésnél az ideális esszenciális aminosav-összetételt az anyatej és a tojás aminosav-összetételéből állították össze. Figyelembe vették, hogy a szervezet növekedéséhez és fenntartásához az aminosav-igény akkor elégíthető ki optimálisan, ha a táplálék fehérjéje mind az esszenciális, mind a nem esszenciális aminosavakat tekintve kiegyensúlyozott. *Kiegyensúlyozottnak az a fehérje tekinthető, amelyben az esszenciális aminosavak optimális arányban vannak jelen*, hasznosulásuk maximális, és a nem esszenciális aminosavakat is olyan mennyiségben tartalmazzák, hogy *ne kelljen a szervezetnek az esszenciális aminosavakat nem esszenciálissá átalakítani*. A legnagyobb figyelmet arra az aminosavra kell fordítani, amely a fehérje tápértékét limitálja, azaz a limitáló esszenciális aminosavra.

A FAO Fehérjebizottságának javaslatára a fehérjeindex számításakor az esszenciális aminosavak összes mennyiségének arányában adják meg az egyes esszenciális aminosavak mennyiségét. Viszonyítási alapként a tojás azonos módon számolt értékeit fogadták el. Ennek során a vizsgálandó minta esszenciális aminosavait összeadják, majd az egyes aminosavakra vonatkozó adatokat ezzel az összeggel elosztják, végül az így kapott értékeket hasonlítják a vonatkoztatási fehérje értékeihez. A számítás az alábbi képlet szerint történik:

$$\frac{A}{E} = \frac{a : b}{y : x} \cdot 100,$$

ahol:

a = a limitáló esszenciális aminosav, illetve egy kiválasztott esszenciális aminosav (gAS/16 g N),

b = az esszenciális aminosavak (mennyiségének) összege (gAS/16 g N),

x = a FAO/WHO standard (illetve tojás) kiválasztott esszenciális aminosava (gAS/16 g N),

y = a FAO/WHO standard (illetve tojás) esszenciális aminosavainak összege.

Az ember és az állat természetesen nem fehérjéket, hanem bonyolult összetételű élelmiszereket, illetve takarmányokat fogyaszt, melyek a konyhatechnikai és bonyolult technológiai eljárások során még nagy jelentőségű változásokon is keresztülmennek. Ezért úgy tűnik, hogy

az élelmiszer- és takarmányfehérjék biológiai értékét kémiai összetétel alapján tökéletesen meghatározni nem lehet, azaz a széles körben elterjedt *in vitro* módszerek egyike sem nyújt minden tekintetben kielégítő eredményt. A módszerek csupán megközelíthetik a biológiai módszerekkel meghatározott fehérjeértékeket, hisz a szervezetben lejátszódó rendkívül bonyolult biokémiai folyamatok egyetlen mérőszámmal való jellemzésére kizárólag csak az élőlény képes. Mindezek ellenére a kémiai indexek, az aminosav-összetételből számolt biológiai értékek alkalmassak a fehérjék rangsorolására, a különböző aminosav-hiányok, illetve -többletek feltárására, a limitáló aminosavak meghatározására, valamint segítségükkel a fehérjék felhasználhatóságára pontos információkat nyerhetünk különböző állatfajok tekintetében.

Az aminosav-összetétel alapján számolt kémiai indexek közül a FAO/WHO által javasolt módszerek a legelterjedtebbek, bár ezek sem számolnak az aminosavak hasznosulásával. Az integrált kémiai indexek *Oser* módszerét követik, és leginkább a *Mitchell* által módosított eljárás terjedt el a gyakorlatban. Manapság az ember szempontjából történő biológiai érték meghatározása során sokan használják a *Morup*- és *Olesen*-féle biológiaiérték-számolási eljárást is, és hazánkban pedig a *Korpácsi*-féle indexet is. A biológiaiérték-meghatározási módszerek közül az utóbbi időben széleskörűen alkalmazott *Morup*- és *Olesen*-féle módszert kissé részletesebben az alábbiakban ismertetjük. *Morup* és *Olesen* fiatal egyetemista férfi hallgatókkal végzett kísérleteik alapján a legnagyobb nitrogénretenciót akkor tapasztalták, ha a kísérleti alanyok 66% burgonyából és 34% teljes tojásból álló keveréket fogyasztottak, ami hazánkban leginkább egy igen jó minőségű – kolbász nélkül készített – rakott krumplihoz hasonlít. A biológiai érték számítására a következő egyenletet határozták meg:

$$\text{Biológiai érték} = 10^{2,15} \cdot q_{\text{Lys}}^{0,41} \cdot q_{\text{Arom}}^{0,60} \cdot q_{\text{Sulf}}^{0,77} \cdot q_{\text{Thr}}^{2,41} \cdot q_{\text{Trp}}^{0,21},$$

ahol:

$$q = a/a_{\text{ref}},$$

a = az egyes esszenciális aminosav/összes esszenciális aminosav a vizsgált fehérjében,

a_{ref} = az egyes esszenciális aminosav/összes esszenciális aminosav a vonatkoztatási fehérjében,

Arom = aromás aminosavak (Tyr, Phe),

Sulf = kéntartalmú aminosavak (Cys, Met).

Ennek megfelelően a referenciafehérje biológiai értéke $10^{2,15} \cdot 1 \cdot 1 \cdot 1 \cdot 1 \cdot 1$, azaz egyenlő 141,25-dal. A biológiai érték számolásnál a lizinen, a treoninon és a triptofánon kívül együtt értékelték az aromás aminosavakat (fenil-alanin + tirozin) és a kéntartalmú aminosavakat (metionin + cisztin). Az aminosavak közül a triptofán a 0,21-dik hatványon szerepel, ennek megfelelően a legkisebb befolyása van a biológiai értékre, a treonin pedig a 2,41-dik hatványon, tehát legnagyobb a befolyása a biológiai értékre. A többi aminosavnál ez az index 0,41–0,77 között változik; tehát kb. hasonló hatással vannak a biológiai értékre.

Egy fehérje biológiai értékének meghatározása során az alábbi aminosav-összetételt kaptuk, és ezekből a következő „a” értékeket számoltuk ki:

Aminosav-összetétel (g aminosav/100 g fehérje)

Lys	8,0		$8,0/26,57 = 0,3011$
Phe + Tyr	9,8		$9,8/26,57 = 0,3688$
Met + Cys	3,32	a	$3,32/26,57 = 0,1250$
Thr	4,2	→	$4,2/26,57 = 0,1581$
Trp	1,25		$1,25/26,57 = 0,0470$
Összeg:	<u>26,57</u>		

Ezzel párhuzamosan meghatároztuk a burgonya, illetve a liofilezéssel beszárított tojás aminosav-összetételét, majd ebből a burgonya:tojás = 66:34 arányú keverékének aminosav-összetételét, és ennek alapján számoltuk az a_{ref} értékeket. Az aminosav-összetételi adatokat és a belőle számolt a_{ref} értékeket az alábbi összeállítás tartalmazza a burgonya:tojás = 66:34 arányú keverékére:

Lys	6,5		$6,5/26,3 = 0,247$
Phe + Tyr	8,0		$8,0/26,3 = 0,304$
Met + Cys	4,9	a_{ref}	$4,9/26,3 = 0,186$
Thr	5,4	→	$5,4/26,3 = 0,205$
Trp	1,5		$1,5/26,3 = 0,057$
Összeg:	<u>26,3</u>		

Amennyiben a meghatározni kívánt fehérje és a referenciafehérje esetén képzett $a/a_{\text{ref}} > 1$, akkor az a_{ref}/a volt a számolás alapja.

$$\begin{aligned} \text{Biológiai érték} &= 141,25 \cdot \left(\frac{0,247}{0,3011}\right)^{0,41} \cdot \left(\frac{0,304}{0,3688}\right)^{0,60} \\ &\cdot \left(\frac{0,1250}{0,186}\right)^{0,77} \cdot \left(\frac{0,1581}{0,205}\right)^{2,41} \cdot \left(\frac{0,0470}{0,057}\right)^{0,21} = \\ &= 141,25 \cdot 0,922 \cdot 0,891 \cdot 0,736 \cdot 0,535 \cdot 0,960 = 43,86. \end{aligned}$$

Ez a számolási mód nemcsak az esszenciális aminosav hiányát, hanem az *esszenciális aminosavnak az optimális koncentrációnál nagyobb értékét is bünteti*, hisz az optimálisnál nagyobb koncentrációban adott aminosavat, energia befektetésével, a szervezetnek más célra kell felhasználnia, ami az esszenciális aminosav jelentős túlsúlya esetében nagymértékben megterheli azt. Ha a vizsgált fehérjében lévő esszenciális aminosav mennyiségétől függetlenül az a/a_{ref} -val számolnánk, akkor a biológiai érték a következőképpen alakulna:

$$\text{Biológiai érték} = 141,25 \cdot 1,085 \cdot 1,123 \cdot 0,736 \cdot 0,535 \cdot 0,960 = 65,06.$$

Ez utóbbi számolásnak talán akkor lenne létjogosultsága, ha a vizsgált fehérjét olyan fehérjék kiegészítésére használnánk fel, amelyben hiány mutatkozik abból az aminosavból (jelen esetben lizin és aromás aminosavak), amely a vizsgált fehérjében az optimálisnál nagyobb koncentrációban van jelen.

A kémiai indexek fejlesztésének egyik lehetséges útja bizonyos biológiai tényezők figyelembevétele, melyet követően az *in vitro* eredmények jobb egyezést adnak a biológiai módszerekkel meghatározott eredményekhez viszonyítva. A fejlesztés másik útja a fehérjéken kívüli többi élelmiszerkomponens értékelése, az emészthető aminosavak mennyiségének vizsgálata, az emésztő enzimek által megbonthatatlan keresztkötések tanulmányozása és a D-aminosavak mennyiségének figyelembevétele.

A biológiai érték számolása a korábban említett indexek segítségével, zsebszámológéppel könnyen megvalósítható, nagy számú minta elemzésekor azonban célszerű számítógépes értékelést alkalmazni.

7.5.9.2. A nitrogénmérleg meghatározása patkányokkal

A nitrogénmérleg meghatározására patkányokkal több módszerváltozat terjedt el, melyek között a használt anyagcseredobozok típusában és az endogén-nitrogén-ürítés mértékének kiszámításában van különbség. A patkány anyagcseredobozok 3–6 mm vastagságú, átlátszó plexiből

készülnek, mert a plexi könnyen megmunkálható, ragasztható és sima felületük jól tisztítható. Az egyik fajta kialakítás szerint az anyagcseredoboz 120 mm belső átmérőjű, 3–6 mm vastag plexicsőből készül, a hozzá csatlakozó etetőfolyosó és takarmánykamra pedig 50 mm belső átmérőjű plexicsőből áll. Az etetőfolyosóban egy 6–8 mm-es lyukbőségű horganyzott dróthálóból hajlított csőbetét arra szolgál, hogy evés után a takarmánymaradványok az állat talpáról lehulljanak. Az etetőfolyosó alján egy ovális nyílás van, melyen keresztül a lehullott takarmány egy gyűjtőedénybe kerül. Az etetőfolyosó végén található a könnyen illeszthető, illetve eltávolítható takarmánykamra.

A plexidoboz alja és fedele horganyzott fémháló olyan lyukbőséggel, amelyen a patkány bélsara könnyen áthullik, a doboz fedelére pedig üvegből készült önitató dugható. A doboz alja alá a vizelet és a bélsár elkülönítésére egy műanyag tölcsér, és a tölcsérhez illeszkedő, könnyen cserélhető, 2×2 mm-es lyukbőségű műanyag PVC-háló erősíthető. A 45°-ban álló PVC-tölcsér és -háló alkalmas a vizelet és a bélsár szétválasztására, hisz a bélsár a hálóról, a vizelet pedig a hálón átjutva a tölcsérből kerül egy-egy külön edénybe. A plexicsőből kialakított anyagcseredobozok előnye, hogy nagy sorozatban gyárthatók, olcsók és könnyen tisztíthatók.

A kísérleti takarmányokat légszáraz állapotban, ismert szárazanyag-tartalommal mérjük az etetőterbe. A kísérleti szakasz végén a maradékot visszamérjük, szárazanyag-tartalmát meghatározzuk, a takarmányfogyasztást pedig szárazanyag-felvételre számítjuk át. A szükséges tápmennyiség összeállításakor figyelembe kell venni, hogy az ajánlott korcsoportban a napi maximális szárazanyag-felvétel az élőállatok tömegének 10%-a, ennek megfelelően egyedenként és naponta 120–130 mg nitrogént tartalmazó tápmennyiséget kell a takarmánykamrába mérni. Az ajánlott takarmánykeverék összetétele a következő: teszt- vagy standardfehérje olyan mennyiségben, hogy 100 g táp nyersfehérje-tartalma 10% legyen, szőlőcukor 10 g, ásványianyag-premix 6 g, vitaminpremix 2 g, szójaolaj 5 g, papíripari tisztított cellulózpor 4 g, melyet búzakeményítővel 100 g-ra egészítenek ki. Ha a fehérjehordozó nagyobb mennyiségű zsiradékot vagy rostot tartalmaz, akkor a szójaolaj és a cellulóz mennyiségét ennek megfelelően korrigálni kell. A kísérleti és a kontrolltápokat üveg- vagy műanyag edényekben lezárva, sötét, hűvös helyen tároljuk. Az ásványianyag- és vitaminpremix összetétele olyan legyen, hogy a patkányok szükségleteit maradék nélkül kielégítse. A vitaminpremixet a jobb bemérhetőség és a tárolhatóság érdekében

1 kg búzakeményítővel jól elkeverjük, és üvegben lezárva hidegen tároljuk.

A kísérlet céljától függően különféle referenciafehérjéket, és különféle aminosav-összetételű fehérjéket etetünk. Alapfeltétel, hogy a fehérjéket azonos nitrogén- és energiatartalmú tápban hasonlítsuk össze. Anyagcsere-kísérletben a kazein nem tekinthető 100%-os biológiai értékűnek a patkány számára, ezért a metionindeficitet 5% DL-metioninnal célszerű pótolni.

Az endogénnitrogén-ürítés mértékének meghatározására a nitrogénmentes patkánydiétát 4% liofilezett, majd extrahált tojásporral egészítik ki, ami 100% biológiai értékűnek tekinthető. A diétás tápot fogyasztó állatok nitrogénürítési adatait endogénnitrogén-ürítésként vesszük figyelembe.

Sorozatvizsgálatokra 60–70 g-os, konzolidált tenyészetből származó, hím albínó patkányok a legmegfelelőbbek, melyeket kimosott és fertőtlenített anyagcseredobozokban kell elhelyezni. A kísérletet meg kell előznie egy 4–6 napos szoktatási idő, melynek folyamán az állatok a korcsoportjuknak megfelelő patkánytápot fogyasztják. Ezalatt az állatok helyüket megszokják, és az extrém gyarapodású egyedek a kísérletből kizárhatók. A kísérleti csoportok összeállításánál ügyelni kell arra, hogy a csoportok átlagos testtömege között 5 g-nál nagyobb eltérés ne legyen.

A kísérleti csoportok végleges kialakítása és betelepítése után az állatok az előszakaszban szokják meg helyüket és a takarmányt. Öt nap alatt az állatok általában hozzászoknak a körülményekhez, melynek következtében stabil anyagcsere-állapot alakul ki. A kísérleti szakasz minimálisan 5–7 napot tesz ki, mely a tömeg mérésével, a vizelet- és a bélsárgyűjtés megindításával kezdődik. Ez idő alatt kellő mennyiségű vizelet és bélsár gyűlik össze a megfelelő analízishez még a jól emészthető táp esetében is. Hosszabb kísérleti időtartam alatt a napi felvétel és ürítés kiegyenlítődik, ezáltal a módszer pontossága javul. 21 napnál hosszabb kísérlet beállítása nem indokolt, mert az anyagcsereketrec körülményei az állatokat rendkívüli módon igénybe veheti. A kísérlet a tömeg mérésével fejeződik be.

A nitrogénmérleg (biológiai érték) meghatározásához kontrollállatok elvileg nem szükségesek, ennek ellenére a tesztfehérjét fogyasztó csoportokkal párhuzamosan szokásos referenciafehérjét fogyasztó csoportot is indítani, mert ezek eredményeit az irodalmi adatokhoz hasonlítva a vizsgálati eredmény realitását bírálhatjuk el. Az endogénnitrogén-ürítés meghatározására tojásport fogyasztó csoportot állítanak be.

A kísérlet alatt az ürített vizeletet és bélsarat egyidejűleg gyűjtik. Amennyiben a nitrogénmérleg alakulásának dinamikája nem érdekel bennünket, akkor elegendő a vizeletet és a bélsarat a kísérlet indulásától a befejezéséig ugyanabban az edényben gyűjteni. Az ammóniavesztés megakadályozása miatt a vizeletet 10%-os kénsavban fogják fel, a bélsarat pedig naponként kétszer 10%-os hangyasavval permetezik be. A kísérleti szakasz végén a bélsarat mérik, homogénezik, és aliquot részből meghatározzák az aminosav-összetételt és a nitrogéntartalmat.

Az ismert nedvességű és nitrogéntartalmú patkánytáp mennyiségéből és az el nem fogyasztott maradék tömegéből, annak szárazanyag-tartalmából az átlagos napi takarmányfelvétel és a napi nitrogénfelvétel számolható. A kísérleti időszak alatt ürített bélsár és vizelet mennyiségéből, valamint a nitrogéntartalomból pedig az átlagos napi nitrogénürítés a bélsárban és a vizeletben. Az átlagos napi nitrogénfelvételtől levonva a bélsárral és a vizelettel ürített nitrogén mennyiségét, a napi átlagos nitrogén-visszatartás (nitrogénmérleg, nitrogénretenció) kikalkulálható. A kísérleti állatok végső és a főszakasz megindításakor mért tömegének különbségéből a teljes és a napi átlagos gyarapodás számítható ki. Endogénnitrogén-vesztésnek (a bélsárban és a vizeletben ürített nitrogén) a 4% tojásfehérjét fogyasztó csoport bélsárral és vizelettel ürített átlagos napi nitrogénmennyiségét tekintjük. A bélsárral ürített nitrogén mennyisége a napi átlagos nitrogénfelvétel százalékában kifejezve a látványos nitrogénemészthetőséget adja meg. A valódi nitrogénemészthetőséghez akkor jutunk, ha a bélsárral ürített napi nitrogénmennyiséget a napi endogénnitrogén-vesztés mennyiségével csökkentjük, és ezt a nitrogénfelvétel százalékában fejezzük ki.

A biológiai érték megállapításakor a testfehérjébe épült táplálékfehérje mennyiségét a megemésztett és felszívódott fehérjemennyiség arányában fejezzük ki, a következő képlet szerint:

$$\text{biológiai érték} = \frac{\text{testben hasznosított fehérje}}{\text{felszívódott fehérje}} \cdot 100.$$

A biológiai érték nem fejezi ki teljes mértékben a fehérje értékét, ugyanis a szervezet a beépített fehérje egy részét az anyagcserével együtt járó fehérjebontásra is felhasználja, és a testfehérjét a bélcsatorna szekréciós tevékenysége is igényli. Ez abból is látható, hogy a nitrogénmentes diétán tartott állatok vizeletükben és bélsarukban is ürítenek nitrogént. Ebből következően a szervezet a táplálékfehérje nitrogénjéből többet használ fel annál, mint amennyi a nitrogénretenció alapján számítható.

A többlet az endogén-nitrogén-ürítés mennyiségével egyenlő. Az ismertetett módszerben az endogén-nitrogén-vesztés mértékét az extrahált tojásport fogyasztó csoport ürítése adja, melynek következtében a biológiai érték a következő képlettel számolható ki:

$$\text{BV (\%)} = \frac{I - (F - F_k) - (U - U_k)}{I - (F - F_k)} \cdot 100,$$

ahol:

- I = az átlagosan elfogyasztott napi fehérjenitrogén mennyisége,
- F = az átlagos napi nitrogénürítés a tesztfehérjét fogyasztó állatok bélsárában,
- F_k = a 4% tojásport fogyasztó csoport átlagos napi nitrogénürítése a bélsárban,
- U = az átlagos napi nitrogénürítés a tesztfehérjét fogyasztó állatok vizeletében,
- U_k = a 4% tojásport fogyasztó csoport átlagos napi nitrogénürítése a bélsárban.

A nitrogénfelvétel és -ürítés különbözetéből adódó nitrogénretencióból a produktív fehérjeértékesülés (PPW) is kiszámítható, a következők szerint:

$$\text{PPW} = \frac{\text{nitrogénretenció}}{\text{nitrogénfelvétel}} \cdot 100.$$

A kísérleti szakasz befejezésekor az állatok teljes testanalízisével a nitrogén-visszatartás mértéke is meghatározható, és ebből az NPU is kiszámítható. Ha a főszakaszt legalább 10–20 napig végezzük, a tömeggyarapodás alapján a PER is meghatározható, bár ez az érték az anyagcsere-dobozokban tartott állatoknál rendszerint kisebb a standard módszerhez képest. A kísérleti csoportokon belül a napi gyarapodást, a nitrogénretenciót, az emészthetőséget, a biológiai értéket, valamint bármi egyéb mutatót egyedenként kell számolni, és a csoportokra jellemző átlagot kell megadni, mert az egyedi mérési adatokból lehetőség adódik statisztikai elemzésre is.

A nitrogénmérleg meghatározására elvégzett kísérletekből az alábbi eredményeket kapjuk. A spontán tápfelvétel mértékéből a fehérjehordozó organoleptikus tulajdonságaira lehet következtetni, az elvárható fogyasztáshoz képest 20–30% relatív csökkenés a patkány számára kedvezőtlen tulajdonságokra utal. Az antinutritív, toxikus kísérőanyagok hatására már az előtetési szakaszban csökken a napi takarmányfelvétel.

Az extrém rossz aminosav-összetétel okozta inbalansz esetében az állat csekély takarmányfelvétellel igyekszik saját testfehérjéinek bontását megakadályozni, kevés tápanyagfelvétel esetén viszont az állat energetikai célokra viszonylag több fehérjét fog felhasználni.

Sok nitrogén ürül a bélsárban akkor, ha a testfehérje emészthetősége rossz, vagy ha az endogénnitrogén-veszteség antinutritív anyagok, tripszingátlók, toxinok stb. hatására fokozott. A vizelet nitrogéntartalma megnő akkor, ha a testfehérje aminosav-összetétele az állat igényeinek nem felel meg, ezért viszonylag nagy mennyiségű aminosav dezaminálódik. Nő a vizelet nitrogéntartalma fehérjebontással járó toxikus vagy lázas állapot esetében, valamint alimentáris eredetű veseelégtelenségkor fehérjék és peptidek is ürülhetnek a vizeletben.

A nitrogénretenció, a -gyarapodás vagy a -csökkenés együtt jelzi, hogy a testfehérje vagy annak kombinációja mennyire alkalmas a modellállat testállományának gyarapítására, tekintet nélkül a hasznosulás mennyiségére. 65–95 g-os hím patkányoknál az optimális tömeggyarapodás esetén 1 g tömeggyarapodás 36 mg nitrogénretencióval jár együtt. A tömegveszteség viszont a nitrogénveszteséggel csak laza kapcsolatot mutat, ugyanis 1 g tömegcsökkenés 1–8 mg nitrogén/g tömegcsökkenéshez vezet.

A látszólagos nitrogénemészthetőségi adatok lehetőséget adnak egy adott takarmányfeleség esetében a technológiai, agrotechnikai hatások nyomon követésére. Figyelemmel kell lenni arra, hogy extrém kevés fehérjebevitelkor a valódi emészthetőség relatíve javul, így *a különböző fehérjék csak azonos nitrogénbevitel esetén hasonlíthatók össze*. A valódi nitrogénemészthetőség értékelésekor figyelemmel kell lenni arra, hogy az egyes növényi fehérjék és antinutritív anyagok az endogénnitrogén-ürítést fokozzák, és így az emészthetőséget megváltoztatják. Ebben az esetben a valóságosnál lényegesen rosszabb valódi emészthetőséggel számolunk, holott a fehérje valójában jól emészthető. A valódi nitrogénemészthetőség emiatt csak hipotetikus értékű, és inkább csak azonos minőségű fehérjehordozók összehasonlítására alkalmas.

A nitrogénmérleg adataiból számolt biológiai érték (BV) főként a modellállat aminosavigényeihez viszonyított takarmányfehérje alkalmaságát méri, mely értéket a fehérjehordozó antinutritív, toxikus, illetve étrendi hatása is befolyásolhatja.

A módszer az alábbi hibákkal terhelt. Rossz minőségű fehérjék esetén, amennyiben a nitrogénbeépítés az ürítéshez képest nagyon kevés, a nitrogéndeficit a számított retenciót jelentősen terheli. Ilyen esetben

nitrogénretenció mutatható ki olyankor is, amikor az állat tömege stagnál, esetleg kismértékben még csökken is. A módszer pontosságát még befolyásolhatja az is, ha a vizelet és a bélsár szétválasztása nem tökéletes, valamint az, ha a vizelet felfogására szolgáló kénsavas edények az állatház levegőjéből jelentős mennyiségű ammóniát nyelnek el.

A csekély takarmányfelvétel is jelentős befolyással lehet a nitrogénmérlegi adatokra, melyet az állatok energiahiánya okoz, ekkor ugyanis a metabolikus fehérjeleépítés fokozódik. Ez a létfenntartással járó fehérjeleépítés az aminosav-inbalansz által produkált nitrogéntartalmú anyagoktól nem választható szét. Viszonylag jelentős hibát okoz az is, ha kevés nitrogént fogyaszt az állat, mert ilyenkor bizonytalanná válik az endogénnitrogén-ürítés mennyisége.

Az alacsonyabb hőmérséklet ugyancsak befolyásolja az állatok anyagforgalmát, hisz ilyenkor a testhőmérséklet fenntartására több energiát igényel az állat. A nitrogénanyagcsere-vizsgálatoknál mindig hibaként jelentkezik, hogy az endogénnitrogén-ürítést a referenciafehérjét fogyasztó csoport nitrogénürítésével vesszük számításba. A különböző fehérjehordozók összehasonlítása során viszont kiderült, hogy – különösen csekély nitrogén bevitelkor – az endogénnitrogén-veszteség függ a fehérjehordozó minőségétől.

7.5.9.3. A nitrogénmérleg meghatározása sertésekkel

A sertés nitrogénmérlegének mérésén alapuló fehérjeminősítést 3,5 kg-os kanmalacokkal, illetve 18–20 kg-os ártányokkal is végezhetjük. A kísérlet szervezése, a gyakorlati alapfeltételek teljesen azonosak a 7.5.1.2. pontban leírt, a fehérjehatékonysági arány meghatározása során alkalmazottakkal. Az állatokat a kísérlet során egyedileg olyan ketrecekben kell elhelyezni, amelyekben a takarmány maradéka visszamérhető, a vizelet és a bélsár külön-külön gyűjthető, és amelyben az állatok mozgása (megfordulása) korlátozott. Tömegmérésre a betelepítéskor, valamint az előszakasz és a kísérleti szakasz végén van szükség. Naponta kell mérni a takarmányt, gyűjteni, majd homogenizálni a vizeletet és a bélsárt, és a kémiai analízis is jelentős elfoglaltságot jelent.

A kísérletben kórokozótól mentes állományból származó malacokat, kansüldőket, illetve ártányokat állítunk be, melyeknél a vizelet és a bélsár külön gyűjtése könnyen megvalósítható. Az állatokat anyagcsereketreche helyezzük, melyeknek alkalmazkodniuk kell a sertések

növekvő méreteihez. A meghatározás sarokpontja, hogy pontosan ismerjük a takarmányadagokat, az el nem fogyasztott maradékokat és a kiszórt mennyiségeket. A táp fehérjetartalmának igazodni kell a kísérleti állatok testtömegéhez, a gyakorlati takarmányozásban szokásos szinthez, de lehet egészen kicsi, 10% körüli is. Nagyobb fehérjekoncentráció esetén jobban közelítjük a gyakorlati körülményeket, de ilyenkor az állatok a fehérje egy részét energetikai célokra dezaminálják, ami a módszer érzékenységét rontja. Kis fehérjekoncentrációjú táp etetésekor a fehérje biológiai értékében beállt finom változások is jól mutatkoznak, sőt a komplettálási hatások is érzékelhetők. A tápnak természetesen megfelelő mennyiségű energiát, valamint ásványi anyagokat és vitaminokat kell tartalmaznia.

A napi gyűjtésből származó mintákat hűtőszekrényben, lezárva kell tárolni. Az analíziskor a mintákat fel kell olvasztani, utána homogénezzni, majd a vizelet és a bélsár nitrogéntartalmát az 5.2.2. fejezetben ismertettek szerint kell meghatározni.

A nitrogénmérleg felvétele során kapott adatokat az előző fejezetben (7.5.9.2.) leírtak szerint kell feldolgozni. Figyelembe kell venni, hogy az anyagcsere-kísérlet alatt volt-e tömeggyarapodás, és hogy ennek nagysága hogyan viszonyul a gyakorlat körülményei között megkívánt tömeggyarapodáshoz képest. Stagnáló állatok a fehérjék minőségét a növekvő állatok fehérjeigényéhez képest túlértékelik. Az elvégzett kísérletek lehetővé teszik a fehérje látszólagos emészthetőségének, valamint az egyes aminosavak emészthetőségének meghatározását.

Az előző fejezetben tárgyalt hibaforrások a sertéssel végzett kísérleteknél is jelentkeznek. A sertésnél az emésztőszervi és légzőszervi betegségek a kísérlet sikerét még inkább befolyásolják, az antibiotikumok és a betegségek kivédésére adagolt preventív szerek viszont a fehérje-hasznosítást fokozzák.

7.5.10. A fehérje hasznosíthatólizin-tartalmának meghatározása patkánynövekedési teszttel

A meghatározás során *lizinszegény alaptápot növekvő mennyiségű lizinnel kiegészítve a patkányok a hasznosíthatólizin-tartalomtól függően növekszenek*. Ha az alaptáphoz a tesztfehérjét olyan mennyiségben keverjük, hogy a bevitt lizintartalom a standardsorozat tartományában legyen, a növekedési értékből a standardgörbéhez történő hasonlítással a tesztfehérje hasznosíthatólizin-tartalma kiszámítható.

Az alaptáp – melyben lizinhiányos fehérjeként búzasikért kell alkalmazni – összetétele a következő: búzasikér 20,0%, L-hisztidin·HCl·H₂O 0,2%, DL-metionin 0,2%, DL-treonin 0,2%, DL-triptofán 0,05%, ásványianyag-keverék 4,0%, vitaminkeverék 0,5%, kukoricaolaj 5%, és az egészet búzakeményítővel 100%-ra egészítjük ki. Az ásványianyag- és a vitaminkeverék összetétele olyan legyen, hogy a növekvő patkányok szükségleteit optimálisan kielégítse. Lizinhiányos alapfehérjeként a búzasikér helyett zein, búzakeményítő helyett pedig kukoricakeményítő is alkalmazható.

Az alaptápot 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,8 és 1,0% L-lizinnel egészítjük ki, ami a standardgörbe felvételéhez szolgáltat adatokat. A vizsgálandó fehérjét összeslizin-tartalma alapján, a keményítőt részben helyettesítve, keverjük a tápba olyan koncentrációban, hogy a bevitt lizin a standardgörbe tartományába essék.

Az eljárás során a választott hím patkányokat öt-öt, lehetőleg azonos testtömegű állatot tartalmazó csoportokba osztjuk. A 44–45 g átlagos induláskori tömegű állatokat egyedileg anyagcsereketrecekbe helyezzük, a tápot és a vizet három héten át ad libitum adagoljuk, a tápfogyasztást és a gyarapodást pedig hetenként mérjük, majd a kísérlet végén meghatározzuk az állatok nitrogéntartalmát.

A különböző lizindózisok hatását a tömeggyarapodás és a nitrogénretenció alapján az alábbiak szerint számítjuk ki. A tömeggyarapodást (g) vagy a nitrogéntartalom növekedését (g) ábrázoljuk a lizinkiegészítés százalékanak függvényében, vagy a tömeggyarapodás/100 g elfogyasztott táp vagy a nitrogéntartalom-gyarapodás/100 g elfogyasztott tápértékeket ábrázoljuk a lizinkiegészítés százalékanak függvényében, vagy a tömeggyarapodást vagy a nitrogéntartalom-gyarapodást az elfogyasztott hasznosítható lizin-mennyiség (g) függvényében. Az elfogyasztott hasznosítható lizin-mennyiséget megkapjuk, ha az összeslizin-tartalmat 0,8-del megszorozzuk. A hasznosítható lizin-tartalmat a tesztfehérje esetében úgy kapjuk meg, hogy a tesztfehérje által kiváltott értékeket a standardgörbéhez hasonlítjuk, majd ebből levonjuk az alaptáp hasznosítható lizin-tartalmát. Ha a hasznosítható lizin-tartalmat az összeslizin százalékában akarjuk kifejezni, akkor meg kell határozni a tesztfehérje összeslizin-tartalmát is.

A hasznosítható lizin mennyiségét az elfogyasztott lizinmennyiség és a bélsár lizintartalmának mérése alapján is ki lehet számítani. A visszatartás mérésén alapuló módszer munkaigényes, és nagyobb szórást ad a növekedési teszthez képest. A patkányok növekedésének

jellemzésére NPU-, vagy NPR-jellegű indexet is használhatunk, de ekkor egy fehérjementes tápot fogyasztó kontrollcsoportot is kísérletbe kell állítani. Az alaptápanyagban a sikért annak aminosav-összetételéhez hasonló lizinmentes aminosav-keverékkel is helyettesíthetjük, de ilyenkor a patkányokat az aminosavtápanyaghoz kell szoktatni.

7.5.11. A fehérjék hasznosítható lizin-tartalmának meghatározása csirkenövekedési teszttel

Az eljárás során *napos, szexuál kakaócsibék tömeggyarapodási értékeit mérjük az elfogyasztott hasznosítható lizin-tartalom hatására*. A kivitelezés során a napos kakaócsibéket 7–10 napig kis lizintartalmú táppal előneveljük, majd testtömegüket meghatározva azonos átlagos testtömegű, tíz-tíz állatot tartalmazó csoportokat alakítunk ki úgy, hogy a csoportokon belül minimális legyen a tömegeltérés. A meghatározáshoz kristályos aminosav-tápanyagokra, standard tápanyagokra, illetve teszttápanyagokra van szükség. A kristályos aminosav-tápanyagok a mérési tartomány megállapítására, a standard tápanyagok az elfogyasztott hasznosítható lizin-mennyiség és a tömeggyarapodás összefüggésének kiszámításához, a teszttápanyagok pedig a vizsgálandó fehérje hasznosítható lizin-tartalmának megállapításához szükségesek. A kristályos aminosav-tápanyagok összetétele a következő: földidíóolaj 3,5%, zabdara 8,0%, L-arginin 1,23%, L-hisztidin 0,34%, L-lizin 0,44–1,06%, L-triptofán 0,19%, L-fenil-alanin 0,62%, L-tirozin 0,56%, L-cisztein 0,50%, DL-metionin 0,44%, L-treonin 0,79%, L-leucin 1,47%, L-izoleucin 0,75%, L-valin 1,02%, glicin 1,43%, L-prolin 0,25%, L-glutaminsav 17,55–18,54%, valamint vitamin- és ásványianyag-premix, majd az egész kiegészítve kukoricakeményítővel 100%-ra. A tápanyag nitrogéntartalma 3,42%, metabolizálható energiatartalma pedig 12,77 MJ. A standard tápanyagok összetétele az alábbi: kukoricasikér 30,0%, földidíóolaj 3,5%, zabdara 10,0%, L-arginin 0,70%, L-lizin 0,25–0,70%, L-triptofán 0,10%, L-treonin 0,12%, L-valin 0,40%, glicin 1,00%, L-glutaminsav 0,0–0,76%, és az egészet 100%-ra egészítik ki vitamin- és ásványianyag-premixszel, valamint kukoricakeményítővel. A tápanyag nitrogéntartalma 3,54%, metabolizálható energiatartalma pedig 11,83 MJ. A teszttápanyagok összetétele a következő: kukoricasikér 23,5 és 19,2%, tesztfehérje 5,8 és 9,0%, földidíóolaj 3,3 és 3,1%, zabdara 10,0%, L-arginin 0,70%, L-triptofán 0,10%, L-treonin 0,12%, L-valin 0,40%, glicin 1,00%, amelyet vitamin- és ásványianyag-premixszel, valamint kukoricakeményítővel

100%-ra egészítenek ki. A tesztáp nitrogéntartalma 3,54%, metabolizálható energiatartalma pedig 11,89 és 11,93 MJ.

A standardtápok lizinhiányos alapfehérjét tartalmaznak, melyeket növekvő mennyiségű L-lizinnel egészítünk ki. A tesztápok abban térnek el a standardtápoktól, hogy a hasznosítható lizin mérési tartományán belül két különböző koncentrációban tartalmazzák a tesztfehérjét, amelyet az alapfehérje terhére keverünk a tápba. A meghatározás során megállapítjuk, hogy a tápokban milyen lizinszintekre van szükség ahhoz, hogy az elfogyasztott hasznosítható lizin-mennyiség és a gyarapodás között lineáris összefüggést kapjunk. Ehhez kristályos aminosav-tápokot használunk, amelyekbe növekvő koncentrációban lizint keverünk. A tapasztalatok szerint a lizin tömegegységére vonatkoztatott gyarapodás állandó, ha a lizin a táp 0,6–08%-át tartalmazza. Ebben az esetben az elfogyasztott lizinmennyiség (mg/nap) és a tömeggyarapodás között (g/nap) lineáris a kapcsolat. Ezt követően a kristályos aminosav-tápokot a standardgörbe felvételéhez standardtáppokkal helyettesítjük, amelyekben az aminosavak nagy részét a lizinhiányos alapfehérje képezi. Az alapfehérje hasznosítható lizin-tartalmát a tesztfehérjéhez hasonlóan határozzuk meg. A tesztfehérjét két különböző koncentrációban keverjük az alapfehérje terhére a tesztápba. A tesztfehérje összes lizintartalmának ismeretében a táp lizintartalmát úgy állítjuk be, hogy az abba a tartományba essék, ahol az elfogyasztott hasznosítható lizin-mennyiség és a tömeggyarapodás lineáris összefüggést mutat. A standard- és tesztápokot egy időben etetve, mérjük a tömeggyarapodást és a tápfogyasztást.

A standardtáppokkal elfogyasztott hasznosítható lizin-tartalom függvényében ábrázoljuk a tömeggyarapodást, majd kiszámítjuk a regressziós egyenletet és a szórást. A tesztápokot fogyasztó csirkék gyarapodásának adataiból a görbéről leolvassuk az elfogyasztott hasznosítható lizin-mennyiségét. Ebből levonjuk az alapfehérjével elfogyasztott hasznosítható lizin-mennyiséget, amelyet a tápfogyasztás függvényében tudunk kiszámolni. Az eljárást ezt követően egy másik tesztfehérje-koncentrációnál is elvégezzük, melynek során ellenőrizzük a fehérjekoncentrációnak az eredményekre gyakorolt hatását. Ha a két érték szignifikánsan különbözik, a meghatározás nem specifikus, vagy az eljárást meg kell ismételni.

Az ismertett elvek alapján a hasznosítható metionin-tartalom is meghatározható, ugyanis 15–55 mg/nap elfogyasztott metionin tartományban a tömeggyarapodás (g/nap) lineárisan nő. A hasznosítható metionin-tartalom meghatározásakor alapfehérjeként földimogyoróliszt

vagy szójaliszt használható. Ha a tesztápot oxidált kazeinnel egészítjük ki, a mérési tartomány kiterjeszhető.

7.5.12. A fehérjék hasznosíthatómetionin-tartalmának meghatározása csirke-növekedési tesztel

A metioninban szegény alaptápot növekvő mennyiségű metioninnal kiegészítve a tápot fogyasztó állatok tömege a metionintartalommal arányosan növekszik. A tesztfehérjét növekvő mennyiségben keverve az alaptáphoz, a kapott tömeggyarapodási értékekből, a standard növekedési görbe segítségével, a tesztfehérje hasznosíthatómetionin-tartalma kiszámítható.

Az alaptápban metioninhiányos fehérjeként földidíólisztet célszerű használni, mert a szójaliszt nagyobb metionintartalma a mérési tartományt csökkenti. A tesztfehérjét a kukoricakeményítő, valamint a kalcium-karbonát és a kalcium-hidrogén-foszfát terhére keverjük a tápba úgy, hogy a táp Ca- és P-tartalma ne változzon. Az alaptáp összetétele az alábbi: földidíóliszt 40,0%, tejsavópor 5,0%, kukoricaolaj 5,0%, kolin-klorid 0,15%, inozit 0,10%, vitaminkeverék 0,50%, ásványianyagkeverék 3,13%, kalcium-karbonát 2,0%, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 2,50%, glicin 0,20%, L-lizin·HCl 0,40%, L-ciszin 0,20%, és az egésztest kukoricakeményítővel 100%-ra egészítjük ki. A vitamin- és az ásványianyagkeverék olyan legyen, hogy a csirkék szükségleteit optimálisan kielégítse. A metionin standardot három (0,02%, 0,04% és 0,06%), a tesztfehérjét pedig két különböző koncentrációban keverjük be. Hallisztból 2 és 4%-ot, húsliszt esetében pedig, az alacsonyabb metionintartalom miatt, 4 és 8%-ot kell a tápba bekeverni.

A kísérlet során szexált, napos kakascibéket 10 napon át standard indítótápon tartunk, majd testtömegüket lemérjük. Ezt követően egy ketrecbe tíz állatot helyezünk, és minden kezelést két ketrecben végzünk. A kísérleti csoportok azonos tömegű állatait nyolc napig ad libitum etetjük, miközben a tömeggyarapodást és a takarmányfelhasználást feljegyezzük. A kísérlet során kiesett állatok által elfogyasztott tápmennyiséget ki kell vonni az összefogyasztásból. A kísérlet befejezésekor megszerkesztjük a növekedési görbéket, és a metioninkiegészítés függvényében ábrázoljuk a tömeggyarapodást. Kedvező esetben a mérési tartományban lineáris összefüggést kapunk, megállapíthatjuk a görbék hajlásszögét, és extrapolálhatunk a nulla metioninkiegészítésre. Amennyiben a standard- és a tesztgörbe tengelymetszete szignifikánsan

eltér, és amennyiben az alkalmazott dózis, valamint az általa kiváltott reakció (gyarapodás, takarmányhasznosítás) közötti kapcsolat nem lineáris, a mérési pontok regresszióanalízisét nem lineáris közelítéssel kell elvégezni. A tesztfehérjék esetén kapott növekedési értékekből a standardgörbéhez történő hasonlításal a hasznosítható metionin-tartalom meghatározható.

Pontosabb a meghatározás, ha a takarmányhasznosítást ábrázoljuk, a tömeggyarapodás helyett, a metioninkiegészítés függvényében. A módszer a 0,015–0,020 g hasznosítható metionin/100 g táp értéknél nagyobb különbségeket, mintegy $\pm 10\%$ hibával, már biztonsággal jelez.

7.5.13. A fehérje hasznosítható triptofán-tartalmának meghatározása patkánynövekedési teszttel

Triptofánhiányos alaptápot növekvő mennyiségű L-triptofánnal kiegészítve a patkányok a táp hasznosítható triptofán-tartalmával arányos tömeggyarapodást mutatnak. Ha az alaptápot a triptofán helyett a vizsgálandó fehérjével egészítjük ki, a kémiai módszerekkel meghatározott triptofántartalom alapján a kapott tömeggyarapodásból, a standardgörbére történő interpolálással, a hasznosítható triptofán-tartalom kiszámítható. E módszerrel a patkánynövekedési teszttel meghatározott triptofántartalmat a kémiai módszerrel meghatározott triptofántartalom százalékában fejezzük ki.

A kísérlethez 30–40 g-os, kellően homogén törzsből választott hímivarú patkányokat használunk. Az állatokat drótháló aljú ketrecben, egyedileg helyezük el. Az alaptáp összetétele a következő: kazein 5%, zselatin 12%, zein 10%, L-lizin 0,2%, L-hisztidin 0,15%, DL-metionin 0,3%, DL-treonin 0,2%, ásványianyag-keverék 4%, napraforgóolaj 5%, és az egészet kukoricakeményítővel 100%-ra egészítjük ki. Az alaptápot vitaminokkal úgy kell kiegészíteni, hogy az a patkányok vitamin-szükségletét optimálisan kielégítse. Ebben az összeállításban az alaptáp triptofántartalma 0,08%, a standardtápok összeállítása során a vitaminokkal kiegészített alaptápot 0,01% és 0,02% L-triptofánnal, vagy 0,02% és 0,04% DL-triptofánnal egészítjük ki. A tesztápok készítése során az alaptáphoz 0,01% és 0,02% L-triptofántartalomnak megfelelő tesztfehérjét adunk. A kísérlet három hétig tart, melynek során mérjük az állatok tömeggyarapodását. A standardtáppal kapott tömeggyarapodás értékeit a triptofánkiegészítés (0,0; 0,01; 0,02% L-triptofán) függvényében ábrázoljuk, majd regresszióanalízissel meghatározzuk a görbe

hajlásszögét. Ugyanilyen módon kiszámoljuk a hajlásszöget a tesztfehérje esetében is, majd megállapítjuk, hogy a tesztgörbe hajlásszöge hány százaléka a standardgörbéének. A módszer alkalmas fehérjekoncentrátumok hasznosíthatótriptofán-tartalmának meghatározására. Segítségével megállapították, hogy a triptofán hasznosíthatósága a tojásfehérjében, a tejporban, a szójalisztben és a szezámlesztben jó, de a hallisztben és a takarmányborsóban gyenge.

AZ ÉLELMISZER-FEHÉRJÉK KÁROSODÁSA

8.1. A víztartalom hatása a fehérjék károsodására

Az élelmiszerekben lévő víz különböző módon kapcsolódhat a szárazanyaghoz; a kötés módja alapján megkülönböztetünk kémiaileg, fizikai-kémiaileg és mechanikailag kötött vizet. A *kémiai vízmegkötés* elsősorban kémiai reakciók eredményeként, másodsorban kristályosodáskor, kristályvízként jön létre. Ez a típusú víz a hidratált anyaghoz fővegyértékkel vagy mellékvegyértékkel kapcsolódik, ezért *a kötés rendkívül erős*. Az élelmiszer-ipari nyersanyagokban a *fizikai-kémiaileg kötött víz* fordul elő leggyakrabban. Ebben a vízkötésben az arányok nem szigorúan meghatározottak, a víz mennyisége a körülmények változásától függően különböző lehet. A *fizikai-kémiaileg kötött víz adszorpciós kötéssel vagy ozmózisos kötéssel kapcsolódhat a szárazanyaghoz*. Az adszorpciós vizet az élelmiszerek hidrophil kolloidjai kötik meg, aminek során hőfejlődéssel járó hidratburok alakul ki. Az ozmózisos vízmegkötés olyan élelmiszerekre jellemző, amelyek különböző molekulatömegű frakciók keverékei. A nagymolekulájú részek vízben nem oldhatók, a kis molekulájúak viszont általában oldódnak. Víz hatására a nagymolekulájú alkotórészek által határolt mikroüregekben a kismolekulájú frakciók oldata alakul ki, aminek ozmózisnyomása nagyobb, mint a külső folyadéké. Az ozmózisos nyomáskülönbség hatására víz diffundál be ezekbe az üregekbe egészen addig, amíg a külső és a belső nyomás ki nem egyenlítődik. Az előbbi folyamat során duzzadás következik be, amely lehet korlátozott akkor, ha a mikroüregeket határoló összekapcsoló erők elég nagyok; korlátlan duzzadásról akkor beszélünk, ha az összekapcsoló erőket legyőzve az anyag teljesen feloldódik.

Mechanikailag kötött víz esetében a kötés arányai meghatározatlanok. A *nedvesség szerkezeti vízként, kapilláris nedvességként vagy egyszerű nedvesítési vízként lehet jelen*. A szerkezeti vizet az élelmiszer mikroüreges szerkezete tartja körülzárva, mozgékonyságától nagymértékben megfosztva. A kapilláris erőkkel megkötött víz a táplálék 10^{-5}

cm-es nagyságrendhez közelálló részeiben található. A leggyengébb kötési forma a nedvesítési víz, ahol a vízmolekulák adhézióval tapadnak az élelmiszer felületére.

Az élelmiszer-technológiában általában elegendő, ha a *víztartalom szabad és kötött mennyiségét* ismerik. Szabad víznek a víztartalom azon részét tekintjük, amely oldóképességében és mozgékonyságában nincs korlátozva. A kötött víz viszont mozgásában korlátozott, és nem képes annyi oldandó anyagot befogadni, mint a tiszta víz.

Az élelmiszer-ipari nyersanyagok és a különböző élelmiszerek víz-tartalma a tároláskor, illetve feldolgozáskor rendszerint megváltozik. *Víztartalom-változást* előidézhethet mechanikai hatás (préselés, centrifugálás), víz párologhat el a táplálékból, ha azt olyan levegőben tároljuk, amelynek relatív páratartalma nincs egyensúlyban az anyag víztartalmával. Víz távozik melegítés hatására és fagyasztáskor, a jégkiválás során is. A víztartalom kéméletes eltávolításának ma még kissé drága módja a liofilezés vagy fagyasztva szárítás, melynek során a szárítandó anyagot $-35 - -170$ °C-ra lehűtik, majd a víztartalmat nagy vákuumban elpárologtatják, szublimálják.

Zárt rendszeren belül az élelmiszer nedvességtartalma és a környező levegő páratartalma között bizonyos idő elteltével egyensúlyi állapot alakul ki. Ennek során vagy az élelmiszerben lévő víz egy része párolog el, vagy az élelmiszer vesz fel vizet a környező levegő páratartalmából. A kialakuló egyensúlyi állapot adott hőmérsékleten jellemző az élelmiszere. A rendszerhez tartozó levegő páratartalmát ekkor egyensúlyi abszolút páratartalomnak, az élelmiszer nedvességtartalmát pedig egyensúlyi nedvességtartalomnak nevezzük. Ha a páratartalmat az adott hőmérsékletekhez tartozó telített páratartalomhoz viszonyítjuk, akkor megkapjuk az *egyensúlyi relatív páratartalmat* (ERP).

Az élelmiszerek vízállapotát egy adott hőmérsékleten a *vízaktivitással* is szokás jellemezni, ami az egyensúlyi relatív páratartalom századrésze, ezért értéke 0 és 1 között lehet.

$$a_w = \frac{\text{ERP}}{100},$$

ahol: a_w = a vízaktivitás.

Az élelmiszerek vízaktivitását elsősorban nem víztartalmuk abszolút nagysága határozza meg, hanem a bennük lévő víz kötési módja, valamint a szabad és a kötött víz aránya. Általánosságban elmondható, hogy *minél nagyobb a kötött víz aránya az élelmiszerben, annál kisebb*

annak vízaktivitása. Az egyensúlyi nedvességtartalom adott légnedveség mellett jelentősen függ a hőmérséklettől. Általában az egyensúlyi nedvességtartalom minden relatív páratartalomnál a hőmérséklet emelkedésével csökken.

Az élelmiszer-ipari nyersanyagok tárolása, feldolgozása és a kész élelmiszerek forgalomba hozatala során ismernünk kell az anyag higroszkopikus tulajdonságait, mert a raktározás során az élelmiszerek nem kívánt mértékű beszáradása vagy nedvességfelvétele következhet be. A vízaktivitás az eltarthatóság szempontjából is nagyon jelentős, mert bizonyos vízaktivitás alatt a mikroorganizmusok nem tudnak az élelmiszerekben elszaporodni. A baktériumok 90%, az élesztők 80%, a penészek pedig 75% relatív légnedvességtartalmat igényelnek életműködésükhöz. Azt a nedvességtartalmat, amely fölött mikrobiológiai romlás következik be, kritikus nedvességtartalomnak, illetve kritikus vízaktivitásnak nevezzük. *A kritikus vízaktivitás változik a tárolás hőmérsékletével, általában azonban 0,6–0,9 közöttinek adódik. Az élelmiszerek 0,2–0,4 vízaktivitás mellett tárolhatók a legbiztonságosabban.*

Ha egy élelmiszer száraz légtérbe kerül, víztartalmának egy részét párolgás során elveszíti. Ekkor felületén szárazabb réteg alakul ki, amelynek nedvességtartalma különbözik a belső rétegektől. Ha az élelmiszereken belül ilyen nedvességkoncentrációbeli különbség (nedvességgradiens) alakul ki, akkor a nagyobb víztartalmú helyről *vízvándorlás* indul meg a szárazabb hely felé. Ha a mechanikusan és ozmotikusan kötött víz mennyisége nagy, a nedvesség folyadék alakjában vándorol, ezzel szemben kis nedvességeknél, amikor már csak adszorpciós víz van jelen, a vándorlás gőz alakjában történik. Ha valamilyen táplálék belsejében hőmérséklet-különbség jelentkezik, akkor a nedvesség az alacsonyabb hőmérsékletű hely felé vándorol, amely vízmozgást a nedvesség termodiffúziójának hívjuk. Az élelmiszereken belüli nedvességvándorlást mind a nedvességgradiens, mind a hőmérséklet-gradiens befolyásolja.

A rendellenes víztartalom a fehérjebomlás szempontjából azért káros, mert a mikrobiális romlás következtében elszaporodhatnak olyan mikroorganizmusok (anaerobok), melyek a fehérjéket és az aminosavakat nagyobb mennyiségben bontják ammónia keletkezése közben. A fehérjebontás során keletkezett ammónia, biogén aminok, kis szénatomszámú zsírsavak az organoleptikus tulajdonságokat rendkívüli mértékben rontják. Súlyosabb esetben az elszaporodó penészek szekunder metabolitjai, a mikotoxinok a fehérjehasznosítást már kis koncentrációban is nagymértékben csökkentik.

8.2. Az oxidáció hatása a fehérjék károsodására

A fehérjék elsősorban a levegő oxigéntartalma károsító hatásának vannak kitéve, az élelmiszerekben azonban előfordulhatnak olyan komponensek is, amelyek önmaguk könnyen oxidálódva elősegítik az aminosavak, fehérjék oxidációját is. Amennyiben a tárolás és a feldolgozás szobahőmérsékleten történik, az oxidatív hatás speciális esetektől eltekintve csekély lehet, magasabb hőmérsékleten azonban az oxidációnak, az oxidatív bomlásnak különböző formái fordulhatnak elő. A zsírok oxidációja során a zsírperoxidok, a hidroperoxidok, az izomerizációs termékek, a hasadás során keletkező aldehidek, ketonok, szabad zsírsavak, hidroxidok és oxidok jelentős hatással lehetnek a fehérjére, mint ahogy arról a következő fejezetekben részletesen szó lesz. Az oxidált lipidek hatással lehetnek a fehérje emészthetőségére, a hasznosítható aminosavak mennyiségét azonban csak kisebb mértékben csökkentik, hisz az oxidált lipidek csak másodlagos kötési erővel kapcsolódnak a fehérjemolekulához. A fehérje minősége szempontjából jelentős lehet a növényi polifenolok oxidációja polikinoidális vegyületekké, mert ezek a vegyületek a fehérjékhez irreverzibilisen kötődnek, megakadályozva, hogy a fehérjebontó enzimek a fehérjemolekula bizonyos részeihez hozzáférhessenek.

8.3. A hő hatása a fehérjék károsodására

Az élelmiszerek hőkezelése, a víztartalom csökkentése, a tárolhatóság javítása, az antinutritív anyagok inaktiválása és az ízhatás javítása céljából valamilyen speciális technológia tartozéka. Hőhatásnak van kitéve a fehérje az őrlési és granulálási műveletek során is. A hőhatás következménye függ attól, hogy a hő a fehérjét nedves vagy száraz közegben éri, hisz a két közegben a fehérjemolekula más szerkezetet vehet fel. A hőkezelés során a fehérje bomlásához vezető kémiai reakciók a hőmérséklet növekedésével, az *Arrhenius*-féle összefüggés szerint, rendkívüli mértékben felgyorsulnak, az enzimes reakciók viszont, az enzimek inaktiválódása következtében, gyakorlatilag leállnak.

8.3.1. A hőkezelés mechanizmusa

A hőkezelés során a fehérjemolekula térszerkezete megváltozhat, mert mind az elsődleges kötések (diszulfidhidak), mind a hidrogénhidak a hőkezelés során felszakadhatnak, ami a fehérje denaturációját okozza. A fehérje a denaturáció során primer szerkezetét megtartja, de a szekunder, terciér és kvaterner szerkezet irreverzibilis változást szenvedhet. A fehérjék denaturációja a proteolitikus enzimek szempontjából előnyös változás, hisz a *denaturáció következtében a fehérje hozzáférhetőbbé válik a proteolitikus enzimek számára*. Ennek során a fehérje emészthetősége nő, a denaturáció viszont káros a fehérje biológiai és funkcionális tulajdonságaira nézve. Így pl. a *laktotranszferrin* elveszíti vasszállító képességét, az immunglobulinok és a *lizozim* a szervezetet védő hatásukat, és elvész a fehérjék regulációs hatása is.

A denaturáció előnyös a fehérjetermészetű antinutritív anyagok (pl. tripszininhibitorok) hatásának megszüntetésére. Ha a hőkezelés során az elsődleges szerkezet, vagyis a peptidláncot alkotó aminosavak is megváltoznak, kémiai fehérjekárosodás jön létre. Ilyen változások pl. a szabad aminosavak reakciója oxocsoportokkal, a fehérjemolekulák között lejárló reakciók, a fehérjék oxidációja, vagy a fehérjék és lipidek oxidációja. Az ilyen típusú reakciók *az esszenciális aminosavak biológiai hasznosíthatóságát csökkentik*, kifejezett aminosav-veszteségek azonban csak nagyon erőteljes hőközlés következtében jönnek létre. A fehérjék hőkárosodásának tárgyalásakor praktikus szempontból célszerű megkülönböztetni az aminosavak oldalláncában és a fehérjemolekulák között lejátszódó reakciókat, ezen belül is az oxidatív átalakulásokat, a deszulfurizációt és az izomerizációt, valamint a fehérje-oldalláncok közötti kapcsolódásokat, és megkülönböztetett figyelmet kell fordítani a fehérjék és más komponensek közötti reakciókra. Ezek közül legjelentősebbek a fehérjék és a szénhidrátok közötti reakciók (*Maillard*-reakció), a fehérjék és a lipidek, a fehérjék és a polifenolok, valamint a fehérjék és a fitinsav között létrejövő kapcsolódások.

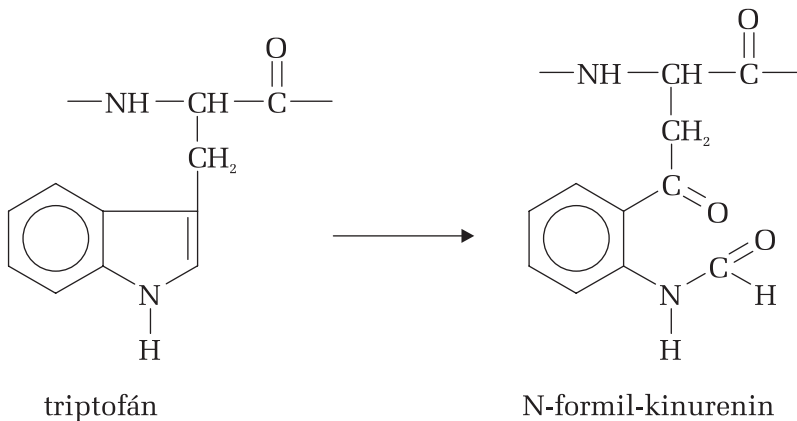
8.3.2. Az aminosavak oldalláncában és a fehérjemolekulák között lejátszódó reakciók

A fehérjék és a belőlük hidrolízissel előállított aminosavak sokfélesége, az aminosavak átalakulásának lehetséges újtjai rendkívül bonyolulttá teszik az élelmiszer-fehérjékben végbemenő változásokat. Ezen

változások közül elsősorban azokkal foglalkozunk, amelyek a fehérjéket alkotó aminosavak oldalláncaiban mennek végbe. Röviden foglalkozunk a fehérje-fehérje, a fehérje-lipid és a fehérje-szénhidrát kölcsönhatásokkal, valamint a fehérje és a fitinsav között lehetséges reakciókkal.

8.3.2.1. Oxidatív átalakulások

Az aminosav-oldalláncok egyszerű átalakulásai közül az *oxidatív átalakulások* talán a legjellemzőbbek. Erélyes oxidatív hatásra először a kéntartalmú aminosavak oxidációja következik be, amelynek során metioninból és ciszteinből metionin-szulfon és ciszteinsav keletkezik. Triptofánból az indolgyűrű hasadását követően N-formil-kinurenin keletkezhet (8.1. ábra), és oxidatív változást szenvedhet a tirozin, a szerin és a treonin is.

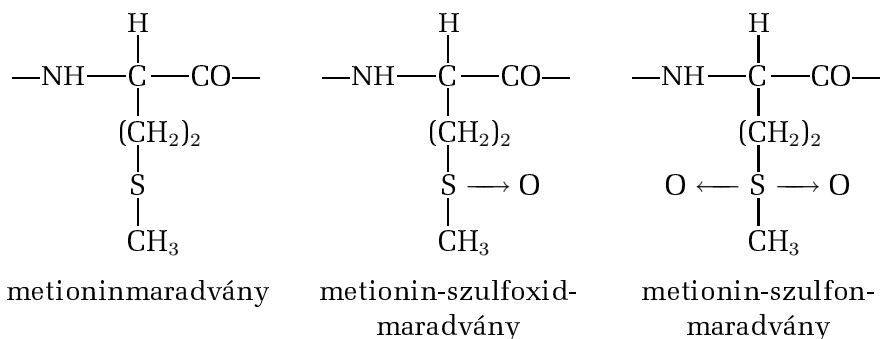


8.1. ábra. A triptofán oxidatív átalakulása N-formil-kinureninné

Az élelmiszer-ipari gyakorlatban az erélyesebb oxidatív szerek alkalmazása ritka. A hidrogén-peroxidot a tejiparban a sajtgyártás során, esetleg sütőipari célokra fehérjeizolátumok, illetve -koncentrátumok fehérítésére alkalmazzák, bár a peroxidok lisztjavító célú felhasználását ma már a legtöbb országban tiltják. Zsírsav-peroxidok a zsírtartalmú élelmiszerek természetes alkotórészei, amelyek a lipidek enzimes vagy nem enzimes oxidációja folyamán keletkeznek. Az oxidáló hatást levegő jelenlétében elősegíti még az ionizáló sugárzás is.

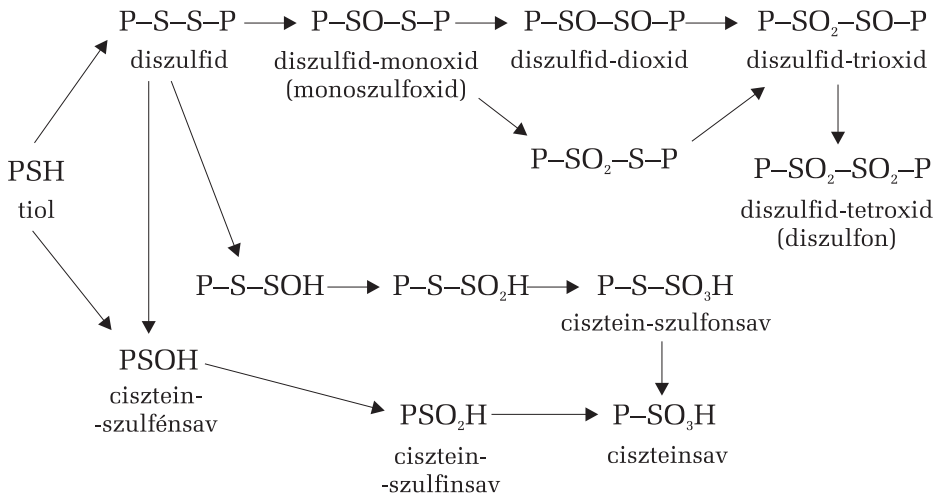
A hidrogén-peroxid a tejipari kezeléseknél szokásos körülmények (0,2 mol, 50 °C, 30 perc) mellett a kazein metioninját fokozatosan

metionin-szulfoxiddá oxidálja. A savófehérjék lényegesen érzékenyebbek az oxidációra, amelynek során metionin-, cisztein- és triptofántartalmuk is csökken. *Riboflavin* jelenlétében, amely *szenzibilizáló, színes vegyület, fotooxidáció léphet fel*, ilyenkor a kéntartalmú aminosavak mellett a triptofán, a tirozin és a hisztidin is károsodik. Négynél alacsonyabb pH-nál csak a metionin és a triptofán oxidálódik. Az ionizáló sugárzásos kezelés hatására levegő jelenlétében ugyancsak hidrogénperoxid keletkezik, ami a kéntartalmú aminosavak mennyiségének csökkenéséhez vezet. A γ -sugárzás a fehérjék radiolízisét eredményezheti, amelynek során a keletkező illó kénvegyületek a besugárzott tej, hús és zöldségfélék mellékízét okozzák. Oxidációra hajlamos lipidek jelenlétében kimutatható a metionin oxidációja szulfoxiddá, amely átalakulásban feltételezhetően a zsírsav-peroxid játszik szerepet. *Pirrol oxigenázok* hatására a triptofánból N-formil-kinurenin képződik, a tirozimból pedig a *polifenil-oxidázok* révén dihidroxi-fenil-alanin keletkezik. A kéntartalmú aminosav-oldalláncok oxidációjának lehetséges útjait a metionin esetében a 8.2. ábra, a cisztin, illetve a cisztein esetében pedig a 8.3. ábra mutatja.



8.2. ábra. A metionin oxidációja

Táplálkozási szempontból a ciszteinsav, a metionin-szulfon és a formil-kinurenin nem helyettesítheti a megfelelő aminosavakat. A szabad L-cisztin szulfoxidja, illetve diszulfid-oxidja, a cisztein-szulfénsav, valamint a metionin-szulfoxid részben hasznosulhat a szervezetben. Általánosságban azonban megállapítható, hogy az *oxidatív változások a fehérjék biológiai értékét csökkentik*.



8.3. ábra. A cisztin-, illetve a cisztein-oldalláncok oxidációjának lehetséges útjai

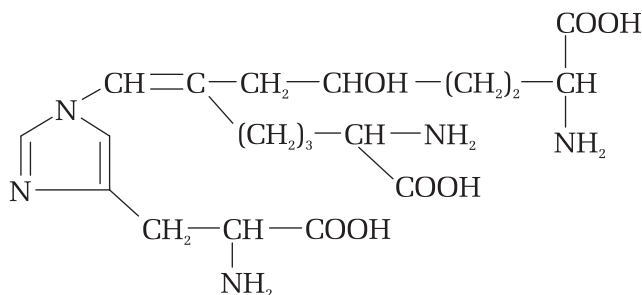
8.3.2.2. Deszulfurizáció és izomerizáció

Nagy nedvességtartalmú élelmiszerek magasabb hőmérsékletre melegítéskor a cisztein számottevő mértékben elbomlik. A bomlás kén-tartalmú vegyületek (kén-hidrogén, metil-merkaptán, dimetil-szulfid) képződésével jár együtt, amelyek az érzékszervi tulajdonságokat nagymértékben befolyásolják. A *deszulfurizáció* következtében olyan újabb, reakcióképes csoportok keletkeznek, amelyek további reakciók kiindulópontjai lehetnek.

Főleg lúgos kezelés hatására a fehérjét alkotó aminosavak *izomerizációja* is bekövetkezhet. A racemizáció lúgos közegben *D-aminosavakat* eredményezhet, amivel bővebben a fejezet végén foglalkozunk. A száraz fehérje hevítése (pl. pörkölés) szintén okozhat izomerizációt, ami legnagyobb mértékben az aszparaginsavnál, a glutaminsavnál, az alaninnál és a lizinnél tapasztalható. Hosszabb hőkezelés során kisebb molekulatömegű peptidek és D-aminosavak is keletkezhetnek. Ezek az átalakulások általában a proteolízist gátolják és a fehérje biológiai értékét rontják.

8.3.2.3. A fehérjék közötti kölcsönhatások

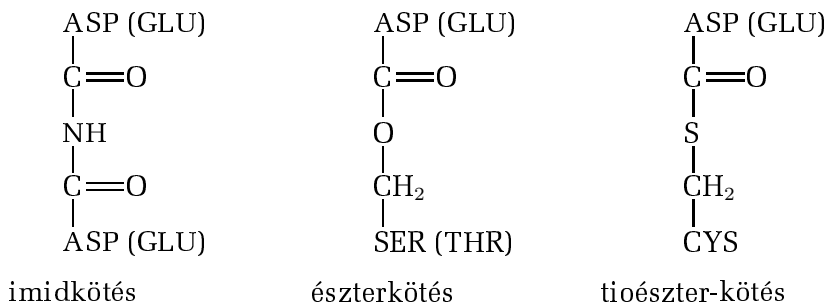
A polipeptidláncok reakcióképes csoportjai révén lehetőség van a *fehérjék közötti* reakciók, *kölcsönhatások* fellépésére is. A reakciók révén kialakuló keresztkötések a proteolízist gátolják, és ezen keresztül csökkentik a fehérjék táplálkozási értékét. Néhány természetes fehérje kovalens keresztkötései, mint pl. a fibrin ϵ -N-(γ -glutamil)-lizin keresztkötése a keratinban és a fibrinben, valamint a hisztidil-allizil-hidroxi-allizin kötés (8.4. ábra) a kollagénben nagymértékben rontják az emészthetőséget.



hisztidil-allizil-hidroxi-allizin

8.4. ábra. Keresztkötések kialakulása a fehérjeláncok között

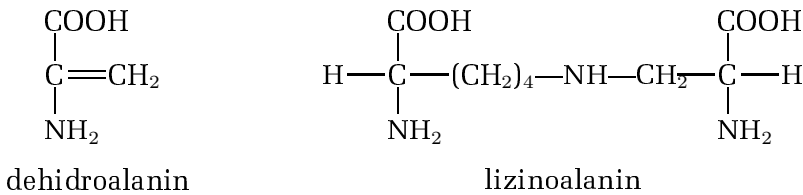
A fehérje-fehérje keresztkötések a fehérjék előállítása és feldolgozása során is kialakulhatnak. A plazmaalbumin hevítésekor a glutamil- és a lizil-oldallánc között ammónia felszabadulása közben keresztkötés alakul ki, amely csökkentheti a lizin hasznosíthatóságát.



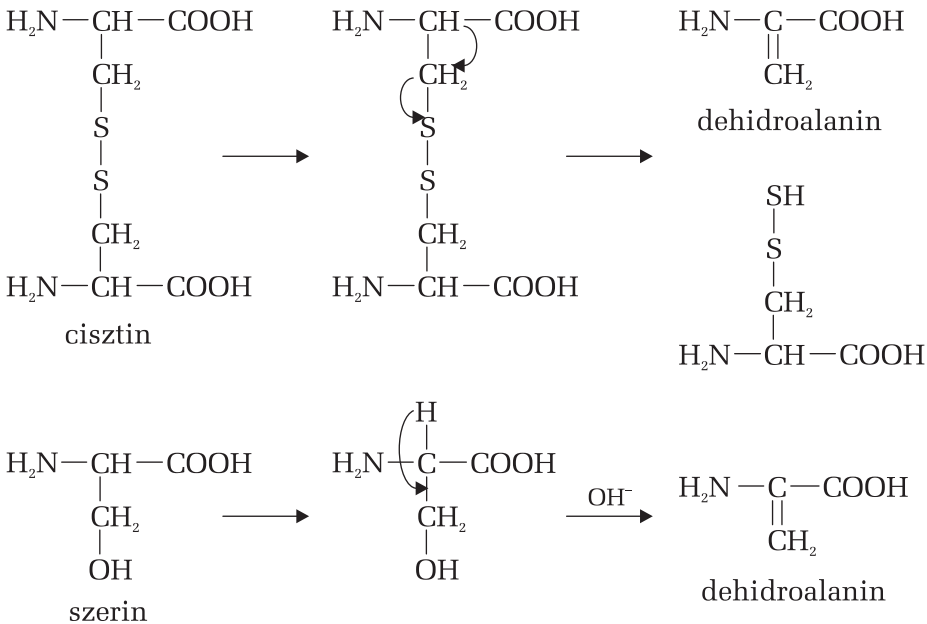
8.5. ábra. Imid-, észter- és tioészter-kötés kialakulása

A lizin ϵ -aminocsoportjának acilezése annak hasznosulását különbözőképpen módosítja. Vannak olyan származékok, amelyek 100%-ban,

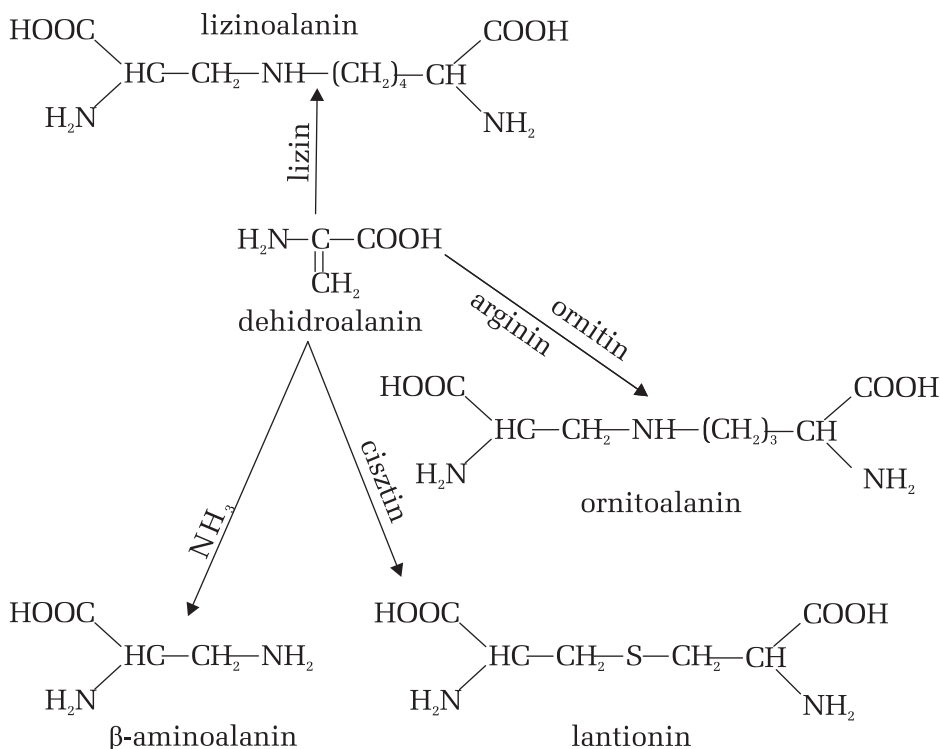
vannak, amelyek csak 50%-ban, és vannak olyan származékok, amelyek egyáltalán nem hasznosulnak az állati szervezetben. A laktalbumin egyes aminosav-oldalláncainak acilezésével kapott származékai 43–77%-ban hasznosulnak a szervezetben. A fenti keresztkötéseken túl a lizin-glutaminsav keresztkötések mellett imid-, észter- és tioészter-keresztkötések is kialakulhatnak a fehérjeláncok között (8.5. ábra). A fehérjék lúgos kezelése során keletkező új származékok közül legnagyobb gazdasági jelentőséggel a lizinoalanin bír: az első ízben szójaizolátumban kimutatott vegyület prekursora a cisztein lebomlásából keletkező dehidroalanin (8.6., 8.7. és 8.8. ábra).



8.6. ábra. A dehidroalanin és a lizinoalanin



8.7. ábra. A dehidroalanin keletkezése



8.8. ábra. A lizinoalanin képződése

A lizinoalanin (LAL) káros biológiai hatását először a lúgos kezeléssel előállított szójabpreparátummal végzett patkányetetési kísérletek során észlelték. A kísérleti patkányok veséjében a hámszövet sejtjeinek sejtmagja, valamint DNS- és fehérjetartalma megnőtt. A jelenséget nephrocytomegaliának nevezték el, amelynek tünetei már az első etetési hét után jelentkeztek a vesetubulusok sejtjeinek fokozott osztódásában. A vesekárosodási tünetek a patkánytörzstől függően 50–100 mg/kg LAL-etetéskor jelentkeztek, extrém nagy dózisok (10 000 mg/kg) esetén pedig a károsodás a teljes vesére is kiterjedt. A LAL vesekárosító hatása nem tekinthető karcinogén jellegűnek, mert egy kétéves kísérlet alatt 200 mg/kg LAL-tartalmú takarmánnyal etetett patkányokon nem tapasztaltak rákos tüneteket, sőt nephrocytomegaliás tüneteket csak szintetikus LAL adagolása esetén tudtak kimutatni. LAL-tartalmú fehérjék savas hidrolizátumával végzett etetés esetén a nefrotoxikus tünetek már 200 mg/kg koncentráció esetén is megjelentek, míg a hidrolizálatlan fehérje

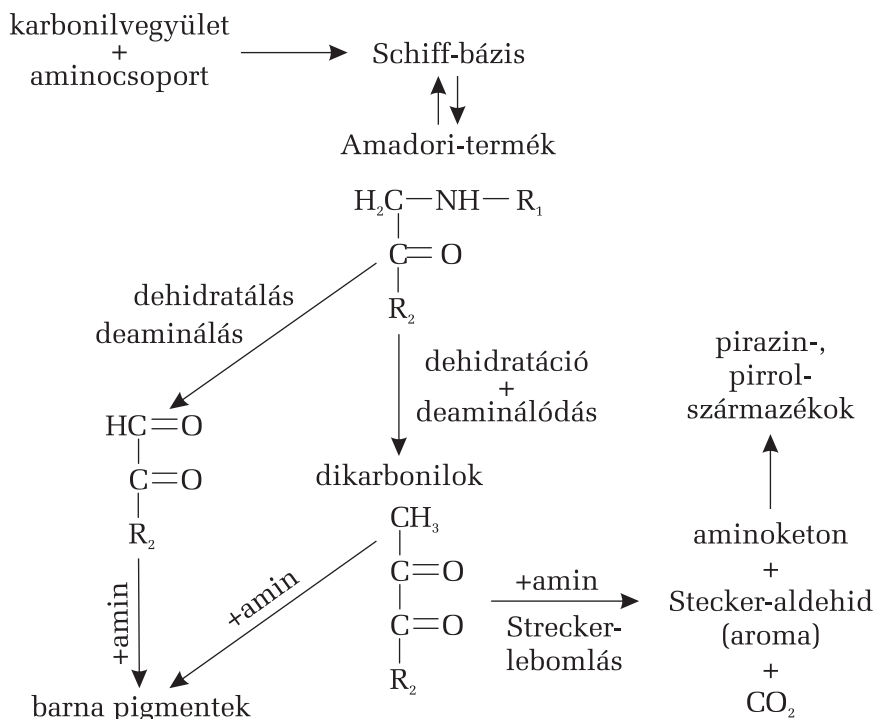
2000–6000 mg/kg LAL-koncentráció mellett sem produkált tüneteket. Egy másik kísérletben 10 000 mg/kg LAL-tartalom ellenére is csak 52 hét után jelentek meg a tünetek. Az ellentmondó eredményeket talán a kísérleti feltételek különbségei magyarázhatják.

A LAL hatását a különböző dietetikus faktorok jelentősen befolyásolhatják. A LAL-t nem tartalmazó védő fehérjék ellensúlyozhatják a LAL hatását. Úgy tűnik, hogy a szabad, illetve oligopeptid formában található LAL toxicitása jóval nagyobb, és a fehérjékben kötött LAL toxicitásának érvényre jutását akadályozhatja a fehérje emészthetőségének csökkenése, amely a keresztkötések kialakulása miatt következett be. A LAL toxicitását még befolyásolhatja az is, hogy milyen sztereoisomer formában van jelen a molekulában. A négy sztereoisomer közül a legtoxikusabb az LD-forma (az első betű a lizin részre, a második az alanin részre vonatkozik), amely az LL-, a DL- és a DD-formáknál 20–30-szor hatásosabb. A kísérletek ellentmondásait okozhatja az is, hogy a nyúl, az aranyhórcsóg, az egér, a kutya és a japánfűrj, valamint a Rhesus majom a lizinoalaninra egyáltalán nem mutatott semmiféle tüneteket. Úgy tűnik, hogy a LAL által okozott nephrocytomegalia nem csupán a patkányokra korlátozódik, *a patkányok* azonban *a lizinoalaninra a többi állatfajnál nagyságrendekkel érzékenyebbek*. Az emberi táplálkozásban használt élelmiszerek az állatkísérletekben használtakhoz képest alacsony LAL-tartalmúak, ezért ezek semmiféle egészségügyi kockázatot nem jelentenek.

8.3.3. Fehérjék kapcsolódása más komponensekkel

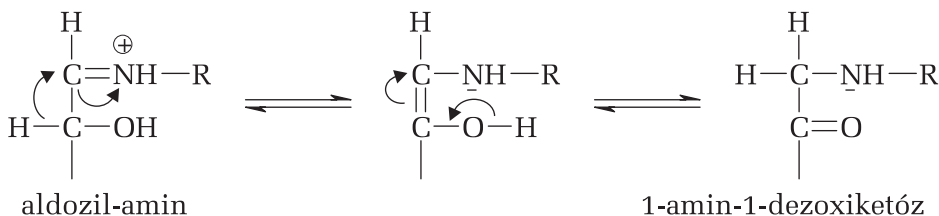
8.3.3.1. A fehérjék és a szénhidrátok közti reakciók, a Maillard-reakció és táplálkozási hatása

A monoszacharidok, általánosságban pedig a redukáló szénhidrátok szabad aminoscsoporttal reagálva, megfelelő körülmények között, bonyolult, többirányú reakcióból álló változáson mennek keresztül, amelynek során aromakomponensek és barna színű pigmentek, melanoidinek keletkeznek. A folyamatot nem enzimes barnulásnak (NEB), vagy a reakció első tanulmányozójáról *Maillard-reakciónak* nevezzük. A nem enzimes barnulás folyamatainak vázlatos összefoglalása a 8.9. ábrán látható.



8.9. ábra. A nem enzimes barnulás folyamatai

A reakció során első lépésként az aminos csoport a karbonilcsoportra addicionálódik, majd vízkilépéssel imin, ezt követően ciklizálódással glikozil-amin képződik. Savas katalízis esetén végbemegy az *Amadori*-átrendeződésként ismert folyamat, melynek során az aldóz típusú vegyületek 1-amin-1-dezoxiketózzá alakulnak, amelyet *Amadori*-vegyületnek is hívunk. Az *Amadori*-átrendeződést a 8.10. ábra mutatja.



8.10. ábra. Az aldózamin Amadori-átrendeződése

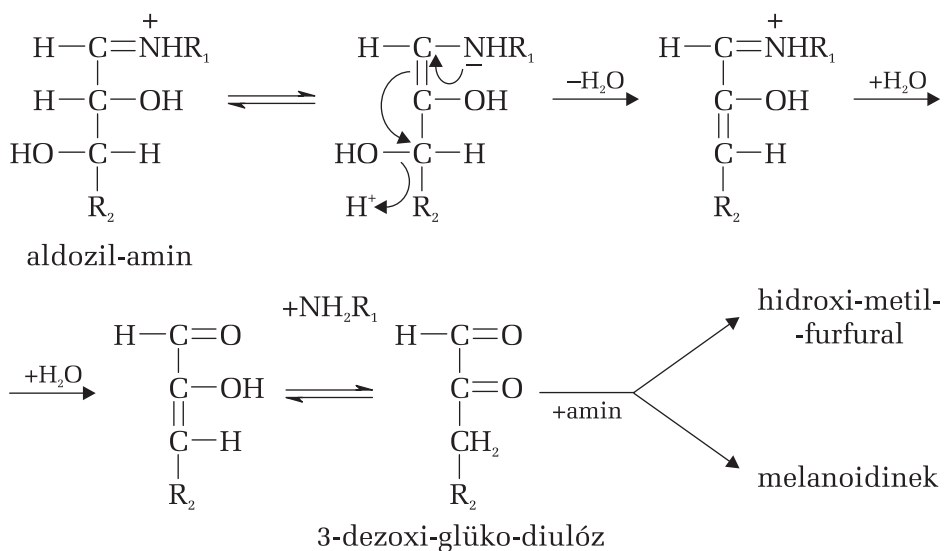
Az *Amadori*-vegyület számos élelmiszerben, különösen szárított gyümölcs- és zöldségfélében, valamint tejporban is kimutatható. Az *Amadori*-vegyületben kötött aminosavak az emésztőenzimek számára nem hozzáférhetőek, ezért rontják az élelmiszerek fehérjeértékét. A glikozil-amin és az *Amadori*-termék azonban a nem enzimes barnulásban csak kiindulási vegyületek. A *Maillard*-reakció legfontosabb átalakulásait a 8.11. ábra mutatja.

Az I-gyel jelölt reakcióban aldózil-aminból 3-dezoxi-glüko-diulózon keresztül hidroxil-metil-furfural keletkezik. A diulóz a rendszerben jelen lévő aminokkal reagál, és barna pigmentek, melanoidinek képződnek.

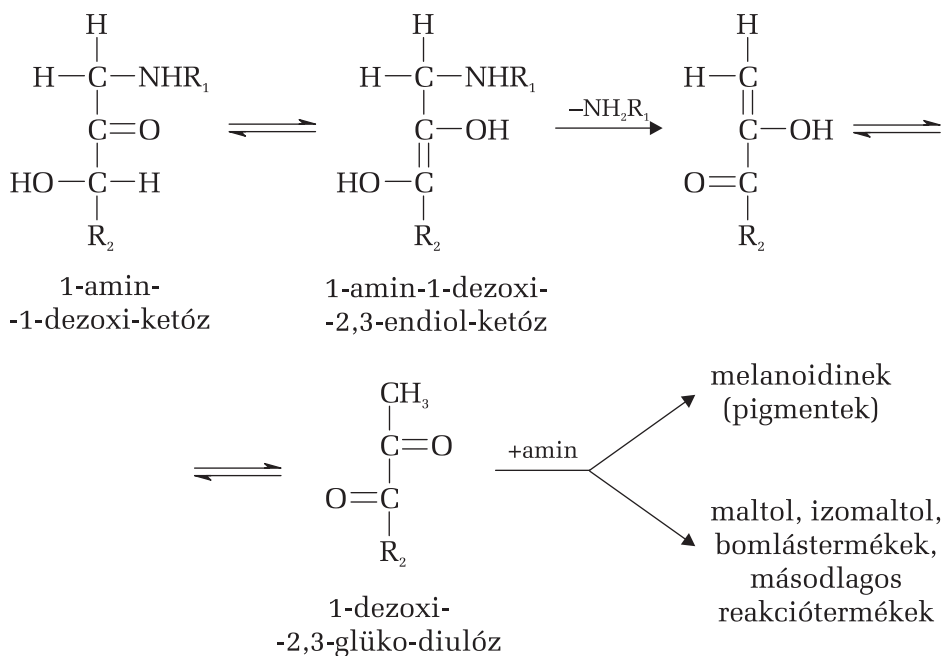
A II. átalakulások során az 1-dezoxi-2,3-glüko-diulózból maltol, izomaltol és különböző egyéb bomlástermékek is keletkezhetnek, és még az aminokkal is reakcióba léphet színanyagok képződése közben. Az ismertett két folyamat közül az I. a domináns.

Az átalakulásnál keletkezett α -dikarbonil-származékok további reakciósort indítanak el. Aminosavakkal reagálva lejátszódik a *Strecker*-féle lebontás, amelynek során a rendszerben aldehidek és aminoketonok jelennek meg (8.12. ábra). A *Strecker*-aldehidek aroma jellegű vegyületek. Az aminoketonok rendkívül reakcióképes anyagok, amelyek könnyen átalakulnak pirazin- vagy pirrolszármazékokká, és további kémiai folyamatok kiindulási vegyületei is lehetnek. Az utóbbi években több száz *Maillard*-reakcióterméket sikerült izolálni, amelyek közül a nagyobb hányad pigment, a kisebb hányad pedig aroma jellegű. A nem enzimes barnulási folyamatoknak az ad nagy jelentőséget, hogy minden olyan élelmiszerben végbemegy, ahol redukálószacharid és szabad aminocsoport van jelen. A reakció megindulásához kedvező, ha a karbonil- és az aminovegyület molaránya 3:1. Az átalakulásokat a rendszer hőmérsékletének emelkedése rendkívül felgyorsítja. A *Maillard*-reakció sebessége a pH-tól is függ; a barnulási minimum pH=3–5 között van.

A nem enzimes barnulás sok élelmiszer-technológiai folyamat (kávépörkölés, kenyérsütés) során előnyös, más esetben viszont (szárított, pirított élelmiszerek, tárolás) hátrányos a szín és aromaváltozás, amelyet minden esetben fehérjevesztés is kísér. A *Maillard*-vegyületek alkalmazásával kísérleteznek pl. a hús- és gabonaipari termékek ízének javítását célozva, és a redukáló hatású reakciótermékek antioxidánsként való alkalmazása is felmerült a hús- és húsipari termékeknél. A glükóz és a hisztidin részvételével végbemenő folyamat végtermékei ugyanis a lipidek oxidációját szignifikánsan gátolják. A fentiekben túl a nem enzimes barnulási folyamat nagy mólómegeű termékei a patogén mikroorganizmusok szaporodását is gátolják.



I.

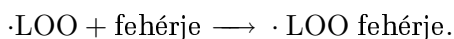


II.

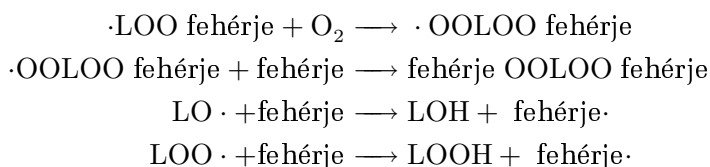
8.11. ábra. A Maillard-reakció fő folyamatai

8.3.3.2. A fehérjék és a lipidek kapcsolódása

A fehérjék és a lipidek oxidációs termékei közötti kölcsönhatások már jó ideje ismertek. Leggyakrabban a fehérjekészítmények és az oxidált linolsavészterek kölcsönhatásait vizsgálták. Ennek során megállapították, hogy a lipidek szabad gyökei (L·, LO· /alkoxi/, LOO· /peroxi/) a fehérjékkel különböző módon reagálhatnak. Lehetséges gyökképződés addícióval, az alábbiak szerint:



A további reakciókban polimerek keletkezhetnek, a következők szerint:



A gyök általában az α -szénatomon, ritkábban pedig a cisztein kénatomján alakul ki. A szabad fehérjegyökök lipidmentes fehérjepolimerizátumokat eredményezhetnek, amelynek tényét vízzeloldható fehérjéket, enzimeket és peroxidált lipideket tartalmazó rendszerekben sikerült bizonyítani, aminek során a molekulatömeg jelentősen növekedett. E reakciók folyamán veszteség lépett fel a metionin-, a cisztein-, a hisztidin- és a lizintartalomban. A peroxidok hatására a fehérjében láncszakadások is előfordulhatnak.

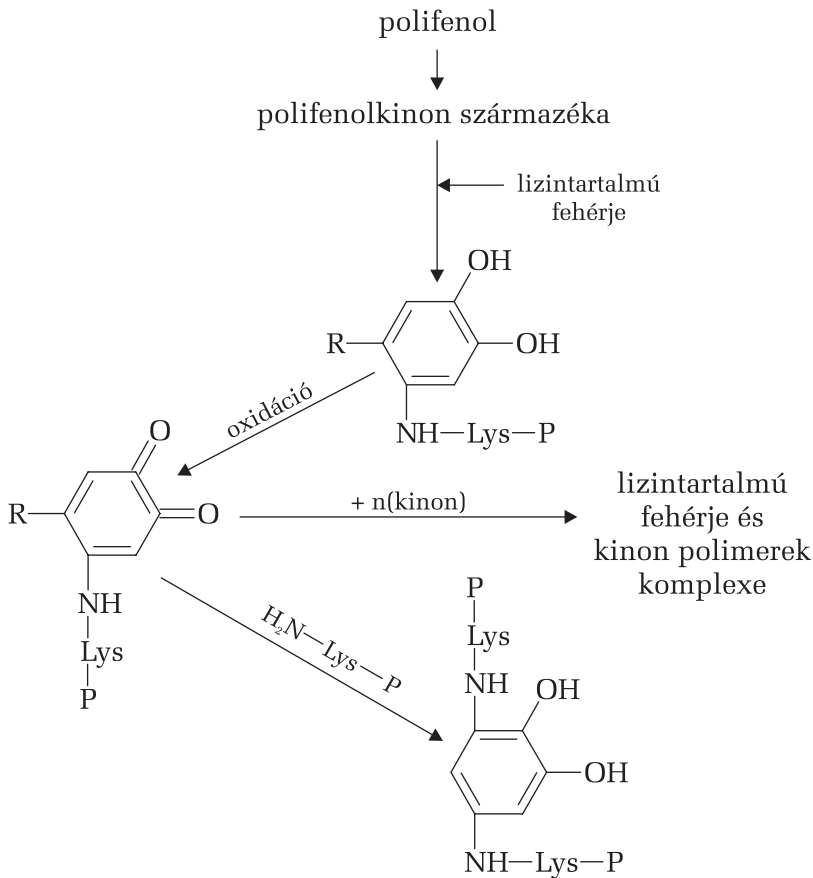
Karbonil-amin-reakció a lipid autooxidáció második szakaszában keletkező oxovegyületek, valamint a fehérjék aminocsoportot tartalmazó oldalláncai között jön létre:



Az ilyen típusú reakciók létrejöttét bizonyítja többek között a fehérjék oldhatóságának változása, és a Schiff-bázis kötésekre jellemző elnyelési sávok megjelenése a spektrumban. A malonaldehid két fehérjelánc között keresztköteket tud létrehozni, amely reakció nemcsak a fehérjék, hanem az egyes aminosavak között is létrejöhet. A reakciónak a zsírszövetek, illetve zsírtartalmú élelmiszerek nem kívánatos elszíneződésével kapcsolatban lehet jelentősége.

8.3.3.3. A fehérjék és a polifenolok kapcsolódása

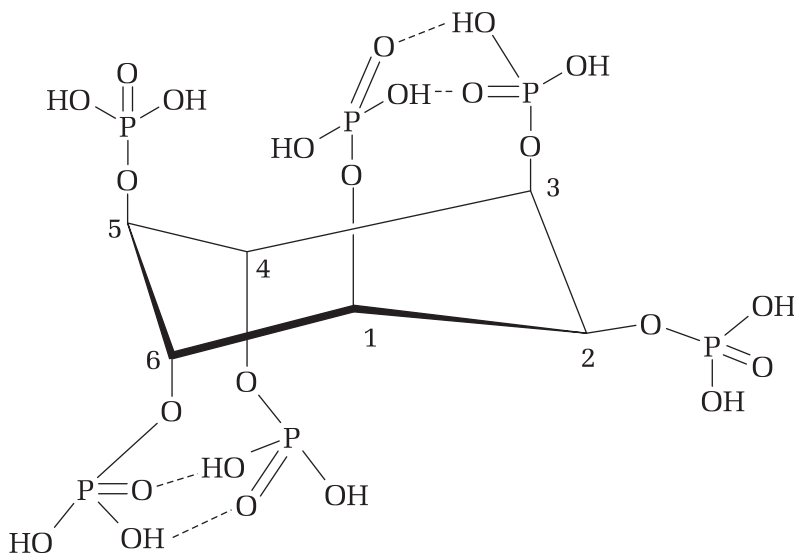
A polifenol-vegyületek, amelyek számos élelmiszer-ipari nyersanyag összetevői, a sérült növényi szövetekben, így az élelmiszer-ipari feldolgozás során is, könnyen oxidálódnak. Az *oxidált polifenolok fehérjékkel kölcsönhatásba lépve* lényegesen csökkentik a hozzáférhető lizin mennyiségét, és ezen keresztül jelentősen rontják a fehérjék biológiai értékét. Különösen igaz ez az alkalikus közegben végbemenő változásokra, de semleges közegben is a lizin oldalláncai közvetlenül kapcsolódhatnak az aromás gyűrűhöz. A feltételezett reakciókat a 8.13. ábra mutatja.



8.13. ábra. Polifenol-fehérje reakciók semleges közegben

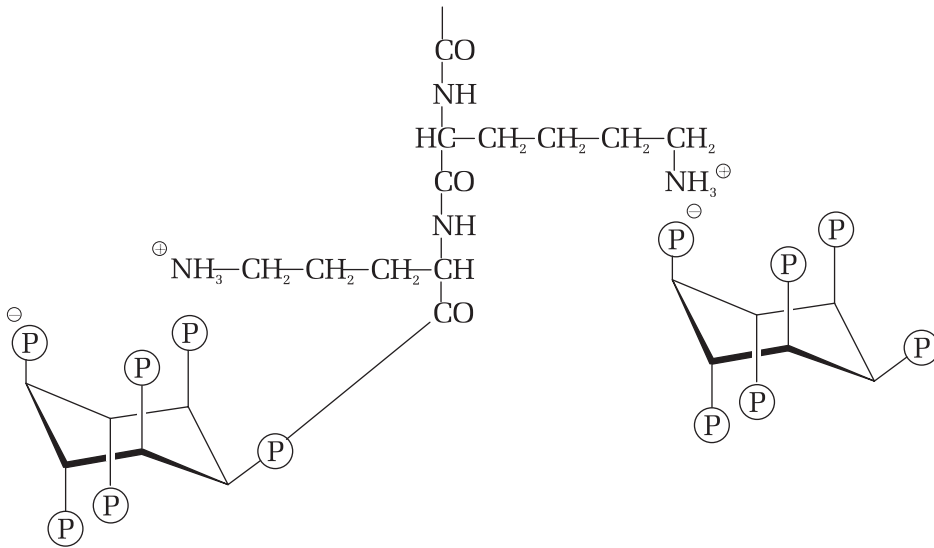
8.3.3.4. A fehérjék és a fitinsav kapcsolódása

A fitinsav és sói a növényi magvak állandó természetes összetevői, amelyek szerepe elsősorban a foszforsav és az inozit tárolása. *A mikroelemek táplálkozási értékét és hasznosulását a fitinsav – mint kelátképző – jelentősen befolyásolhatja* (8.14. ábra).



8.14. ábra. A fitinsav szerkezete

A fitinsav azonban kapcsolatba léphet a fehérjékkel is mind savas, mind lúgos közegben, fitinsav-fehérje komplexeket létrehozva. Többértékű kation jelenlétében hármas fitinsav-fém-fehérje komplexek is keletkezhetnek, amelyben a kölcsönhatás jellege savas közegben ionos. Olyan savas közegben, amelyben a fitinsav egyes hidrogénjei disszociálnak, vagyis a fitinsav negatív töltésű, a legtöbb fehérje pedig pozitív töltésekkel rendelkezik, a kölcsönhatás gyors, és a komplexek stabilak. Alacsony pH-értéknél a fehérje pozitív töltésű csoportjai a fitinsavval reagálnak, és kedvező szterikus viszonyok között a fitinsav hidat létesíthet a két polipeptidlánc között (8.15. ábra). Kétértékű kation hármas komplex képződését eredményezheti, és többszörös lipid- és szénhidráttartalmú komplexek kialakítására is van lehetőség.



8.15. ábra. Polipeptidhíd két fitinsav-molekula között

8.4. A fehérjék hőkárosodásának kimutatása

A fehérjék hőkárosodásának kimutatásával részletesen a hetedik fejezet foglalkozik, azonban e fejezetben is célszerű nagyon röviden utalni azokra a módszerekre, amelyek alkalmasak a fehérjék hőkárosodásának kimutatására. A fehérjék denaturáltsági foka a funkcionális tulajdonságok, a viszkozitás stb. megváltozásának vizsgálatával mutathatók ki. A natív szerkezet megváltozására a poliakrilamid gélelektroforézises és az immunelektroforézises vizsgálatokból következtethetünk.

A fehérje összetételének megváltozása rendszerint csak igen erőteljes hőkezeléskor következik be. A technológiában megszokott hőkezelés hatására a fehérje nitrogéntartalma alig változik, de a vizes közegben hosszú ideig végzett hőkezeléskor a szabad aminosavak és a nemfehérje-nitrogén fő része kioldódhat, sőt az oldható fehérjefrakciók egy része is eltávozik, ami a főzővíz eltávolításakor jelentős nitrogénvesztést okozhat.

A fehérjék aminosav-összetétele szintén csak igen erőteljes hő hatására változik meg. Mivel az aminosav-analízis előtt a fehérjét általában 6M sósavval, 24 órán át, 110 °C-on hidrolizálják, az aminosav-analízis

során minden olyan károsodás rejtve marad, melyek a hidrolízis-körülményeknél enyhébb hatásokkal érte a fehérjét. Az aminosav-analízis tehát a fehérjehidrolízis miatt nem elég érzékeny módszer az aminosav-veszteség kimutatására; az aminosav-analizátorral történő méréstechnikával jobbra csak a cisztin-, a triptofán-, a metionin- és a lizinveszteség mutatható ki.

Az aminosavak bruttó változását megelőzi az esszenciális aminosavak hasznosíthatóságának csökkenése. Az aminosavak felhasználhatóságának mérésére számos kémiai, enzimatis, mikrobiológiai és állatkísérletes módszer áll rendelkezésünkre, amelyek rendkívül érzékenyek is lehetnek a hő károsító hatásának kimutatására. A fehérjeminőség mérésére használt biológiai módszerek közül a PER, a BV, az NPU és az NPR érzékenyen reagálnak a fehérje tápértékében bekövetkező változásokra. A PER-módszer nemcsak a fehérje minőségére, de a jelenlévő vagy a hőkezelés során keletkező toxikus anyagokra is rendkívül érzékenyen reagál. A felsorolt *módszerek különösen akkor alkalmasak a hőkárosodás mértékének kimutatására, ha a hő hatására a limitáló aminosav károsodott*. Amennyiben az esszenciális aminosavak nagy mennyiségben vannak jelen a mintában, és hasznosítható mennyiségük nem csökken annyira, hogy a limitáló szintre süllyedjen, a módszerek ezt a károsodást nem jelzik, mivel ezekkel csak az általános táplálkozási értéket lehet meghatározni. Jó példa erre a halliszt, ahol a metionin a limitáló aminosav, éppen ezért a felhasználható lizintartalomban bekövetkező veszteség az állatkísérletekkel nem mutatható ki. Mivel táplálkozásra és gazdasági állataink takarmányozására nagymértékben használjuk a lizinszegény cereáliákat, ezekhez általában lizinpótlásra van szükség. Ezeknél az alapanyagoknál, a lizin kiemelkedő jelentősége miatt, a hőkezelés fehérjekárosító hatását a lizin felhasználható mennyiségének mérésével kell ellenőrizni.

8.5. A fehérjeminőséget befolyásoló technológiák

A fehérje minőségét leginkább a fehérjelisztek gyártása során alkalmazott hőmérséklet, a szemes termények szárítása, a forrólevegős zöldtakarmány-szárítás és a fehérjék lúgos izólálása befolyásolja.

8.5.1. A fehérjelisztek gyártása

A fehérjelisztek tápértékét a nyersfehérje-, a nyershamu- és a nyerszsír-tartalom alapján szokás jellemezni, azonban a rendkívül heterogén alapanyag és a gyártás során alkalmazott eltérő erősségű hőkezelés miatt a nyersfehérje hasznosítása változó. *A hőkezelés során az izom és a belsőségek emészthetősége kezdetben javul*, de a sterilizációhoz szükséges hőkezelést meghaladó főzési idő és hőmérséklet a fehérje emészthetőségét rontja. *Romlik az esszenciális aminosavak hasznosíthatósága*, melyek közül legjelentősebb mértékben a lizin hasznosítható mennyisége csökken. Ha az egyes aminosavak mennyiségében is csökkenés tapasztalható, az már nagyfokú fehérjekárosodásra utal. A hasznosíthatóság csökkenése egyrészt enzimrezisztens intramolekuláris kötések kialakulásával, másrészt az aminosavak bomlásával (dekarboxileződés, dezaminálódás) magyarázható. A kémiai reakciók közül az oxidatív károsodás a legjelentősebb, mely a triptofán bomlásához és a kéntartalmú aminosavak oxidációjához vezet. A metionin-szulfoxid önmagában rosszul hasznosul, de a cisztinnel történő redukció a hasznosulást javítja. A metionin-szulfoxid oxidációja metionin-szulfonná csak erőteljes oxidációs hatásra megy végbe, mely már metioninvesztésűt jelent, hisz a metionin-szulfont a szervezet nem tudja hasznosítani.

Húslisztek gyártása során a *Maillard*-reakció károsító hatásával számolni kell, a túlzott hevítés következtében pedig jelentős lehet a cisztinvesztés, mert a cisztin hevítés hatására, vizes közegben, kén-hidrogén keletkezése közben bomlik, sőt a cisztinből oxidáció hatására ciszteinsav is képződhet. 145 °C felett a cisztinből, a szén-szén kötések bomlása miatt, metil-merkaptán, dimetil-szulfid és dimetil-diszulfid is képződhet. A kellemetlen szagú termékek felszabadulása szennyezheti a környezetet is. A cisztin bomlása során keletkező dehidroalanin a lizin szabad ϵ -amino-csoportjával reakcióba lépve a hasznosítható lizintartalmat csökkenti. A hőkezelés hatására *a peptidkötések felszakadása révén nő az α -amino-nitrogén mennyisége*, sőt ammónia is keletkezhet. Ammónia jelentős mértékben keletkezhet a szerin és a cisztein bomlása során is, sőt potenciális ammóniaforrás a hisztidin imidazol- és az arginin guanidincsoportja. 145 °C felett növekszik a glicin és az alanin mennyisége a bonyolultabb szerkezetű aminosavak bomlása révén. Az állatifehérjelisztek hőkezelése során a lizin szabad ϵ -amino-csoportja reakcióba léphet az aszparagin és a glutamin amidcsoportjával ammónia keletkezése

közben. Ammónia azonban az amidcsoportok hidrolízise során is keletkezik, így mennyisége nem arányos a lizinveszteséggel, ezért a szabad ammóniatartalom mérése minőségellenőrzésre nem használható.

A hőkezelés hatására az izoleucin D-allo-izoleucinná racemizálódik, mely különösen az izoleucinban szegény alapanyagok esetében okoz jelentős károsodást.

A hőkárosodott fehérjékben kialakult *keresztkötéseket az emésztőenzimek nem tudják bontani*, és mivel a keresztkötések hasonló mechanizmus szerint alakulnak ki a különböző aminosavaknál, ezért több esetben a triptofán, a lizin és a metionin hasznosítható mennyisége azonos mértékben csökken.

A bőr, a porc, a kötőszövet, az inak nagy kollagéntartalmuk miatt kevésbé értékes fehérjeforrások, mert triptofánt egyáltalán nem, és kén-tartalmú aminosavat is csak keveset tartalmaznak. A pata, a szőr, a szaru és a toll keratinja a bennük lévő nagyszámú diszulfidhíd miatt emészthetetlen. *Hőkezelés* vagy különböző kemikáliák *hatására* a diszulfidhidak felhasadhatnak, a fehérje feltáródik, az emésztőenzimek térbeli gátlása megszűnik, és *a keratin részben emészthetővé válik*, bár *biológiai értéke továbbra is csekély marad*, hisz lizin-, metionin-, triptofán- és hisztidintartalma rendkívül kicsi. Nagy tisztítartalma következtében talán kén-tartalmú aminosavakban hiányos olajos magvak extrahált darái egészíthetők ki vele előnyösen. A keratin feltárására gyakran redukálószerket, különféle savas, illetve lúgos kezelést is alkalmaznak. A kezelések hatása a tápértékre attól függ, hogy a toll-, illetve szőrhidrolizátum egyéb hasznosítható anyagai milyen mértékben károsodnak. Az állatifehérjé-lisztek előállításánál a hőkezelés melletti egyéb technológiai hatások a tápértéket nem károsítják, a bakteriológiailag nem megfelelő tételt azonban újra kell sterilizálni, ami a fehérje hasznosíthatóságát erősen csökkentheti.

8.5.2. A szemes termények szárítása

Szemes termények eltarthatósága és technológiai feldolgozhatósága miatt azokat a betakarítást követően szárítani kell. A szárításra forró levegőt vagy füstgázokkal kevert levegőt használnak, melynek során a termék hőmérséklete 30–160 °C között ingadozhat. A hőközlés és oxidáció hatására a fehérje denaturálódik, majd a *Maillard* típusú aminosav-károsodás a hasznosítható lizintartalmat jelentős mértékben csökkenti. A szemes

termények szárításakor bekövetkező hőkárosodás a hasznosíthatólizintartalom csökkenése alapján mutatható ki.

8.5.3. Forrólevegős zöldtakarmány-szárítás

A forrólevegős zöldtakarmány-szárítás során a felaprított szecskát 600–1100 °C belépő hőmérsékletű levegővel hígított füstgázok szárítják. A lucerna feldolgozása során a hőkárosodást a *Maillard*-reakció okozza, melyet a termék karamell szaga elárul. A lucerna fenol típusú vegyületei polikinonokká oxidálódnak, és irreverzibilisen kötődnek a fehérjéhez.

8.5.4. A fehérjék lúgos kezelésének hatása

Olajos magvakból fehérjeizolátumok előállítására, az enzim inhibitorok és a mikotoxinok elbontására, a mikrobafehérjék nukleinsavtartalmának csökkentésére gyakran alkalmazzák a lúgos kezelést. A fehérje lúgos izolálása során a cisztin-, a szerin-, az izoleucin- és a lizintartalom csökken, és olyan származékok keletkeznek, mint a D-alloizoleucin, az ornitin, a lizinoalanin és a lantionin. A lizinoalanin és a lantionin a fehérjében keresztkötéseket okoz, ami a fehérje in vitro emészthetőségét csökkenti. A lúgos kezelés legjobb indikátora a képződött ornitin és az elbomlott arginin, de az L-lizin is részben D-lizinné alakul át. A β -elimináció során a cisztinból, a szerinből és a treoninból dehidroalanin képződik, a lizinből és a dehidroalaninból kialakuló lizinoalanin mennyisége és a fehérje NPU-értéke között negatív összefüggés van, tehát *a lúgos kezelés a fehérjék NPU-értékét jelentékeny mértékben csökkenti.*

8.5.5. A D-aminosavak kialakulása és hatása a fehérje minőségére

Az élelmiszerek nagy mennyiségben tartalmazhatnak olyan, idegen eredetű, nem természetes anyagokat, amelyek nagymértékben befolyásolhatják az emészthetőséget. Ilyenek például a D-sztereoizomer aminosavak, amelyek a közönséges L-sztereoizomer aminosavakból képződnek vagy az előállítás folyamán, vagy az élelmiszer mikrobiológiai minőségében beállt változás következtében. Jelenlétük nagymértékben csökkentheti az élelmiszer-fehérje emészthetőségét és az átalakult aminosav felhasználhatóságát. Annak ellenére azonban, hogy a D-aminosavakat

nemkívánatosnak tartják az élelmiszerekben, többen azon a véleményen vannak, hogy a D-aminosavak némely esetben még előnyösek is lehetnek az emberi és az állati szervezet számára.

Pasteur – mint sok minden másban – e területen is úttörő munkát végzett. A bükkönyből előállított aszparaginsavról kimutatta, hogy az optikailag aktív (királis), az ammónium-fumarát hevítésével előállított pedig nem mutat optikai aktivitást. Ezt követően rájöttek arra, hogy az élő szervezet fehérjéit kizárólag L-aminosavak építik fel, annak ellenére, hogy a D- és az L-sztereoisomerek (enantiomerek) ugyanazzal a kémiai és fizikai tulajdonsággal rendelkeznek, egyetlen kivétellel, ez pedig a polarizált fény síkjának az elforgatása. A két sztereoisomer a polarizált fény síkját különböző irányban forgatja el. Az élő szervezet fehérjéinek sztereospecifikus szintézisét nem tudták megmagyarázni, és ez a problémakör csaknem egy évszázada foglalkoztatja a tudósokat.

Az aminosav enantiomerek szétválasztására és meghatározására kifejlesztett módszerek tökéletesedésével úgy találták, hogy a D-aminosavak – a korábbi felfogással ellentétben – nagyon sok szervezetben előfordulnak. A baktériumok sejtfalának peptidoglikánjai például D-aszparaginsavat, D-glutaminsavat és D-alanint tartalmaznak. Néhány tengeri féreg és gerinctelen állat sejt folyadékának fő komponensei a D-aminosavak, és néhány tengeri kagylóban a D-aminosavak mennyisége az 1%-ot is meghaladhatja. Ezt követően kimutatták, hogy a magasabb rendű növények is tartalmaznak D-aminosavakat. A hosszú élettartamú emlősök metabolikusan stabil fehérjei nagyobb mennyiségben tartalmaznak racemizációból származó D-aszparaginsavat; az emberi agy fehérállományának D-aszparaginsav-koncentrációja eléri a 3, a gerincvelő tisztított bázikus fehérjeje esetében pedig a 10%-ot. Bizonyították, hogy az aszparaginsav az emberi szövetekben *in vivo* racemizálódik, bár a gyors anyagforgalom miatt mérhető mennyiségben nem akkumulálódik.

A királis aminosavak átalakulhatnak racém keverékké, amely átalakulás reakciómechanizmusa feltételezi az α -helyzetű szénatom hidrogénjének leszakadását, a planáris karbanionszerkezet kialakulását. A racemizáció aránya függ attól, hogy az aminosav szabadon vagy a peptidláncban, kötött formában fordul-e elő, és természetesen leginkább függ a hőmérséklettől, a pH-tól és az aminosavban előforduló R csoport tulajdonságától. A szabad aminosavak racemizációját tanulmányozva megállapították, hogy 100 °C-on 7 és 8 pH között a szerin racemizációs felezési ideje (az az idő, amikor a D/L arány eléri a 0,33-at)

három nap, az aszparaginsavé 30 nap, az alaniné 120 nap, az izoleuciné pedig 300 nap. A pH=9-nél 83 °C-on kazein esetében az előbbi négy aminosav racemizációs felezési ideje az alábbiak szerint alakult: 16 óra, 19 óra, 11 nap, 57 nap, a szójafehérje esetében 75 °C-on 0,1 mólos nátrium-hidroxidban pedig: 9 perc, 20 perc, 5 óra, 25 óra. Amint az összeállításból is látható, *a különböző aminosavak különböző körülmények között eltérő idejű racemizációs időt mutatnak*, de az aminosavak közötti racemizációs sorrend többé-kevésbé változatlan marad. A szerin, a cisztin és a treonin racemizációja nemcsak a vonatkozó D-enantiomert eredményezheti, hanem a fehérjeépítő aminosavaktól eltérő aminosavat is. A szerin pl. a karbanion köztes állapotban gyorsan elveszítheti OH-csoportját dehidroalanin keletkezése közben. A dehidroalanin reakciója a lizin ϵ -amino-csoportjával lizinoalanint hoz létre, egy olyan aminosavat, amelynek alaninrésze racém, lizinrésze pedig optikailag aktív. A táplálékfehérjékben ez a reakció keresztkötések eredményezhet, ami csökkenti a fehérje emészthetőségét, és a táplálék lizinoalanin-tartalma toxikus hatású is, amiről korábban már szó volt.

Táplálkozási szempontból *az esszenciális aminosavak racemizációjának van a legnagyobb jelentősége*. Az esszenciális aminosavak D-enantiomerjeinek emészthetőségét és metabolizmusát már régóta vizsgálják. A korai tanulmányokat összefoglaló munkákból kitűnik, hogy az emlősökben az esszenciális aminosavak D-enantiomerjei igen gyengén hasznosulnak, néhány esetben növekedési inhibitoroként hatnak, és főként a vizelettel ürülnek ki.

Az esszenciális aminosavak *racemizációs felezési idejét* csak a legutóbbi időkben vizsgálták. 7 és 8 közötti pH-n az izoleucin, a leucin és a valin racemizációs felezési idejét 100 °C-on 300 napnak, a fenilalaninét és a tirozinét pedig 50 napnak mérték. Ugyanilyen körülmények között a lizinét 40 napnak, a triptofánét pH=9-en és 83 °C-on 40 napnak, a treoninét 20 napnak, a ciszteinét pedig két napnak mérték. A metionin racemizációs felezési idejére 100 °C-on, pH 7 és 8 között 30 napot kaptak. A mérési adatokból úgy tűnik, hogy a cisztein különösen hajlamos a racemizációra, míg az alifás oldalláncú aminosavak a legstabilabbak e tekintetben. A legtöbb esszenciális aminosav racemizációs felezési ideje hosszabb, mint az aszparaginsavé.

A lúgos kezelésnek vagy hosszabb ideig hőnek kitett élelmiszerfehérjék nagyobb koncentrációban tartalmaznak racemizációból eredő aminosavakat. Kimutatták, hogy a hőnek és az erős alkáliáknak kitett

fehérjék emészthetősége csökken. Ma már nyilvánvaló, hogy az emészthetőség csökkenése összefüggésben van a lizinoalanin keletkezéssel és a fellépő racemizációval.

Élelmezési eredetű D-aminosavak

Annak ellenére, hogy néhány rovar, féreg és tengeri gerinctelen állat jelentős mennyiségű D-aminosavat tartalmaz – mivel ezek nem fő élelmiszer-komponensek az emberiség számára –, mennyiségük jelentéktelen, jelentőségüktől ezért eltekinthetünk. Azokban a közösségekben azonban, ahol a tengeri kagylók fontos élelmiszerforrások, a nagy mennyiségben elfogyasztott D-aminosavakat nemcsak táplálkozási, hanem toxikológiai szempontból is figyelembe kell venni, a tengeri kagylókban ugyanis a D-aminosavak mennyisége az 1%-ot is meghaladhatja. A D-aminosavak mennyisége a tengeri puhatestű állatokban 0,11–1,6 mM között változhat 70% víztartalmú testszövetre vonatkoztatva.

Az élelmiszer-kezelések többsége (melyet az íz, az állag vagy eltartathatóság miatt végeznek, beleértve a főzést és a sütést is) hőkezeléssel jár, és emellett esetenként alkalikus körülményeket is alkalmaznak. E beavatkozás által indukált racemizáció eredményezi a D-aminosavakat a fehérjékben. Kimutatták, hogy néhány, technológiai behatásnak alávetett, kereskedelmi forgalomban kapható élelmiszerben nagyobb mennyiségű D-aminosav található, és a lizinoalanin is szinte mindenütt jelen van az élelmi anyagokban. Ráadásul az olyan, szintetikus előállított termékek, mint az aszpartám-dipeptid, különösen hajlamosak a racemizációra. Vizsgálataink szerint a lúgos hidrolízissel előállított toll-liszt aminosavainak 10–40%-a racemizálódik az előállítási paraméterek függvényében.

Természetes alapanyagok

A tej, a hús és a gabonafélék, amelyek nyers állapotban nem tartalmaznak jelentős mennyiségben D-aminosavakat, a fogyasztásra való előkészítés folyamán gyakran vannak olyan körülményeknek kitéve, amelyek racemizációt okozhatnak. A tej és tejtermékek a legjobb példák arra, hogy hogyan változhat meg a természetes anyag összetétele. Bár az élelmiszer-áruházak egy részében kezeletlen (nyers) tej is kapható, a legtöbb tejterméket először pasztőrözik (hőntartás 30 percig,

68–72 °C-on) vagy ultrapasztörözik (hőntartás 135–145 °C-on, 15 másodpercig). Ezt követi aztán a homogénezés, a kondenzálás, és befejezésképpen olyan speciális terméket kapunk, mint a fogyasztási tej, a joghurt vagy a különböző tejfehérje-frakciókból kapott sajt. Ez utóbbi két tejterméket baktériumok segítségével fermentálják, ami ugyancsak forrása a D-aminosavaknak. A következőkben a D-aminosavak koncentrációját minden esetben az alábbiak szerint adjuk meg: $\%D\text{-aminosav} = (D/(D+L)) \cdot 100$.

A tejszelés hatására bekövetkező változásokat a D-aszparaginsav koncentrációjának mérésével tanulmányozták. A kezeletlen nyers tej tartalmazta a legkevesebb D-aszparaginsavat (1,48%), a kezelések növekvő számával pedig nőtt a mennyisége (acidofil tej: 2,05%, zsírtalanított tejpor: 2,15%, kefir: 2,44%, sűrített tej: 2,49%, joghurt: 3,12%, tejalapú csecsemőtápszere: 4,95%). Azok a termékek tehát, amelyek előállításához szükséges a melegítés, akár 5% D-aszparaginsav-tartalmúak is lehetnek. Legnagyobb a D-aszparaginsav aránya a csecsemőtápszerekben, amelyek olyan technológiai beavatkozásokon mennek keresztül, mint pl. a porlasztva szárítás vagy a hővel való sterilizálás.

A hőkezelés és a baktériumok hatását vizsgálva a tej szabad és fehérjében kötött D-aminosav-tartalmára megállapították, hogy a nyers tej szabad D-aminosav-tartalma nem nőtt a pasztörözés, az ultrapasztörözés vagy a sterilizálás hatására. A vizsgált tejminták szabad D-alanin-tartalmát 3–8% közöttinek, D-aszparaginsav-tartalmát 2–5% közöttinek, D-glutaminsav-tartalmát pedig 2–4% közöttinek mérték. Ezzel szemben megállapították, hogy *a nyers tejminták szabad D-aminosav-tartalma jelentősen nőtt a 4 °C-on való tárolás alatt*, ezért a D-alanin-tartalmat a tej bakteriális szennyezettségének ellenőrzésére javasolják. A tejfehérjében kimutatott D-aminosav-tartalmat a fehérje hidrolízise során bekövetkezett racemizációnak tulajdonítják.

A tejpor szabad D-aszparaginsav-tartalmát 4–5%, D-alanin-tartalmát pedig 8–12% közöttinek találták. A joghurt szabad D-alanin-tartalmát 64–68%-nak, szabad D-aszparaginsav-tartalmát 20–32%-nak, szabad D-glutaminsav-tartalmát pedig 53–56%-nak mérték az összes szabad aminosav (D és L) százalékában. Ugyanezek az értékek érett sajt esetében 20–45%, 8–35% és 5–22% között alakultak. Az érett sajt szabad D-fenil-alanin-tartalmát 2–13% közöttinek találták, és minimális mennyiségű D-leucint is ki tudtak mutatni az érett sajtból. A pörkölt kávé D-aszparaginsav-tartalmát 23–38%, D-glutaminsav-tartalmát 32–41%, D-fenil-alanin-tartalmát pedig 9–12% közöttinek állapították meg.

A mérések eredményei felhívják a figyelmet arra, hogy nem azok az élelmiszerek tartalmazzak sok D-aminosavat, amelyeket hosszabb ideig tartó hőkezelésnek tettek ki, hanem inkább azok, amelyek baktériumos fermentáción mentek keresztül.

A tej, a fermentált tej, a friss sajt és a túró szabad D-aminosavait vizsgálva megállapították, hogy jelentős mennyiségű D-aminosav fordul elő mind a nyers tejben, mind a belőle készített erjesztett tejtermékekben. Az eredményeket a 8.1. táblázat tartalmazza. A táblázat adataiból megállapítható, hogy a joghurt és a sajt jelentős mennyiségű D-alanint (1,35–2,48 mg/100 g), D-aszparaginsavat (0,31–0,37 mg/100 g) és D-glutaminsavat (1,09–2,13 mg/100 g) tartalmaz, és ezenkívül jelentős lehet még a D-lizin (1,49 mg/100 g) és a D-prolin (2,18 mg/100 g) mennyisége is. Találtak még nyomnyi mennyiségben D-valint, D-leucint, D-alloizoleucint és D-szerint is az erjesztett tejtermékekben. A D-aminosavak eredetét elemezve megállapítják, hogy azok legnagyobb részét a mikrobiológiai beavatkozásból, nyers vagy pasztörözött minták esetében pedig a mikrobiális szennyeződésből, esetleg a szubklinikai tőgygyulladásos egyedek tejének az elegytejhez való hozzáfejesésből származtathatók.

Keresve a választ arra, hogy vajon mi okozza a kereskedelmi forgalomban kapható tej D-aminosav-tartalmát, *Csapó* és mtsai. meghatározták egészséges tehének első tejsugarai, első tejsugaraktól mentes elegyteje, valamint a masztiteszt-próba különböző fokozatainak megfelelő tejminták szabad D-aminosav-tartalmát (8.2. táblázat).

Megállapították, hogy mind az első tejsugarak, mind pedig a beteg tőgyből származó tej jelentős mennyiségben tartalmaz D-Asp-t, D-Glu-t és D-Ala-t. A felsorolt aminosavakon kívül a tőgygyulladásos tőgyből származó tejből még D-allo-Ile-t, D-Ser-t, D-Pro-t, D-Val-t, D-Leu-t és D-Lys-t is ki tudtak mutatni. A D-aminosavak mennyisége és aránya a masztiteszt-próba fokozatainak megfelelően nőtt a beteg tőgyből származó tejben. Vizsgálatok bizonyították, hogy a kereskedelmi tej D-aminosav-tartalmát az első tejsugarak, illetve a szubklinikai masztitiszben szenvedő tehének teje okozhatja.

Meghatározva az érett ardrahan ír sajt és a camembert sajt 0,5 cm vastag külső rétegének és belső részének, a dán kék, az ementáli, a gouda, a mozzarella, a parmezán és a különböző módszerekkel előállított cheddar sajtok szabad összes aminosav-tartalmát (AS) ioncserés oszlop-kromatográfiával, szabad D-aszparaginsav- (D-Asp-), D-glutaminsav- (D-Glu-) és D-alanin- (D-Ala-) tartalmát nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával, *Csapó* és mtsai. megállapították, hogy a parmezán és

8.1. táblázat. A tej és a savanyú tejtermékek szabadaminosav-tartalma¹ (mg/100 g)

Aminosav	Nyers Pasztőrözött tej		Kefir	Joghurt	Aludt- tej	Friss sajt	Harzer sajt
D-Ala	0,003	0,012	0,31	1,35	0,46	1,07	2,48
D-Asx ³	0,017	0,038	0,35	0,31	0,25	0,38	0,37
D-Glx ³	0,070	0,19	0,50	1,09	0,58	0,75	2,13
D-Val	–	0,03	–	0,04	0,09	–	–
D-Leu	–	0,11	–	0,15	0,16	–	–
D-Lys	–	0,09	–	0,13	0,44	1,49	–
D-allo-Ile ²	–	0,07	–	0,02	–	0,27	–
D-Ser	–	0,02	–	–	–	–	–
D-Pro	–	–	–	–	2,18	–	–
szabad aminosavak (mg/100 g)	3,29	10,3	26,2	28,4	36,8	39,2	159
szabad D-aminosavak (mg/100 g)	0,09	0,24	1,48	2,75	1,63	2,89	8,92

¹ $1 \%D = (D/D+L) \cdot 100$.

² $\%D\text{-allo-Ile} = D\text{-allo-Ile}/(D\text{-allo-Ile} + L\text{-allo-Ile} + D\text{-Ile} + L\text{-Ile})$.

³ Asx = Asp + Asn, aszparaginsavként számolva, Glx = Glu + Gln, glutaminsavként számolva.

a gouda sajt tartalmazza a legtöbb szabad aminosavat (39 000–24 000 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$), a mozzarella és a különböző technológiákkal előállított cheddar pedig a legkevesebbet (2400–7400 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$), a többi sajt szabadaminosav-tartalma pedig 13 000–19 000 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ között változott.

A szabad D-aminosavak közül a D-Asp átlagosan 58 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ (30,3%), a D-Glu 117 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ (15,8%), a D-Ala pedig 276 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ (37,2%) koncentrációban fordult elő a különböző sajtokban. A zárójelben lévő számok a D-aminosavak százalékát mutatják az összes szabad aminosav százalékában. A D-aminosavak mennyiségében jelentős volt a különbség az egyes sajtok között; a D-aminosavak százalékos

8.2. táblázat. Az egészséges és a masztitiszes tehenektől fejt tej szabad D-aminosav-tartalma*

D-aminosav (mg/100 cm ³)	A vizsgált csoportok a masztiteszt-próba alapján				
	negatív	+	++	+++	++++
D-Asp	0,021	0,17	0,23	0,32	0,32
D-Ser	–	–	0,02	0,04	0,04
D-Glu	0,053	0,74	0,99	1,48	1,53
D-Pro	–	–	0,04	0,09	0,10
D-Ala	0,043	0,48	1,13	2,32	2,41
D-Val	–	0,08	0,09	0,09	0,12
D-allo-Ile	–	0,08	0,10	0,12	0,15
D-Leu	–	0,06	0,12	0,17	0,17
D-Lys	–	0,11	0,27	0,36	0,37
szabad D-amino- savak összege	0,117	1,72	2,99	4,99	5,21

* Mindegyik adat 5 tehén tejének átlaga.

összetétele viszont a D-Asp esetében 13,9–46,3%, a D-Glu esetében 10,6–26,6%, a D-Ala esetében pedig 16,1–48,1% között változott (8.3. táblázat). A három D-aminosavon kívül a többi D-aminosav csak nyomnyi koncentrációban, a kimutathatóság határán volt jelen a sajtokban. Nagyobb D-aminosav-tartalmat mértek azoknál a cheddar sajtoknál, ahol az előállítás folyamán laktobacillusokat is használtak.

A mai modern élelmiszer-ipari technológiák különféle eljárások során megváltoztatják a fehérje tulajdonságait azért, hogy javítsák ízét, állagát és eltarthatóságát. Előszeretettel alkalmazzák a hővel és lúggal való kezelést olyan termékek előállítására, amelyek speciális tulajdonsággal, formával és funkcióval rendelkeznek. A szójafehérjét például alkáliakkal és hővel kezelik azért, hogy olyan, rostos szerkezetű terméket kapjanak az extrúzió folyamán, amelyet húshelyettesítőként használhatnak. Hogy a kukoricafehérjéből kukoricapelyhet vagy tortillát kapjanak, szintén lúgos kezelést alkalmaznak. A 8.4. táblázatban a különböző, lúggal kezelt élelmiszerek D-aminosav-tartalma látható a kezeletlen kontrolléhoz hasonlítva.

8.3. táblázat. A különböző sajtok fő** D-aminosav-tartalma ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)

Sajtok	D-aminosavak					
	D-Asp	D-Asp% *	D-Glu	D-Glu% *	D-Ala	D-Ala% *
Érett ardrahan ír sajt külső rétege	74	27,2	173	13,1	433	27,1
Érett ardrahan ír sajt belső része	70	23,2	235	14,4	393	28,2
Camembert sajt külső rétege	42	13,9	122	12,9	334	18,0
Camembert sajt belső rétege	36	14,0	176	14,8	259	16,1
Dán kék sajt	89	31,1	149	20,2	212	42,4
Ementáli	42	26,8	195	26,6	405	45,6
Gouda sajt	61	28,5	244	22,7	462	38,4
Mozzarella	5,2	28,9	9,6	24,0	52	33,3
Parmezán	57	20,8	72	10,6	752	37,3
Kereskedelmi cheddar	74	46,3	45	14,1	96	45,3
Cheddar, 1-es kísérlet	74	43,5	62	12,5	153	46,3
Cheddar, 2-es kísérlet	89	41,4	65	12,4	165	48,1
Cheddar, 3-as kísérlet	59	45,4	53	12,5	161	47,9
Cheddar, 4-es kísérlet	41	33,4	42	10,9	125	46,1

* $D\% = (D / (D+L)) \cdot 100$.

** Az összes D-aminosavat analizálták, de néhány kivételtől eltekintve, az összes többi D-aminosav igen kis koncentrációban volt jelen; ezen D-aminosavak meghatározása bizonytalan volt.

8.4. táblázat. *Különböző élelmiszerek D-aminosav-tartalma (%)*¹

Kezelt termékek (kezeletlen kontroll)	Aminosavak					
	Asp	Ala	Phe	Leu	Val	Met
Pirítós ²	10,5	2,8	2,4	2,7	1,1	1,7
(kenyér)	5,6	2,4	2,3	3,2	0,9	2,3
Extrudált szójaliszt	7,6	2,2	2,4	2,7	0,8	–
(szójaliszt)	4,4	2,5	2,8	1,4	1,0	–
Szójafehérje ³	27,7	9,9	19,7	3,1	1,0	18,2
(kezeletlen)	0,5	0,2	0,5	0,2	0,03	0,3
Zein ⁴	40,2	17,6	31,3	5,0	2,9	19,5
(nem hőkezelt)	3,4	0,7	2,2	0,7	0,4	0,9
Hamburger ⁵	5,5	2,8	2,7	3,2	1,5	2,9
(nyers hús)	6,2	3,2	2,8	3,1	1,6	2,4
Csirkeizom ⁶	22,4	0,5	0,4	0,1	0	0
(nyers csirke)	2,9	0	0	0	0	0
Szalonna 180 °C ⁷	10,7	2,4	3,1	3,1	1,6	–
(hőkezeletlen)	2,4	–	1,8	3,3	0,7	–
Kazein 230 °C ⁷	31,0	12,0	–	7,0	4,4	–
(hőkezeletlen)	3,1	1,5	–	–	–	–

¹ % D-aminosav=(D/D+L) · 100.

² A fehér kenyeret 1 perc 45 másodpercig melegítették, és csak a felszínét elemezték.

³ 3 óra, 65 °C, 0,1M NaOH.

⁴ 4 óra, 85°C, 0,2M NaOH.

⁵ A hamburgert mindkét oldalán 4 percig sütötték. A serpenyő hőmérséklete 250 °C. Csak a felszíni részt analizálták.

⁶ Melegítés 121°C-on, 4 órán át.

⁷ Sütés 20 percig.

A hő vagy a hővel kombinált alkalikus kezelés minden esetben mérhető mennyiségben produkál D-aminosavat. A legnagyobb D-aszparaginsav-tartalma annak a kazeinnek (31%) volt, amelyet 20 percig 230 °C-ra hevítettek fel. A racemizálódott aminosavak összehasonlítása azt mutatja, hogy a racemizáció az aszparaginsavnál a legnagyobb mértékű. Néhány olyan aminosav, amely nincs a táblázatban, mint amilyen pl. a szerin és a cisztein, valószínűleg még gyorsabban racemizálódik az aszparaginsavnál. Általánosságban elmondható, hogy az esszenciális aminosavak nem racemizálódnak gyorsan, csak ha magas hőmérsékletnek

vannak kitéve. *De a magas hőmérséklet és a lúgos kezelés kombinációja az esszenciális aminosavaknál is jelentős racemizációval járhat.*

Más vizsgálatok is a kezelt élelmiszerek nagy D-aminosav-tartalmáról számolnak be. Néhány, kereskedelmi forgalomban kapható élelmiszer D-Asp-tartalmát vizsgálva megállapították, hogy a texturált szójafehérjében (9%), a szalonnában (13%) és a nem tej eredetű zsiradékban (17%) igen magas az aránya. Jelentős mennyiségű D-Asp-t találtak a búzalisztból készült sós kekszben (9,5%), a búzatésztaiban (11,9%), a mexikói palacsintában (11,6%) és a kukoricamáléban (15,4%). A zsírban sült hamburger adatai azt jelzik, hogy a sütés folyamán csak jelentéktelen mennyiségben fordul elő racemizáció ennél a speciális élelmiszernél. A fehér kenyérből készült pirítósnál, a sült szalonnánál és a csirkehúsnál kapott magas D-aminosav-arány azt jelzi, hogy néhány élelmiszernél jelentős mennyiségű racemizáció léphet fel a főzés, illetve a sütés folyamán.

A lúgos hidrolízissel előállított toll-liszt aminosavainak 10–40%-a racemizálódik az előállítási paraméterek függvényében. A tollfehérjét lúgos hidrolízissel fel lehet tárni, és belőle nagy nyersfehérje-tartalmú, kémiai módszerrel meghatározva kiváló emészthetőségű terméket lehet előállítani, azonban ez a termék rendkívül nagy mennyiségben tartalmaz D-aminosavakat az összes rossz és jó élettani hatásukkal együtt.

Újabban a mikrohullámú kezelés hatását vizsgálva az élelmiszer-fehérjékre megállapították, hogy 10 percig tartó mikrohullámú kezelés hatására megnőtt a három vizsgált gyermektápszer cisz-3-, illetve cisz-4-hidroxi-prolin-tartalma, és csak a mikrohullámmal kezelt tápszerek tartalmaztak kimutatható mennyiségben D-prolint. A cisz-izomer koncentrációja 1-2 mg/dm³ volt. Felhívják a figyelmet arra, hogy ha a cisz-izomer épül be a fehérjébe a transz-izomer helyett, akkor ez strukturális, funkcionális és immunológiai változásokhoz is vezethet.

Ipari eredetű élelmiszerek és mesterségesen előállított peptidek

E kategóriába tartozik minden olyan élelmiszer, amelyet jelentős technológiai kezelésnek vetettek alá, vagy amelyet szintetikusán állítottak elő (pl. aszpartám). Néhány folyékony élelmiszerben a fehérjét szénhidráttal kombinálják, aminek során a fehérje jelentős változást szenvedhet. Jelentős D-aminosav-tartalommal bírhatnak az antibiotikum peptidek és néhány, kemoterápiában használt gyógyszer is, amelynek

maradékai jelentős D-aminosav-tartalmat eredményezhetnek az élelmiszerekben. A szintetikus termékek lényegesen több aminosavat tartalmaznak, mint a természetes alapanyagok, és ezek a fő forrásai az élelmiszerek D-aminosav-tartalmának. A szójafehérje alapanyagú folyékony tápszer (amit egyébként az „egészséges” élelmiszerek áruházából szereztek be) 13% D-aszparaginsavat tartalmazott. Ez lényegesen több volt annál, mint amit a szója alapú gyermektápszerben találtak. Beszámoltak arról, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható fogyasztó – súlyvesztést előidéző – tápszerek, amelyeket alkáliákkal kezeltek, 50% D-szerint, 37% D-aszparaginsavat és 26% D-fenil-alanint tartalmaztak, és ez a nagy mennyiségű D-aminosav veszélyes lehet akkor, ha ezeket a tápszereket egyedüli fehérjeforrásként alkalmazzák. Az ilyen, szélsőséges esetek viszonylag ritkák, de azért felhívják a figyelmet arra, hogy alkáliával és hővel huzamosabb ideig kezelt élelmiszer esetében az aminosavak egy jó része racemizáción mehet keresztül.

Az aszpartám édesítőszer racemizációját tanulmányozva beszámoltak arról, hogy mind az aszparaginsav, mind a glutaminsav gyorsan racemizálódott neutrális pH-n és 100 °C-on. A racemizáció akkor fordul elő, mikor az édesítőszer ciklikus dipeptiddé alakul át, ami nagyon hajlamos a racemizációra. Azért fontos ezt tudni, mert ha pl. *főzés előtt adják az édesítőszert az ételhez, az nagymértékben racemizálódhat.*

A D-aminosavak metabolizmusa

Az előzőekben leírtak világosan bizonyítják, hogy D-aminosavak jelentős mennyiségben előfordulhatnak az élelmiszerekben. Mi történik ezekkel a természetestől eltérő sztereoizomerekkel? *Krebs* úttörő munkája óta köztudott, hogy *az emlősök rendelkeznek specifikus enzimekkel a D-aminosavak anyagcseréjére.* A D-aminosavak elsősorban a *D-aminosav oxidáz* reakciósoron metabolizálódnak α -ketosavak keletkezése közben. Ezt követően az α -ketosavak átmehetnek sztereo-specifikus transzamináción, ami az eredeti aminosav L-enantiomerjét eredményezi, amely aztán belép a szokásos anyagcsere-folyamatba, vagy egy másik reakcióban közvetlenül lebomlik, pl. oxidatív dekarboxilálással. A D-aminosavak átalakulása α -ketosavakká elsősorban a vesében megy végbe, így az elfogyasztott D-aminosavaknak először a membránokon kell átdiffundálni, hogy ezen az úton metabolizálódhassanak. A transzportműveletek azonban sztereoszelektívek és diszkriminatívak a D-aminosavakkal szemben.

A különböző aminosavak különböző mértékben oxidálódnak a *D-aminosav oxidázzal*. Az aszparaginsav D-enantiomerje (az az aminosav, amely a vizsgálatok szerint az egyik leghajlamosabb a racemizációra) nagyon rossz szubsztrátja a *D-aminosav oxidáznak*. Ennek ellenére az emlősökben megtalálható a D-aszparaginsavra specifikus *D-aminosav oxidáz*, hiányzik azonban az összes többi aminosavra. Az esszenciális aminosavak, mint pl. a lizin és a treonin, gyorsabban racemizálódnak, mint az alanin, és szintén nagyon rossz szubsztrátjai a *D-aminosav oxidáznak*. A prolin viszont, amely nem racemizálódik jelentősebb mennyiségben az ételkészítés során, a lehető legjobb szubsztrátja annak. Úgy tűnik tehát, hogy *nincs összefüggés a racemizációra való fogékonyság és a D-aminosav oxidázzal adott reakció sebessége között*. Ezért állítható, hogy az emlősök *D-aminosav oxidáz* rendszere nem fejlődött ki olyan mértékben, hogy válaszolni tudjon az ételmi eredetű racemizált aminosavak kihívására. *Krebs* még bizonytalan volt a *D-aminosav oxidáz* biológiai funkcióját illetően, ma azonban már általánosságban az a nézet, hogy a *D-aminosav oxidáz detoxikálja* azokat a *D-aminosavakat*, amelyek véletlenül vagy a baktérium-fehérjén keresztül kerültek be a szervezetbe. Ezt az a tény is megerősíti, hogy azok a patkányok, amelyek csíramentes környezetben nevelkedtek, sokkal kisebb *D-aminosav oxidáz* aktivitással rendelkeznek, mint azok, amelyek normális környezetben nőttek fel. Ennek ellenére az a D-glutaminsav, amely a baktériumok sejtfalában előforduló peptidoglikán alkotórésze, a legrosszabb szubsztrátja a *D-aminosav oxidáznak*, és a *D-aszparaginsav oxidázzal* csak nagyon lassan oxidálódik. Bár a *D-aminosav oxidáz* enzimek képessé teszik az emlősöket a D-aminosavak metabolizálására, ez az út nem hatékony és nyilvánvalóan túlterhelt, mert amikor racém aminosavak kerülnek be a szervezetbe, a *D-aminosavak nagy része a vizeleten keresztül kiválasztódik*. A szabad D-aminosavak *racemázok* segítségével is átalakulhatnak racém keverékké vagy a megfelelő L-aminosavvá. Mivel azonban a *racemázok* elsősorban a baktériumokban fordulnak elő, az emlősökben nem ez az út a D-aminosavak metabolizmusára. Mai tudásunk szerint az aminosav *transzaminázok* is csak a baktériumokban található meg.

Az emberi ételkészítéskor D-aminosavainak fő forrásai az iparilag előállított fehérjék. Mielőtt az ezekben levő D-aminosavak metabolizálódnának a *D-aminosav oxidáz* reakciósoron, először szabaddá kell válniuk a metabolikus enzimek segítségével. Az ételkészítés-fehérjék emésztése az első lépésben szabad aminosavakat és kis tagszámú peptideket

eredményez, majd a peptideket a *peptidázok* hidrolizálják tovább. Teljesen nyilvánvaló, hogy a *D-aminosavat tartalmazó peptidek ellenállnak az enzimés hidrolízisnek* az emésztés folyamán. Szintetikus peptidekkel végzett tanulmányok jelzik, hogy a D-aszparaginsav és a D-metionin még akkor sem szabadul fel a peptidkötésből az enzimés hidrolízis során, ha a mellettük lévő összes többi aminosav L-enantiomer. Számos közlemény számol be arról, hogy a hő- és az alkálikezelés hatására nagymértékben racemizálódott aminosavak ellenállnak a proteolitikus hidrolízisnek. A fenil-alanin racemizációja és a fehérje emészthetősége közti összefüggést tanulmányozva megállapították, hogy a racemizáció növekedésével az emészthetőség rohamosan csökken. Mivel a fenil-alanin lassabban racemizálódik, mint az aszparaginsav, a szerin vagy a cisztein, nyilvánvaló, hogy az a fehérje, amely jelentős mennyiségben tartalmaz racemizált aminosavakat, csak részben bomlik le a proteolízis folyamán.

A fehérjék proteolitikus hidrolízisének termékei tartalmaznak racemizált aminosavakat és D-aminosav-tartalmú, kis molekulatömegű peptideket. A di- és tripeptidek keresztüldiffundálnak a membránon, míg a jelen lévő nagyobb tagszámú peptidek egyszerűen kiválasztódnak a bél-sár útján. A D-aminosav-tartalmú di- és tripeptidek nem jó szubsztrátjai a *D-aminosav oxidáznak*. A dipeptidek in vitro körülmények között, 7-es pH-n gyorsan ciklizálódnak ciklikus peptidekké (diketopiperazinná). A tripeptidek pedig gyorsan hidrolizálódnak nem enzimatikusan, in vitro, egy belső ammonolízissel, mely során ciklikus dipeptidek és szabad C-terminális aminosavak keletkeznek. A ciklikus dipeptid igen fogékony az in vivo racemizációra, így amennyiben a hidrolitikus folyamat in vivo is előfordulna, akkor az más D-aminosavak előfordulásához is vezethetne. A D-aminosavak metabolizmusát tanulmányozva azonban eddig még nem figyeltek fel a diketopiperazin jelenlétére.

A D-aminosavak emésztése

A racemizált aminosavakat tartalmazó fehérjék hosszú időn keresztül fogyasztásának hatása az emberi és az állati szervezetre még nem eléggé ismert. Rámutattak arra, hogy senki sem végzett specifikus kísérletet a racemizált aminosavaknak az élő szervezetre kifejtett hatásáról, arról, hogy hogyan hat a racemizáció az emészthetőségre és az aminosav hozzáférhetőségére.

A D-aminosavak káros hatásai

A fehérjében kötött D-aminosavak hasznosulása attól függ, hogy a D-aminosavak felszabadulnak-e az L-D, D-L és D-D kötésekből, és hogy a felszabadult D-aminosavak hatékonyan át tudnak-e alakulni L-aminosavakká. A XX. század elején megfigyelték, hogy a lúggal kezelt kazein nagy része emésztetlenül távozott a kutyák bélsarával. Ezt követően többen meghatározták az alkáliával kezelt, illetve nem kezelt fehérje emészthetőségét. Minden alkalommal csökkent emészthetőséget figyeltek meg a kezelt mintáknál, amelyet elsősorban a racemizációval és/vagy a lizinoalanin kialakulásával magyaráztak. A lúggal kezelt fehérjékben lévő aminosavak racemizációját tanulmányozva beszámoltak arról, hogy *kismértékű racemizáció is nagymértékű emésztéscsökkenést idéz elő*. A csökkent emészthetőséget azzal magyarázták, hogy a racemizálódott aminosavak nem szubsztrátjai a *proteázoknak*, és hatással vannak a nem racemizálódott szomszédos aminosavak felszabadíthatóságára is. Így néhány aminosav racemizációja lényeges veszteséget okozhat a környező esszenciális aminosavak tekintetében is, csökkentve a fehérje proteolitikus emészthetőségét.

Vizsgálták a hőmérséklet, az idő és a pH hatását a lúggal kezelt kazein *tripszin* és *kimotripszin* emészthetőségére. Megfigyelték, hogy miközben az aszparaginsav és a fenil-alanin emészthetősége csökken, a lizinoalanin-keresztkötések és a racemizáció nő. E kísérletek során szét tudták választani a racemizáció és a keresztkötések hatását az in vitro emészthetőségre. Megállapították, hogy *a csökkent emészthetőséget elsősorban a racemizáció okozza*. Egy D-aminosav már alkalmatlanná teszi a peptidet a szállításra. A racemizáció az, ami egyedül csökkenti az in vitro emészthetőséget és az enzimatikusan emésztett fehérje in vivo felvételét.

Nagyon fontos kérdés, hogy vajon az élelmiszerekben lévő *D-aminosavak toxikusak-e*. Az rögtön az elején megállapítható, hogy a különböző D- és L-aminosavak egyforma akut toxicitással rendelkeznek, amit LD₅₀ értékük is bizonyít. Kivételt képez talán a D-prolin, amelyről nagyobb letalitást állapítottak meg a csirke esetében, mint az L-prolinról. Az már az előzőekből ismert, hogy a D-prolin a legjobb szubsztrátja a *D-aminosav oxidáznak*, néhány D-aminosav pedig hosszú időn keresztül fejt ki toxicitását. Vizsgálatok szerint a táplálékban lévő D-szerin, lizinoalanin és a különböző, lúggal kezelt fehérjék káros elváltozást idéztek

elő patkányok veséjében. A szabad lizinoalanin sokkal nefrotoxikusabb, mint a peptidkötésben lévő, ebből következően a lúggal kezelt fehérjékben található kötött lizinoalanin nefrotoxikus hatása lényegesen kisebb. A patkányok különösen érzékenyek a lúggal kezelt fehérjék és a lizinoalanin nefrotoxikus hatására, és a vizsgálatokból kitűnik, hogy a különböző állatfajok különböző érzékenységgel rendelkeznek e tekintetben.

A lizinoalanin és a lúggal kezelt fehérjékben lévő D-alanin *in vitro* inhibitorai a *karboxi-* és *aminopeptidázoknak*. A lizinoalanin részéről a gátlás úgy nyilvánul meg, hogy komplexet alkot az enzim enzimreakcióban részt vevő fémionjával. Azt, hogy vajon a táplálékeredetű lizinoalanin és a D-aminosavak inhibitorai-e a metabolikus enzimeknek, még nem vizsgálták, és még arra sincs adat, hogy a hosszú idejű kezelés milyen hatással van az inhibícióra.

A D-aminosavak hasznos hatásai

A D-aminosavak által okozott csökkent emészthetőség az élelmiszer-fehérjékben bizonyos esetben előnyös lehet élelmezési szempontból, feltéve, hogy a proteolitikus emésztés után visszamaradó anyagok nem toxikusak. Néhány napig alkalmazni lehet a racemizált fehérjéket fogókúrás kezeléseknél, és az igen alacsony emészthetőség miatt rövid idő alatt jelentős súlycsökkenést lehet remélni. A D-fenil-alaninról és a D-leucinről kimutatták, hogy fájdalomcsillapító hatással rendelkeznek, és ezért makacs fájdalmak esetén használják is őket. A fájdalomcsillapító hatás azon alapszik, hogy inhibiálják a *karboxipeptidáz A-t* és a hozzá hasonló enzimeket, amelyek részt vesznek az opioid pentapeptid lebontásában az agyban és a gerincvelőben. Beszámoltak arról, hogy az alkáliákkal kezelt élelmiszer-fehérjék lizinoalanin- és D-aminosav-tartalma szintén inhibiálja a *karboxipeptidáz A-t*. Ezek a kutatási eredmények arra engednek következtetni, hogy a racém aminosavak jelenléte az élelmiszer-fehérjében hasznos lehet a fájdalom megszüntetésére.

Azt már régebb óta jól ismerjük, hogy a legtöbb antibiotikum-peptidnek van D-aminosav szekvenciája. Elképzelhető ezért, hogy a racemizált élelmiszer-fehérjék proteolitikus lebontása folyamán olyan peptidok keletkeznek, amelyek antibiotikus tulajdonságokkal rendelkezhetnek.

A FEHÉRJEHASZNOSULÁST BEFOLYÁSOLÓ ANTINUTRITÍV ÉS MÉRGEZŐ ANYAGOK

9.1. Antinutritív anyagok

Élelmiszerekben minden olyan növekedésgátló, illetve lassító komponens antinutritív anyagnak tekinthető, amelyek a tömeggyarapodás megzavarásán kívül szemmel látható, kóros tüneteket nem okoz. Az antinutritív anyagok a fehérjék hasznosulását még akkor is rontják, ha annak aminosav-összetétele és in vitro emészthetősége kedvező. Az *antinutritív anyagoknak* rendszeres *fogyasztása* az egyéni érzékenységtől függően kisebb-nagyobb mértékű *egészségkárosodáshoz vezethet*.

Az antinutritív anyagok tanulmányozása az utóbbi időben azért került előtérbe, mert egyrészt egyre több antinutritív anyagot fedeznek fel, másrészt pedig az állati eredetű fehérjék helyett egyre inkább a magas fehérjetartalmú, pillangósvirágúakhoz tartozó, növényi eredetű fehérjék kerülnek előtérbe. A növénynemesítés során a bruttó hozam és a beltartalmi mutatókon kívül ritkán vizsgálják az esetleges antinutritív anyagok jelenlétét, ezért az antinutritív anyagokban gazdag növények elterjedésére is számítani lehet. A monogasztrikus állatoknál a fehérjeszükséglet kielégítésére zöldsizteteket vagy vegetatív növényi részekből származó fehérjekoncentrátumokat is használnak, melyek nagyobb mennyiségben fogyasztva antinutritív hatással bírhatnak.

A nyers szójamag huzamosabb etetése a legtöbb állatban leállítja vagy lassítja a növekedést, a hőkezelt, főzött vagy gőzölt magfehérje viszont jól hasznosul, és az állati eredetű fehérjékhez hasonlóan magas biológiai értékű. A tripszingátlást, illetve proteázgátlást több mint 80 éve ismerjük. A szójából eddig több mint tízféle proteázgátló anyagot mutattak ki, melyek hőérzékenysége különböző. A fiatal szervezet növekedését erőteljesen gátolják, a kifejlett szervezetre azonban hatásuk mérsékeltebb. Jelenlétükben a *tripszin* nem tudja a bázikus pontokon a fehérjeláncot hasítani, hisz az inhibitor a *tripszinhez* sztöchiometrikusán kötődik.

A hőérzékeny antinutritív anyagok közé tartoznak a tripszin- és kimotripszin-inhibitorok, amelyek összetételüket tekintve fehérjék, és elsősorban hüvelyesek magvaiban, továbbá gabonamagvakban és burgonyában képződnek. Molekulatömegük 6–64 ezer dalton között van. Egy növényben egyidejűleg többféle antinutritív anyag is jelen lehet. A burgonyában például legalább 10 inhibitor van jelen, amelyek molekulatömegükben, izoelektromos pontjukban és hőstabilitásukban különböznek egymástól. A tripszin- és kimotripszin-inhibitorok a vékonybélben a tripszinnel és a kimotripszinnel inaktív komplexeket képeznek, ezáltal a táplálékkal felvett fehérjék hidrolízisét, hasznosulását korlátozzák. Jelenlétükkel a hasnyálmirigyet fokozott működésre készítetik, ami végül hasnyálmirigy-megnagyobbodásra, majd -gyulladásra vezethet. Ezeket az inhibitorokat hőkezeléssel inaktíválni lehet. Termikus stabilitásuk függ a molekula méretétől és a diszulfidhidak számától. Az egyik legstabilabb tripszininhibitor a szójában lévő Bowman–Birk-féle, amelynek molekulatömege 7900 dalton, 71 aminosavból épül fel, és hét diszulfidhidat tartalmaz (9.1. ábra). Szárazon hevítve 105 °C-on, vizes oldatban 10 perces forralás után is megőrzi aktivitásának nagy részét. Az ugyancsak a szójából izolált Kunitz-féle tripszininhibitor lényegesen hőlabilisabb; 90 °C-nál irreverzibilisen denaturálódik, molekulatömege 21 500 dalton, 181 aminosavból áll, és két diszulfidkötést tartalmaz.

A proteázinhibitorok fajlagossága rendkívül változatos. Specifikusságuk a különböző proteázokra és az izodinámiás enzimekre (azonos hatás, de más eredet) is kiterjedhet. Ezekkel szemben ismerünk olyan inhibitorokat is, amelyek kétféle enzimet, pl. a tripszint és a kimotripszint is hatástalanítják. Ilyen anyag például a Bowman–Birk-inhibitor; a burgonyában lévő antinutritív anyagok viszont csak a szerin-proteázokat gátolják.

A proteolízis gátlásán keresztül a nitrogén emészthetősége a hasnyálmirigy-stimuláló hatásra csökken, annak hiperszokréciónja miatt endogén nitrogénvesztés következik be, fokozódik a metionin cisztinné történő konverziója, mely metioninhiányhoz vezet. A tripszininhibitor a fehérjével emészthetetlen komplexeket alkothat, mely még kielégítő proteolitikus aktivitás esetén is a nitrogénemészthetőség csökkenéséhez vezet. Az inhibitor emészthetetlen endogén fehérjekomplexeket is létrehozhat, mely fokozott endogén fehérjevesztéssel jár. Mivel az inhibitor a hasnyálmirigy által termelt tripszint teljes mértékben leköti, a negatív visszacsatolás hiánya miatt a hasnyálmirigy hiperszokrécióna kényszerül.

9.1. táblázat. *Egyes élelmiszerek tripszinhibitor-aktivitása*

Megnevezés	TIU/mg minta
Nyers szója	104
Extrudált szója	20
Texturált szója	2
Szójaizolátum (Purina)	4
Fehér bab	20
Barna bab	12
Fekete bab	7–8
Lóbab	12
Lencse	3
Sárgaborsó	2–3
Búzaliszt	2–3
Búzakorpa	1,5–2

9.2. táblázat. *Néhány élelmiszer fitinsavtartalma*

Megnevezés	Fitinsav, g/100 g
Búzaliszt	0,05–0,2
Búzakorpa	1,5–1,6
Búzacsíra	0,08–0,09
Barna kenyér	0,14
Sárgaborsó	1,1–1,2
Lencse	0,5–0,8
Bab	0,7–2,0
Szója	1,1–1,5
Szójaizolátum (Purina)	0,4
Texturált szója	0,9–1,1

formába jutnak a vastagbélbe, ahol a bélflóra baktériumai hidrolízisüket követően gázok (szén-dioxid, hidrogén, metán) keletkezése közben bontják le őket, *kellemetlen felfúvódást, hasi puffadást okozva*. E csoportba tartoznak még a *favizmusfaktorok*, mint amilyen például a lóbabban található *vicin* és *konvicin*. Ezen anyagok a vörösvértesteket irreverzibilisen károsítva *hemolitikus anémiát okoznak*.

A különböző *cseranyagok* növényekben képződnek, és kémiai összetételüket tekintve nagyon változatosak. A tápcsatornába jutva, *fehérjeki-csapó tulajdonságukkal gátolják a fehérjék emészthetőségét*. A cseranyagok hüvelyesek és cereáliák magvaiban, egyes hüvelyesek leveleiben, valamint a szőlő termésében találhatóak. Hőállóak, ezért még kétórás főzés után is megmarad az eredeti cseranyagtartalom fele.

A *fitoösztrogén* anyagok közös élettani hatásuk alapján kerültek a *hőrezisztens antinutritív anyagok* közé. Az ösztrogén anyagok befolyásolják a szexuálhormonális egyensúlyt. Szójatartalmú ételek rendszeres fogyasztása esetén például lényegesen több ösztrogénaktivitású anyagot viszünk be a szervezetünkbe, mint ami a húsipari termékekben a hozamfokozók következtében előfordulhat. Az ösztrogének vizes-alkoholos mosással eltávolíthatók a szójából.

A *lektinek* olyan növényi eredetű *fehérjék, illetve glikoproteinek*, amelyek az emberi vérben a *vörösvértesteket kicsapják, agglutinálják*. Kevés kivételtől eltekintve glikoproteinek, amelyek molekulatömege 20–140 ezer dalton között van. Fehérjerészüik főként dikarbon- és hidroxiaminosavakból épül fel, és nem tartalmaznak metionint. *Az emésztőcsatorna proteázai nem képesek lebontani őket*. A szénhidrát rész glükóz-, mannóz-, arabinóz-, xilóz- és hexózamin-részeket is tartalmaz, amelynek aránya a molekula tömegének 4–5%-a. A magasabb rendű növényekben, elsősorban *a hüvelyesek és gabonák magvaiban, több száz lektint mutattak ki*. A babból és a ricinusból származó lektin mérgező, a borsóban található viszont nem. *A toxikus változatok gátolják a tápanyagok felszívódását a bélfal sejtjeiben, akadályozva ezzel a sejtek fehérjeszintézisét (antinutritív hatás)*. A mérgezés rosszulletet, hasi panaszokat és merevgörcsöt okoz, és súlyosabb esetekben halálos is lehet. *A vegyületek hőlabilisak, 10–15 perces főzés vagy sütés hatására denaturálódnak, mérgező hatásukat elvesztik*.

A *fazin* a kerti bab magvaiban található *toxikus lektin*. Akkor okoz mérgezést, ha valaki zöldbabot, babot vagy bablisztet nyersen eszik. A fazin 98–138 ezer dalton molekulatömegű glikoprotein, amelynek

szénhidrát részében glükózamin és mannóz található. A *ricin* (amely a ricinin alkaloiddal együtt idézi elő a toxikus hatást) két peptidláncból áll, amelyek S–S kötésekkel keresztül kapcsolódnak egymáshoz. Az egyik alegységet haptomernek nevezik, amely a *meztámadott szervezet sejtjeinek felületén a galaktóztartalmú glikozidokhoz kötődik*. Ez lehetővé teszi a másik peptidlánc, az effektor alegység behatolását a sejtbe, amely ott a fehérjeszintézist gátolja. Halálos adagja egerekre csupán 12 μg /testtömeg-kg.

A természetben előforduló mérgező glikozidokat a cukorrészhez kapcsolódó aglikon kémiai szerkezete, összetétele alapján csoportosíthatjuk. A *szteránvázis glikozidok* csoportjában az *aglikon lehet egyszerű szteránvázis vegyület, nitrogéntartalmú szteroid-alkaloida, vagy a szteránvázissal rokon triterpénvázis*. Az e csoportba tartozó toxikus vegyületek közül a szolanin, a tomatin és a szaponinok a legismertebbek. A *szolanin* az egyes burgonyafélék szerveiben keletkező, mérgező anyag. A közönséges burgonya gumói általában csak 0,002–0,01% között tartalmaznak szolanint, ami emberre és állatra egyaránt ártalmatlan. Mérgezési veszély éretlen, zöld vagy öreg, világos helyen tárolt kicsírázott burgonya elfogyasztásakor áll fenn, mert az ilyen burgonya szolanintartalma elérheti a 0,06%-ot. A burgonyacsírában a koncentráció akár egy nagyságrenddel is több lehet, ezért a mérgezés elkerülésére *a zöld héjú vagy kicsírázott burgonyát főzés előtt vastagon meg kell hámozni*, mert a szolanin főként a gumók felületén koncentrálódik. A főzéshez sok vizet kell használni, és a főzővizet ki kell önteni.

A *tomatin* a paradicsomnövény gyökerében és levelében található, *gombaellenes és bakteriosztatikus glikozid*, amelynek oldatával lepermetezett burgonyalevelet a burgonyabogár lárvái sem eszik meg. *Aglikonja egy szteroid-alkaloida, a tomatidin*, amelynek cukorrésze egy tetraszacharid.

A *mustárolaj-glikozidok* (szinigrin, szinalbin) olyan glükozinolátok (tioglikozidok), amelyek a fekete és a fehér mustár magjában, a tormában, a repcében, a vöröshagymában, a karalábéban és még néhány káposzta- és répafajtában keletkeznek. Enzimes hidrolízissel mustárolajra, glükózra és kálium-hidrogén-szulfátra bonthatók.

A mustárolaj-glikozidok *nagyobb koncentrációban* mind az *emésztőrendszeren*, mind a *bőrfelületen keresztül izgató, mérgező anyagok*. A mustárolaj-glikozid-tartalmú növényekből előállított élelmiszerek rendeltetésszerű használata azonban veszélytelen. Néhány glükozinolátból *goitrin* (5-vinil-2-tio-oxazolidon) nevű vegyület szabadul fel,

amely gátolja a pajzsmirigyben a jódfelvételt, és ezáltal a hormontartalmú tiroxin képződését. Ez a folyamat jódszegény étrend esetén golyva kialakulásához vezethet.

A különböző vegetatív növényi részekből előállított zöldsiztek és levélfelhérje kivonatok monogasztrikus állatokkal etetve növekedési depressziót okoznak, mely elsősorban a szaponinok és a fenolos szerkezetű vegyületek antinutritív hatásának tulajdonítható. A *szaponinok* a növényvilágban nagyon elterjedt glikozidok, amelyek vízben kolloidálisan oldódnak, és *felületi feszültséget csökkentő hatásuk miatt szappanszerű habot képeznek*. Aglikonjuk felépítése alapján lehetnek szteránvázat tartalmazó *szteroid-szaponinok* és kisebb jelentőségű, öttagú gyűrűt tartalmazó *aliciklusos triterpénszármazékok*. A szaponinok a vérbe kerülve mérgező hatásúak, mert *a vörösvérsejteket feloldják*. Az emésztőcsatornán keresztül kevésbé veszélyesek, mert *a koleszterinnel oldhatatlan, nem mérgező komplexeket képeznek*. A szójalisztkben lévő keserű szaponinok rossz ízűek, és gátolják az emésztőcsatorna *tripszin- és kimotripszin-aktivitását*. A szója szaponinmentesítését nedves állapotban való hevítéssel, gőzöléssel és alkoholos extrahálással lehet elvégezni. A konkoly és a vadgesztenye is jelentős szaponintartalmú. Szaponinok vannak továbbá a szappangyökérben és az édesgyökérben is. A szappangyökér az ipari szaponinkészítmények nyersanyaga. *Az édesgyökér szaponinja, a glicirizin, nem mérgező*, a medvecukor, valamint egyes keserű gyógyszerek, továbbá alkoholos italok édesítőszerre.

A takarmány szaponintartalma a sertésben az endogén nitrogénvesztesség fokozódásához, baromfiban pedig a koleszterin-anyagcsere megzavarásához vezet. A virágzás előtt kaszált lucernából készített fehérjekoncentrátumok huzamosabb etetése esetén annak szaponintartalma antinutritív hatással lehet a sertés és a baromfi esetében. Ennek következtében bélgyulladás állhat elő, a kérődzőkben pedig felfúvódással, illetve bendőfermentációs rendellenességekkel hozták összefüggésbe a takarmány szaponintartalmát; kifejlett kérődzőkben azonban szerepe csekély.

Fenolos szerkezetű antinutritív anyagok olyan ciklikus szerkezetű vegyületek, amelyek valamely fenolra jellemző reakcióval kimutathatók. Közéjük tartoznak például a flavonoidok, a kumesztán-, a rezorcínol-, illetve a pirokatechol típusú vegyületek, mely utóbbiak a növényi sejtek roncsolódásakor vagy szárításnál oligomerekké kondenzálódnak, majd *polifenoloxidáz* hatására polifenolokká, illetve kinoidális formákká oxidálódhatnak. Ezeknek a vegyületeknek különleges biológiai hatásuk

nincs, a fehérjeemésztést mégis befolyásolják, hisz *az enzimek hozzáférhetőségét a fehérjemolekulához rontják*. Ezen vegyületeknek tulajdonítható a lucernából előállított levélfehérjék magas lizintartalmának kis hozzáférhetősége, és ugyancsak ez okozza az arginin kedvezőtlen hozzáférhetőségét is. A kinoidális formák kialakulásának és a fehérjékhez való irreverzibilis kapcsolódásnak a magas kicsapási, illetve szárítási hőmérséklet is kedvez.

Az antinutritív anyagok hatásának kiküszöbölésére az alábbi eljárásokat célszerű alkalmazni. A sok szójadarát fogyasztó sertés és baromfi esetében az átlagos ipari tósztolás elegendő az antinutritív hatás minimális szintre csökkentéséhez, melynek során ügyelni kell arra, hogy a túlzott hőkezelés ne vezessen a fehérje biológiai értékének csökkenéséhez. A szójaalapon készült csecsemőtápszereket, valamint a malac és borjú tejpótlására használt termékeket csak forró gőzzel való tósztolással előállított szójából lehet készíteni. Ha a szója kizárólagos fehérjeforrás, a fitinsavhatás kompenzálására is gondolni kell. Repcedara esetében az antinutritív anyagok koncentrációjának ismeretében megállapított maximális arányt nem szabad túllépni.

Zöldlisztek, a vegetatív növényi részekből készült fehérjekivonatok és izolátumok aminosav-tartalmának gyenge hasznosulása a szaponinok és a polifenolok depresszív hatásának tulajdonítható, így ezeket az anyagokat egygyomrúak takarmányozására csak korlátozottan lehet felhasználni. Minden olyan alapanyag esetében, amelyekben antinutritív anyagokat sejtünk, azok koncentrációjának ellenőrzésére laboratóriumi vizsgálatokat kell végezni, illetve a fehérje PER vagy biológiai értékét állatkísérletekkel meg kell határozni.

9.2. Mérgező anyagok

Az élelmiszer-tudomány számára ma már nemcsak a nyersanyagok természetes mérgező komponensei és a megromlott táplálékban lévő toxinok, hanem a környezetből származó idegen, mérgező hatású anyagok is gondot jelentenek. *Minden olyan anyag mérgező, amely már kis adagban is ártalmas, tehát átmenetileg vagy tartósan kóros állapotot alakít ki, és amely súlyos esetben halált is okozhat.* A mérgező anyagok a feldolgozott nyersanyagok természetes alkotórészeiként, a káros mikroorganizmusok toxinjaiként, a vegyszeres növényvédelem maradékaiként, a rosszul

alkalmazott technológia során a berendezésről vagy a környezetből eredő szennyezésként juthatnak a szervezetbe. Nem tartoznak kifejezetten az antinutritív anyagok közé, de röviden mégis itt célszerű tárgyalni őket, hisz jelenlétükben a fehérje hasznosulása csökkenhet. A mérgező anyagok közül nagyon sok peptid-, illetve fehérjeszerkezetű, tárgyalásuk ezért is feltétlenül indokolt.

A mérgező anyagok a *tápcsatornán, valamint a légutakon és a bőrfelületen keresztül juthatnak be a szervezetbe*. Akkor károsak, ha felszívódnak; minél kisebb adagban okoznak mérgezést, annál erősebb mérgek. A mérgező tulajdonság számszerű kifejezésére az LD_{50} érték (letális dózis) szolgál, amely azt a *milligrammban kifejezett, szájon keresztül beadott méregmennyiséget jelenti testtömeg-kg-ra vonatkoztatva, amelytől a kísérleti állatok 50%-a elpusztul*. Az LD_{50} alapján (mg/kg) az egyes mérgező anyagok a következőképpen csoportosíthatók:

- 1–50 erős mérgező, jelölése: +++,
- 51–500 mérgező, jelölése: ++,
- 501–5000 gyenge mérgező, jelölése: +,
- 5000 feletti mérgezőjelzés nélküli anyag.

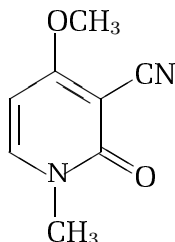
Vannak azonban olyan mérgezőanyagok is, amelyek az LD_{50} értékénél kisebb mennyiségben olyan irreverzibilis változásokat okoznak, amelyek az anyag kiürülése után is megmaradnak, és *ismételt bevitel esetén a károsodás összegződik*. Más anyagok a különböző szövetekben elraktározódhatnak, újabb adag felszívódásával a mérgező felhalmozódik, és bizonyos szint után mérgezés lép fel.

A mérgezőanyagokkal kapcsolatban kialakultak azok a *tűrési határértékek*, amelyek az egyes élelmiszerekben a még elfogadható toxintartalmat jelentik. Ez a mérgezőanyag mennyiség országonként különböző. A megengedettnél több mérgező anyagot tartalmazó élelmiszerek *detoxikálása* (mérgetelenítése) *csak ritkán eredményes*; az esetek többségében az ilyen tételeket meg kell semmisíteni, mert takarmányozási célra sem használhatók.

A toxikus vegyületek *kémiai szerkezetük alapján lehetnek alkaloidok, aminosav-származékok, illóolajok, valamint antinutritív anyagok*. Ezen utóbbiak, amint az előző fejezetben volt róla szó, nem közvetlenül mérgező hatásúak, de rendszeresen bejutva a szervezetbe, kóros elváltozásokat okoznak.

Az alkaloidok közül a *ricinin* a ricinusnövény magjában lévő mérgező, piridinvázis alkaloid, amely ugyancsak a ricinusmagban előforduló mérgező fehérjével, a *ricininnel* együtt okoz hányást és rosszulétet (9.2.

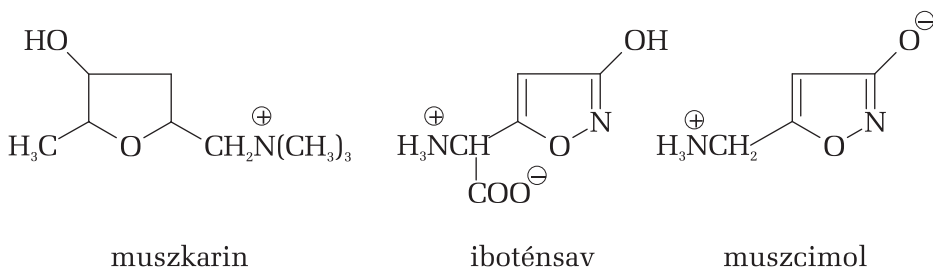
ábra). A ricinusmagolaj méregmentes, a ricinin és a ricin az olajpogácsában marad vissza, amelyet ezért állati takarmányozásra csak különleges hőkezelés után lehet használni.



9.2. ábra. A ricinin

A különböző csillagfürtfajok magvaiban mintegy húszféle keserű ízű mérgező *lupin-alkaloidot* találtak. Ezek *kis mennyiségben izgatják a simaizmokat, nagyobb mennyiségben viszont bénító hatásúak. Közülük a lupinin, a lupanin, a spartein és az angusztifolin a legfontosabb.* A csillagfürt keserű ízű magvai táplálkozási és takarmányozási célokra alkalmatlanok, és az utóbbi időben kidolgozott méregtelenítési és kesertelenítési eljárások (gőzölés, pörkölés) sem vezettek megfelelő eredményre. Az elmúlt évtizedekben azonban nemesítéssel sikerült *alkaloidamentes édes csillagfürtöt* nemesíteni, amelynek dióízű lisztje egyes édesipari termékek készítésekor hasznosítható.

Európában több mint 160 olyan gombafaj fordul elő, amelyek nyersen fogyasztva mérgezőek, és nagyobbik részük hőkezeléssel sem méregteleníthető. A *gombamérgek* kémiai összetételük szerint *lehetnek alkaloidok* (9.3. ábra), mint amilyen pl. a légyölő galócában és más, mérgező gombákban található *muszkarin, iboténsav és muszcimol*. A muszkarin az idegrendszerre hat, a mérgezés tünetei 20–30 perces lappangási idő

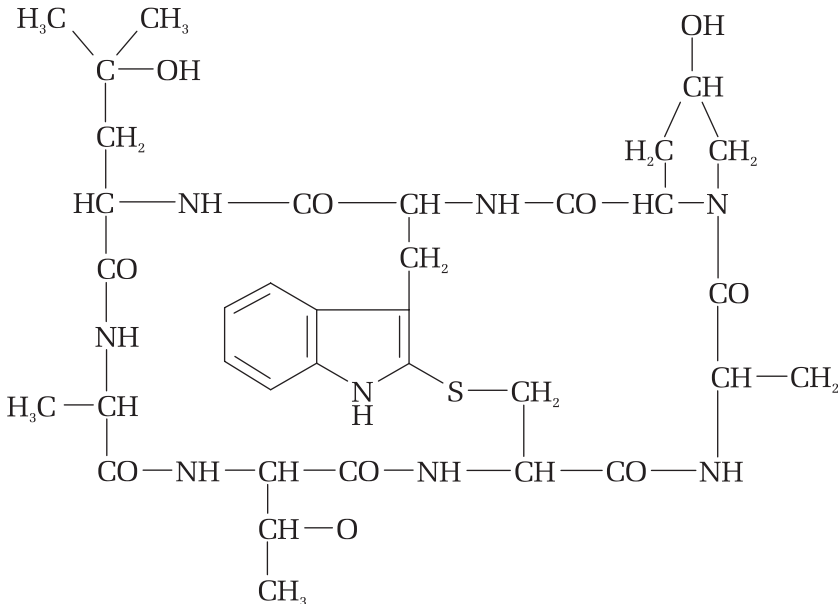


9.3. ábra. Gombaalkaloidok

után izzadás, hányinger és hasmenés formájában jelentkeznek. A muszkarin szerkezetileg hasonlít a kolinhoz, így zavarja az idegingerek átvitelénél fontos kolin–acetyl-kolin átalakulást, és nagyobb mennyiségű mérég szervezetbe kerülése esetén halálos is lehet. Az iboténsav és a muszcimol izooxazol-származékok.

A mérgező aminosav-származékok csoportjába a legveszélyesebb ciklopeptid gombamérgek tartoznak. A *fallotoxinok* gyorsabban ható, de kevésbé mérgező anyagok, az *amatoxinok* lassabban ható, de erősebb mérgek. Az ellenük való védekezést megnehezíti, hogy a mérgezési tünetek csak a mérég felszívódása után 6–30 óra múlva jelentkeznek. A mérgezés elsősorban a májat és a vesét károsítja.

A *fallotoxinok* a *gyilkos galóca* gyorsan ható toxinjai. A falloidin csoportba tartozó gombamérgek: a *falloin* (9.4. ábra), a *falloidin*, a *fallacidin* és a *fallin*. A falloin kettős gyűrűt alkotó, hét aminosavból álló peptid, amelyek közül azonban csak négy tartozik a fehérjeeredetű aminosavhoz, a másik három D-konfigurációjú. Ezek az α -aminosavak önmagukban természetesen nem, csak gyűrűvé kapcsolódva mérgezőek. Az aminosav gyűrűt olyan tioéterkötés hidalja át, amely egy triptofán és egy cisztein között alakul ki. Mérgező hatására jellemző, hogy

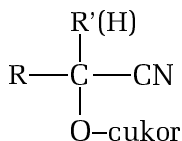


9.4. ábra. A falloin

az egereken mért LD₅₀ értéke 1–2 mg/kg. A mérgezőhatást fokozza, hogy a szervezetben való lebontódása rendkívül lassú, hisz *az emésztőenzimek a zárt peptidláncot nem tudják megbontani*, a toxint hatástalanítani.

Az *amatoxinok* szintén a *gyilkos galócában* keletkező, *legerősebb gombamérgek*, amelyek hatása csak hosszabb lappangási idő után jelentkezik. Kémiai szerkezetüket tekintve közönséges és különleges aminosavból felépített, *nyolc tagból álló ciklopeptidek*. Mind a falloidinok, mind az amanitinok *hőállóak*, ezért *főzéskor sem inaktíválódnak*, metil-alkohollal azonban a gyilkos galócából kivonhatók. Az amatoxinok veszélyességét jellemzi, hogy egyetlen gyilkos galóca elfogyasztása is halált okozhat.

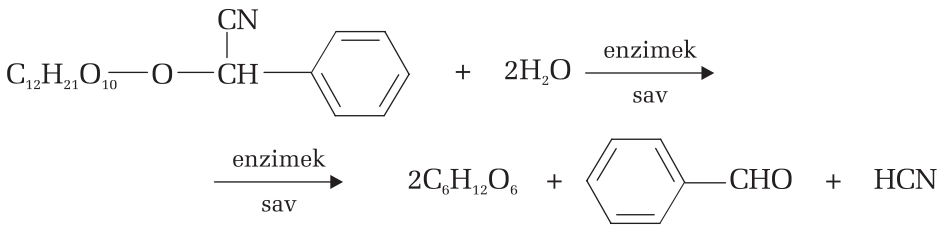
A természetben előforduló *mérgező glikozidokat* a cukorrészhez kapcsolódó aglikon kémiai szerkezete, összetétele alapján csoportosíthatjuk. A *ciántartalmú glikozidok* (9.5. ábra) savas vagy enzimes hidrolízissel aldehidre vagy ketonra, cián-hidrogénre és egy vagy két molekula cukorra bonthatók. Legismertebb képviselői ennek a mérgező vegyületcsoportnak az *amigdalín* és a *fazeolunatin*.



9.5. ábra. A ciántartalmú glikozidok szerkezete

Az *amigdalín* a keserű mandula magvaiban keletkezik, ahonnan az elnevezést is kapta. Megtalálható a csonthéjas gyümölcsök és a citrusfélék magvaiban; híg savval főzve vagy enzimek hatására két molekula glükózra, benzaldehidre és *cián-hidrogénre bomlik*. A keserű mandula fogyasztása után fellépő mérgezés az amigdalínból a gyomorsav hatására felszabaduló cián-hidrogén következménye (9.6. ábra). A természetben *az amigdalint mindig bontóenzimek kísérik*, ezért a fenti átalakulások a mandula felaprított és vizes szuszpenziójában is lejátszódnak. A csonthéjas gyümölcsökből főzött pálinkák csekély HCN-tartalma az amigdalín enzimikus lebontásának következménye.

A *fazeolunatin* a holdbab, a rangunbab és a len magvában található ciántartalmú glikozid. Savas és enzimes hatásra cián-hidrogén válik belőle szabaddá. A holdbabnak csak nemesített fajtáit használják étkezési



9.6. ábra. Az amigdalin lebontása

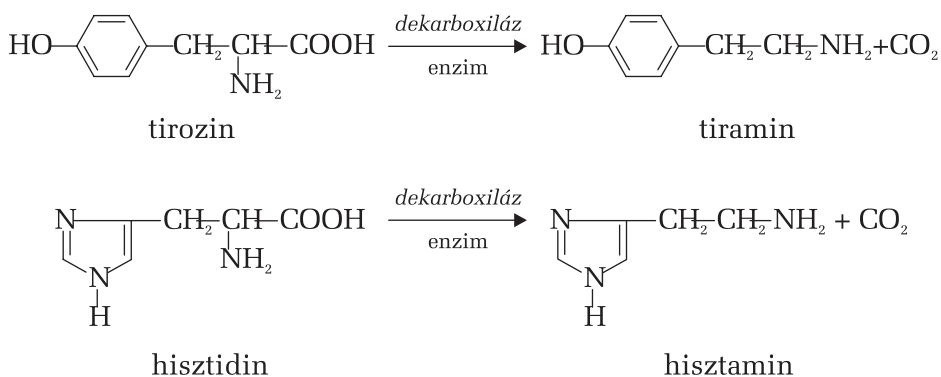
célokra, amelyekben kilogrammonként max. 150 mg ciántartalmú glikozid van. Egynapi áztatással és a szokásos főzéssel már méregmentessé tehető.

A *kumarin* szénára emlékeztető, kellemes illatú, fényérzékeny, kristályos anyag; sokféle fű- és herefaj virágjában, illetve leveleiben, a szagos mügében, a somkóróban, a datolyában, valamint a levendulaolajban található, rendszerint glikozidos kötésben. *A májat károsítja*, ezért kumarint és kumarintartalmú növényrészeket az élelmiszerekhez nem szabad adni.

A mikroorganizmusok által termelt mérgek közül fontosabbak a botulizmus, a staphylococcusos ételmérgezés és a szalmonellás ételfertőzés, de jelentős méreganyag keletkezhet a proteáztermelő baktériumok hatására is az élelmiszerekben. Ennek során az élelmiszerek fehérjetartalma aminosavakra bomlik, sőt egyesek dekarboxileződnek, és ennek hatására a szervezetben káros *biogén aminok* keletkeznek. Ezek közül a *hisztamin* (9.7. ábra) *erős értágító*, a bőr és főként az arc kipirulását okozó vegyület, amely rosszul illő és *erős vérnyomás-ingadozást is kiválthat*. Jelentős szerepe van a nem friss, fehérjetartalmú ételek fogyasztása után jelentkező allergiás megbetegedésekben.

A *tiramin*, amely a tirozinból dekarboxileződéssel keletkezik, *vérnyomást fokozó vegyület* (9.7. ábra). *Egyes sajtok érése közben is keletkezik*, azonban az ezek fogyasztásával a szervezetbe jutó mennyiség enzimesen oxidálódik, így gyorsan hatástalanná válik. Néhány nyugtató ezt a lebontást gátolja, amikor is a tiramin veszélyes vérnyomás-emelkedést okozhat.

Összefoglalva tehát elmondható, hogy a hisztidinből keletkezett *hisztamin* az állati szövetekben, a parajban és a borban, a tirozinból keletkező *tiramin* sajtokban és halkonzervekben, a lizinből keletkező *kadaverin* és az ornitinből keletkezett *putreszcin* a romlott húsokban,



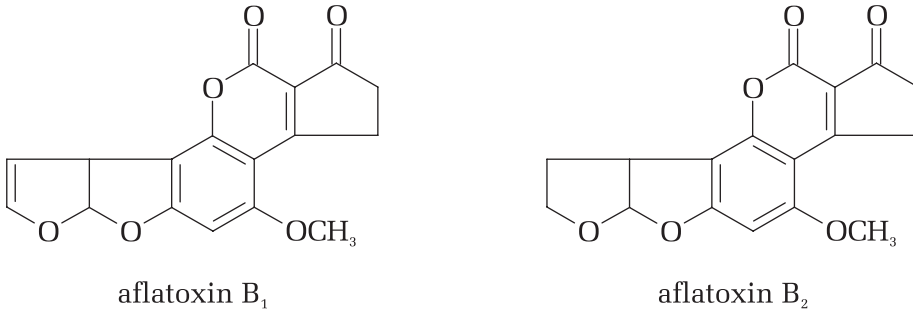
9.7. ábra. A tiramin és a hisztamin keletkezése

az argininből keletkezett *agmatin* a sajtokban, a szerinből keletkező *etanol-amin* a foszfatidokban fordul elő.

A fehérjék hasznosulását jelentős mértékben ronthatják a bennük előforduló mikroszkopikus gombák által termelt mérgek, a mikotoxinok, melyek közül egyesek a sejtekben lejátszódó fehérjeszintézis-folyamatokat zavarják. Az élelmiszerek penészesedése nemcsak undorkeltő hatású, hanem a mikroszkopikus gombák által termelt mérgező anyagok, a mikotoxinok keletkezése miatt is káros. A *mikotoxinok egyes penésztörzsek másodlagos anyagcseretermékei*, amelyek mérgező hatása elérheti a legerősebb mérgekéét, és egyeseknek rákkeltő hatásuk is van. A mikotoxinok által okozott megbetegedést *mikotoxikózisoknak* nevezzük. A mikotoxinok *kémiai szerkezetük alapján lehetnek kumarin-, malonát-, mevalonát- és acetátszármazékok*, továbbá *telítetlen laktonok*. Mai tudásunk szerint a mérgező és a karcinogén anyagcseretermékek létrehozására képes penészgombafajok száma több mint 200, és ezek mintegy százféle mikotoxint termelnek. A mikotoxin-képződés veszélye elsősorban a trópusi és a szubtrópusi környezetben lévő növénytermékeket fenyegeti, amelyek a trópusokról származó takarmány-alapanyagok (földimogyoró, gyapotmagliszt) vásárlásával kerülnek hazánkba, és hazai viszonyaink között is kialakulhatnak ezek a mérgező anyagok.

Az *Aspergillus flavus* fajhoz tartozó törzsek által termelt *aflatoxin* nemcsak májkárosodást okoz, hanem *rákkeltő hatása is van*. Az *Aspergillus flavus*on kívül az *Aspergillus parasiticus*, sőt néhány *Penicillium* törzs is termel aflatoxinokat. Ezen penészek növekedési optimuma 30 °C körüli, nagy páratartalmú közegben van, ezért az *aflatoxin-képződés főleg trópusi környezetben következik be*. Elsősorban földimogyoróban,

gyapotmagban, rizsben, kukoricában, szójamagban, gabonamagvakban és más növényekben mutattak ki aflatoxint. A penészekben 14, szerkezetileg rokon változata képződik, amelyek közül legfontosabbak a B_1 és B_2 (9.8. ábra), valamint a G_1 és G_2 . Valamennyien difurán-kumarin-származékok, vízben jól oldódnak és hőállóak. A B betűjelű toxinok UV fényben kék színnel, a G betűjelűek zöld színnel fluoreszkálnak.



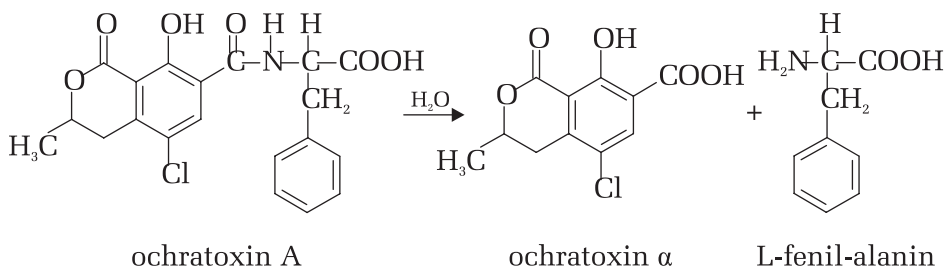
9.8. ábra. Az aflatoxin B_1 és B_2

A tejtermelő háziállatok által a takarmánnyal elfogyasztott aflatoxinok néhány százaléka hidroxilált formában a *tejben* is megjelenik, amelyeket M_1 és M_2 *változatoknak* neveznek. Mivel az aflatoxin M_1 és M_2 is toxikus, fennáll a veszélye annak, hogy nemcsak a penészes takarmányt fogyasztó állat hullik el, hanem a *tünetmentes állat tejétől az ember is mikotoxikózist kaphat*. A legmérgezőbb aflatoxin a B_1 és M_1 , majd sorrendben a G_1 , az M_2 , a B_2 és a G_2 módosulat következik. *Mérgező hatásukat a sejtekben lejátszódó fehérjeszintézis és az enzimműködés megzavarásával fejtik ki*. Kísérleti állatokon májrákot is okoztak. Az állatok érzékenysége az aflatoxinokkal szemben nagyon különböző: legveszélyesebb a naposkacsára, a kis pulykákra, valamint a halakra; a többi háziállat közül leginkább a sertés, legkevésbé a juh érzékeny rá.

Az aflatoxin nemcsak penészes étellel kerülhet az emberi szervezetbe, hanem a fertőzött takarmánnyal etetett állatok húásával és tejjével is. *Az élelmiszerek maximális aflatoxin-tartalmát 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, néhány országban 5–20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ szinten szabták meg*. Az aflatoxin-tartalmú élelmiszerek méregtelenítése nehéz. Az erre szolgáló legalkalmasabb fizikai eljárás a nedves hőkezelés és az extrahálás, a kémiaiak közül pedig az ammóniás, lúgos inaktiválás. Felfedeztek továbbá néhány aflatoxin-elbontó

baktériumot is. Az aflatoxint termelő penészgombák gyakran *szterigmatocisztint* is termelnek, amely *májrákot okozó, világossárga színű mikotoxin*.

Az *ochratoxinokat* az *Aspergillus ochraceus* állítja elő, de más *Aspergillus* törzsek és *Penicilliumok* is termelik a toxint. Ezek a penészek a természetben a meleg éghajlati övek talajában és az ott termesztett növényekben nagyon gyakoriak. Az ochratoxinok az aflatoxinhoz hasonlóan mérgezőek, de azokkal ellentétben karcinogén hatásuk nem bizonyított. *Fehérjékhez kapcsolódva a vesében, a májban és az izmokban halmozódnak fel, és elsősorban a veseműködést zavarják.*



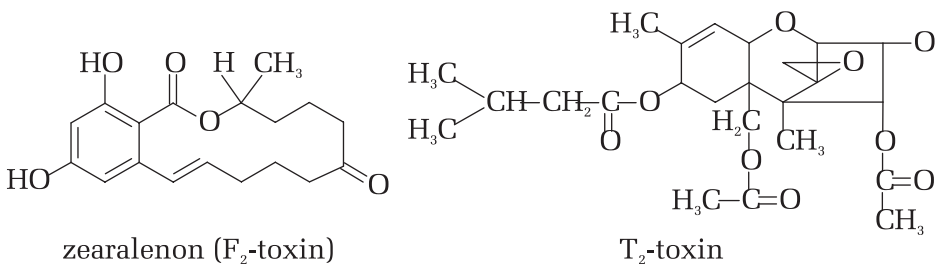
9.9. ábra. Az ochratoxin A hidrolízise

A három (A, B, C) változat közül az ochratoxin A (9.9. ábra) keletkezik a legnagyobb mennyiségben, és ez egyben a legmérgezőbb is. Olyan *hidroxikumarin-karbonsav-származék, amelyhez peptidkötéssel L-fenil-alanin kapcsolódik*. Az ochratoxin B nem tartalmaz klórt, az ochratoxin C pedig az ochratoxin A etilészter-származéka. Az ochratoxinokról a fenil-alanin *karboxipeptidázzal* vagy *kimotripsinnel* lehasítható (9.9. ábra). A kapott származékok ugyancsak toxikusak. Az ochratoxinok nemcsak az emésztőrendszerből, hanem a bőrön keresztül felszívódva is kifejthetik hatásukat.

A *patulin* a *Penicillium* és az *Aspergillus* törzsek anyagcsereterméke, amelyek alacsony hőmérsékleten is képesek a toxin termelésére. Ezek a penészek a gyümölcsökön, zöldségféléken, gabona- és húsrúkon egyaránt megtalálhatók, ezeknek a törzseknek azonban csak kis hányada képes a patulin termelésére. A patulin, amely *szerkezetét tekintve telítetlen lakton, karcinogén és mutagén hatású*. A kereskedelemről származó almalevelekben és almaborokban több esetben kimutattak patulint, ami arra figyelmeztet, hogy az alma feldolgozásakor feltétlenül ki kell válogatni az ún. barnaromlásos gyümölcsöket, mert ezt az elváltozást a patulin-termelő gombák okozzák. Az élelmiszer-ipari termékek *méregtelenítése*

a patulin hőstabilitása miatt nagyon nehéz, kén-dioxid adagolásával, illetve az almaborok aktív szénesek kezelésével értek el némi eredményt.

A *Fusarium* nemzetségbe tartozó gombák többféle olyan mikotoxint termelnek, amelyek mind élelmezés-egészségügyi, mind állat-egészségügyi szempontból fontosak. Legismertebbek ezek közül a zearalenon (F_2 -toxin) és a trichotecén-mikotoxinok. A zearalenon, kémiai szerkezetét tekintve, rezorcilsav-lakton, ösztrogén hatású anyag, amely elsősorban a sertéseknél okoz nagy károkat. Laktonszerkezete miatt rákkeltő hatást is tulajdonítanak neki. A trichotecén-toxinok szeszkviterpenoid vegyületek, amelyek trichotekánvázat tartalmaznak. Több mint 30 vegyület tartozik ebbe a csoportba, amelyek közül a T_2 -toxin a legismertebb (9.10. ábra). Ismertebb trichotecén-toxin még a diacetoxi-scirpenol (DAS) és a dezoxinivalenol vagy vomitoxin (DON), valamint a néhány éve felfedezett fumonizinek (B_1 , B_2 , B_3 stb.). Humán-egészségügyi szempontból a legjelentősebb fumonizin a B_1 (FB_1), mivel rákkeltő hatásának bizonyult. A *Fusarium* gombák a mérsékelt és a hideg égövi talajok termőfelszínén élnek, különösen nagy páratartalmú nyarakon fertőzik a szemes terményeket, majd a mikotoxinok termelésének mértéke a termények további tárolási módjától függ. Így pl. nedves, hideg ($0-4\text{ }^\circ\text{C}$) környezetben képződik a legtöbb méreganyag, ezért a *Fusarium*-toxinoktól származó megbetegedések elsősorban tavasszal jelentkeznek. A fertőzött takarmánnyal a toxinok bejutnak az állati szervezetbe, ahol nemcsak az állatok egészségét károsítják, hanem eredeti vagy metabolizált formában az állati szövetekben, illetve szervekben *akkumulálódnak*, amelyek elfogyasztása után az emberi szervezetbe is bejuthatnak.



9.10. ábra. Zearalenon és trichotecén-mikotoxinok

A *Fusarium*-toxinok az emberi szervezetben hányást, hasmenést, gyulladásokat, vérzékenységet okoznak. A vérképzés súlyos zavara is előállhat, ami általános rosszulléttel kezdődik, és orvosi beavatkozás nélkül halálos kimenetelű is lehet. A mérgezés esetenként szédüléssel,

végtagrángással és hasi fájdalmakkal jár, súlyos esetben tudatzavart, majd halált okoz. A *Fusarium-toxinok a sütés és a főzés hőmérsékletén nem bomlanak el*, és a kémiai hatásokkal szemben is ellenálló. A fertőzött gabonák évekig toxikusak maradnak. Az ilyen termények *nem detoxikálhatók*, tehát sem takarmányként, sem élelmiszerként nem hasznosíthatók. A *Fusarium-toxinok* elleni védekezés egyetlen lehetősége a megelőzés, a helyes agrotechnika és a megfelelő tárolási módszerek alkalmazása.

Egyes *Aspergillus* fajok neurotoxikus, ún. *tremorgén* anyagokat is termelnek, amelyek vagy bénítólag hatnak a központi idegrendszerre, vagy hosszabb ideig tartó remegést, reszketést idéznek elő. Ilyen ciklikus peptidszerkezetű tremorgén toxint termel pl. az *Aspergillus flavus*, az *Aspergillus fumigatus*, az *Aspergillus ustus* és az *Aspergillus clavatus*. Ezekben a tremorgén toxinokban mindig található indolrész, azaz triptofán, amely a bioszintézis egyik kiinduló anyaga. A *fumitremogénekben* ezenkívül egy szubsztituált, triptofánból és prolinból álló diketo-piperazinváz is felismerhető. A *triptokivalin* és a *triptokivalon* tetrapeptidok triptofánból, antranilsavból, valinból és metil-alaninból vagy alaninból épülnek fel. Egyes *Penicillium* fajok is termelnek tremorgén neurotoxint, és feltételezhető, hogy az egyes háziállatokon kitört idegrendszeri megbetegedések is ilyen gombák anyagcseretermékeire vezethetők vissza.

A mikotoxinokon kívül élelmiszerekben előfordulhatnak még az inszekticidek, a fungicidek, illetve a herbicidek, melyek a fehérjék hasznosulását ugyancsak ronthatják. Az inszekticidek között legjelentősebbek a klórozott szénhidrogének, a szerves foszforvegyületek, a fenolészterek és a foszfitszármazékok. A fungicidek közül a szerves csávázószerkezetek jelentenek veszélyt, míg a herbicidek többsége közvetlenül alig, vagy egyáltalán nem mérgező.

Az állattenyésztési gyógyászati maradékok közül *jelentős hatással lehetnek a fehérje hasznosulására az antibiotikumok*, de különösen a *hormontartalmú anyagok*, melyek növelik a táplálékkal felvett nitrogén hasznosulását, *fokozzák a fehérjeképződést* és a tömeggyarapodást. Az egyéb mérgek sorában megemlíthetők a fémszennyeződések (legveszélyesebb a kadmium- és a szerveshigany-vegyületek), a műanyagokból származó mérgek, valamint a szennyezett környezetből származó policiklikus aromás szénhidrogének (legveszélyesebb az 1,2-benzpirén), a nitrózaminok és a poliklórozott bifenilek, melyek a fehérje hasznosulását befolyásolhatják.

AZ ÉLELMISZER- ÉS TAKARMÁNYFEHÉRJÉK KOMPLEX MINŐSÍTÉSE

A komplex minősítés során meghatározzuk a fehérjehordozók fehérjetartalmát, aminosav-összetételét, emészthetőségét, felhasználásának lehetőségeit és korlátait, más fehérjehordozókhöz viszonyítva táplálkozási értékét és felhasználásának gazdaságosságát. Egy újonnan bevezetett fehérjehordozó esetében komplex minősítésre kell törekedni, melynek során kémiai, biológiai és állatkísérleti módszerekkel próbálunk minél több információhoz jutni. Ismert fehérjehordozókat akkor kell komplex minősítésnek alávetni, ha megváltozik az előállítás technológiája, a tárolása, vagy a növények olyan genetikai módosításokon mentek keresztül, melynek során a minősítés szempontjából fontos, új tulajdonságok felbukkanása várható.

A komplex minősítés során választ keresünk arra, hogy mennyi a fehérjehordozó nyersfehérje-tartalma, aminosav-összetétele, a szabad aminosavak mennyisége és a fehérjékben kötöttekhez viszonyított aránya, milyen az esszenciális aminosavak mennyisége, a többi esszenciális és nem esszenciális aminosavhoz viszonyított aránya, és mennyi a fehérjehordozóban a fehérje és az energia aránya. Kíváncsiak vagyunk arra, hogy gazdasági állataink a fehérjét milyen mértékben fogyasztják, az etetés során jelentkeznek-e toxicitásra vagy antinutritív hatásra utaló tünetek, és milyen hatékonysággal hasznosul a fehérje a tömegváltozáson vagy a nitrogénmérleg alapján mérve. Vizsgáljuk, hogy a fehérje-, valamint az esszenciális aminosav-tartalom alapján alkalmas lehet-e gyengébb minőségű fehérjék komplettálására, költségesebb vagy nehezen beszerezhető fehérjetakarmány kiváltására, és végül, hogy alkalmazása milyen gazdasági haszonnal jár.

A minősítés során célszerű az olcsó és gyors, valamint kis mintamennyiséget igénylő kémiai vizsgálatokkal kezdeni, majd jöhetnek a laboratóriumi állatokon végzett tesztek, végül etetési kísérletek olyan állatfajokon, amelyekkel a fehérjét kívánjuk feleltetni. Új fehérjehordozók minősítése esetén a fehérje-előállítás körülményei, hogy növényi

vagy állati eredetű fehérjéről van-e szó, az elkészítés, a feldolgozási és a tárolási viszonyok már információkat szolgáltatnak a fehérje minőségéről. *Érzékszervi bírálattal* megállapítjuk a minta színét, szagát, állagát, amennyiben biztosak vagyunk, hogy emberre veszélyes kórokozókat nem tartalmaz, megízlelhetjük, hisz az ember által észlelt rossz íz utalhat arra, hogy az állat a takarmányt esetleg visszautasíthatja. Nagyon hasznos lehet a minősítésnél egy *mikroszkópos vizsgálat*, mellyel a hamisítás és az idegen anyagok jelenlétét lehet egyszerűen és nagy biztonsággal feltárni.

A *kémiai minősítés során* meghatározzuk a vonatkozó szabványok és ajánlások szerint a szárazanyag-, a nyersfehérje-, a nyerszsír-, a nyersrost-, a nyershamu- és a nitrogénmentes kivonhatóanyag-tartalmat és a fehérje–energia arányt. Az analízisadatok alapján azonnal dönteni tudunk arról, hogy a vizsgált anyag fehérjehordozónak tekinthető-e, valamint az egyéb beltartalmi adatok alapján arról, hogy milyen állatfaj számára, és milyen korlátokkal használható fel az általunk minősített anyag. A beltartalmi vizsgálatokon túl meghatározzuk a fehérje aminosav-összetételét, az adatokat 100 g mintára és 100 g fehérjére vonatkoztatva is megadjuk, melyek közül az első adat az aminosavak mennyiségére, a második pedig a fehérje minőségére ad információt. Megállapítjuk az esszenciális és a nem esszenciális aminosavak mennyiségét és arányát, különböző kémiai indexek számolásával a vizsgált anyagot más, ismert fehérjehordozókkal tudjuk összehasonlítani.

A kémiai vizsgálatok után célszerűnek látszik *mikrobiológiai vizsgálatot* végezni, ha gyanús, hogy a feldolgozási és tárolási körülmények során mikroorganizmusok szaporodhattak el a kérdéses anyagban. Vizsgálni kell, hogy a mikrobiális szennyezettség megfelel-e a szabványok előírásainak, valamint azt, hogy milyen lehetőség van az előállítás során a mikrobiológiai állapot javítására.

A kémiai és mikrobiológiai minősítés után célszerű *laboratóriumi modellállatokon* (patkány, kameruni törpekecske) *etelési kísérleteket* végezni, melynek során megállapítjuk az állatok takarmányfogyasztását, a toxicitásra vagy egyéb antinutritív anyagok jelenlétére utaló jeleket, és ezekkel párhuzamosan ez a szakasz alkalmasnak tekinthető a nitrogénanyagcsere-kísérletek előtetési szakaszának is. Az előtetési szakaszt követően a 10–20% közötti fehérje/energia koncentrációjú takarmányok esetében vizsgáljuk, hogy a fehérjehordozók kizárólagos fehérjeforrásként milyen mértékben befolyásolják a növekedést és a fehérjeretenciót. Ezt követően vizsgálhatjuk, hogy a fehérjehordozó

milyen mértékben képes kiegészíteni más fehérjehordozó aminosav-összetételét. A 20%-nál nagyobb fehérje/energia koncentrációjú anyagok fehérjeminőségének vizsgálatát más takarmányokkal kiegészítve célszerű elvégezni, hisz gyakorlati körülmények között általában 20%-nál kisebb fehérjekoncentrációjú takarmányokat használunk fel. Ha a modellállatokon kapott eredmények rosszabbak annál, mint amit az aminosav-összetételi adatokból vártunk, akkor az *antinutritív, toxikus anyagok jelenlétére*, a fehérje rossz emészthetőségére, vagy az aminosavak csökkent hasznosulására gyanakodhatunk.

A *fehérje emészthetőségét* akkor célszerű meghatározni, ha az előállítás során denaturációt előidéző, fehérjét károsító hatások érték a fehérjehordozót, illetve ha gyanú merül fel, hogy az aminosavak egy része az anyagban nem hasznosítható formában fordul elő. Ilyenkor figyelemmel kell lenni az antinutritív hatásokra is, hisz az endogén-nitrogén-ürítést fokozó anyagok a fehérje emészthetőségét csökkentik. Az emészthetőséget enzimes módszerekkel vagy állatokkal végzett nitrogén-anyagcsere kísérletekkel lehet meghatározni.

Az előzőekben felsorolt vizsgálatok eredményeinek ismeretében kerülhet sor a *gazdasági állatokon modellkísérletek végzésére*. Az előzőekhez képest e kísérletekhez nagyobb mintamennyiség szükséges, melyet befolyásol a kísérletbe vont állatok száma, a várható takarmányfogyasztás és a fehérjehordozó százalékos összetétele a kísérleti takarmányban. A kísérlet során szükség van az összes etetett komponens beltartalmi paramétereire, és ügyelni kell arra, hogy a kísérleti csoportok minden tekintetben azonos környezeti és genetikai hatásnak legyenek kitéve a beállított kontrollcsoporthoz viszonyítva; azaz a csoportok közötti különbség kizárólag a fehérjének vagy a vizsgált fehérje más fehérjével történt kiegészítésének következménye legyen. Ezért ügyelni kell arra, hogy az elhelyezési feltételek minden esetben azonosak, a kísérleti állatok genetikailag homogének legyenek, hisz csak így lesz lehetséges a kezelésből adódó különbségek statisztikailag is bizonyítható mértékének megállapítására. Fentiek miatt a kísérleteket célszerű minél több egyeddel, többszöri ismétléssel elvégezni, és jó az is, ha az ismétléseket nem egy időben végezzük, hisz az csökkenti a becslés kockázatát.

A kémiai, a mikrobiológiai, a laborállatokon, illetve a gazdasági állatokon végzett modellkísérletek alapján elegendő információ gyűlik össze, melynek során a fehérjehordozó felhasználására gazdasági állataink takarmányozásánál ajánlásokat lehet tenni. A modellállatokkal

kapott kísérleti eredményeket csak tájékoztató jellegűnek lehet elfogadni, mert a különféle állatok fehérjeigénye és anyagcseréje jelentősen eltérhet egymástól.

A *köznapi értelemben vett takarmányfehérjéknek* olyan fehérjehordozókat hívunk, amelyek szántóföldi vagy élelmiszer-ipari termelésből származnak, különféle feldolgozási és tárolási technológiákon mentek keresztül, és használatuk általánosan elterjedt gazdasági állatok takarmányozására. Ezek fehérjeminőségét jelentős mértékben befolyásolhatja a feldolgozási technológia, és a tárolás során is megváltozhat a fehérje minősége.

Alapanyagok vizsgálata esetén fontos tudnunk a minta eredetét, és ismernünk kell azokat a technológiai hatásokat is, amelyek a mintát érték a feldolgozás során. A szabványos kémiai módszereken kívül a minta eredete és feldolgozása szerint az alábbi vizsgálatokat célszerű még elvégezni. Amennyiben az új alapanyag genetikailag módosított növényből, esetleg egy újonnan előállított növényfajból származik, célszerű vizsgálni a szokásostól eltérő, vagy rossz ízanyagokat, az esszenciális aminosav-tartalmat, a szaponinok és az alkaloidok mennyiségét.

Fehérjekivonatok, izolátumok, koncentrátumok esetében célszerű vizsgálni a mérgező anyagokat, a fehérjekicsapó és extrahálószeres maradványait, a fehérjék funkcionális állapotát, in vivo emészthetőségét, in vitro enzimes bonthatóságát, össze kell hasonlítani a fehérjekivonat és az eredeti kiindulási anyag fehérjetartalmát, és meg kell határozni az aminosavak hasznosíthatóságát. *Növényi fehérje esetében* ezen túl vizsgálni kell még a szaponintartalmat, a fenolos anyagok feldúsulását, a toxikus fehérjéket, az enzim inhibitorokat, a ciántartalmú glikozidokat, esetleg az antivitaminokat. *Az állati eredetű fehérjék esetében* az alapvizsgálatokon túl a mikrobiológiai állapotot és a zsírsavak oxidációját. *Extrahált vagy préselt olajipari fehérjék esetében* a mikotoxinokat, *hüvelyes magvak esetében* a tripszingátlókat és a hemagglutinineket, *repce esetében* a tioglikozidokat, lenmag esetében a ciántartalmú glikozidokat, az antivitaminokat, mustármag esetében pedig a tioglikozidokat. *Fermentációval előállított fehérjéknél, aminosav-koncentrátumoknál* vizsgálni kell a szubsztrát és a kísérőanyagok maradványait, a mikrobiológiai állapotot és a mikrobafehérjék mennyiségét, a mikotoxin- és nukleinsav-tartalmat, a hődenaturációt, a *Maillard*-reakció termékeit és az aminosavak hozzáférhetőségét. *A részlegesen vagy teljesen hidrolizált termékeknél* vizsgáljuk az oldható fehérje-, a kicsapható fehérje- és a szabad aminosav-tartalmat, a hidrolizáló ágensek, illetve enzimek

maradványait, valamint a mikrobiológiai állapotot. *Szárítással, hőkezeléssel készült anyagok* esetében a fehérje hődenaturációjának fokát, az aminosavak hozzáférhetőségét, és a *Maillard*-reakció termékeit. Ha a fehérjehordozót hosszabb ideig anaerob körülmények között tárolták, vizsgálni kell a mikrobiológiai fertőzöttséget, a mikotoxinokat és az avasodásra utaló jeleket.

A konzisztencia vizsgálatakor megállapítjuk, hogy a takarmány folyékony vagy szilárd állapotú, amely alkalmas lehet kötőanyagként pelletáláskor, esetleg csak nedves sertéshizlalási rendszerben használható fel. A takarmány lehet finom por alakú, vagy dercés állapotú, ilyenkor a nagy felületi oxidáció miatt korlátozottan tárolható, a baromfi nem szívesen fogyasztja, a finom por a tápban a takarmányfelvételt csökkenti; lehet higroszkópos, nedvességre összetapadó konzisztenciájú, mely esetben a tárolás során a levegő teljes kizárása szükséges. Amennyiben a táplálék dohos, vagy penészszagú, vagy más egyéb undorkeltő szaganyagokat is tartalmaz, ez – különösen sertéseknél – csökkenti a takarmányfelvételt. 13%-nál nagyobb víztartalom esetében a takarmány csak rövid ideig tárolható, 40–90% víztartalomnál – mivel nagy a mikrobiális fertőzés veszélye – a takarmány nem tárolható, azonnal felhasználandó. Amennyiben a vizsgált anyag 20%-nál nagyobb nyersfehérje-tartalmú *fehérjetakarmánynak minősíthető*, felhasználható kis fehérjetartalmú energiahordozók, pl. gabonák komplettálására. 10%-nál nagyobb nyerszsír-tartalom esetében nagy a veszélye az avasodásnak, ezért ilyenkor célszerű a telítetlen zsírsavak mennyiségét meghatározni. 5%-nál nagyobb nyersrost-tartalomnál broilerek, malacok, süldők takarmányában korlátozottan használható fel, inkább tojótyúkokkal vagy kocával célszerű a takarmányt feletetni. Ha 5%-nál nagyobb a nyershamu-tartalom, célszerű makro- és mikroelem-vizsgálatot végezni, és a vizsgálatok eredményeit az állat igényeivel összevetni. Amennyiben a fehérje–energia arány 10%-nál kisebb, meg kell vizsgálni, hogy *milyen anyagokkal lehetne a komplettálást elvégezni*. Ha az aminosavösszetétel vizsgálata során a nyersfehérje-tartalom 90%-ánál kevesebb aminosav mérhető, akkor az arra utal, hogy a vizsgálati anyag jelentős mennyiségben nemfehérje nitrogént (savamidok, karbamid) tartalmaz. Amennyiben lizintartalma nagy (nagyobb mint 10 g/100 g fehérje), célszerű a komplettálhatóságot kukoricával és kalászosokkal mérni sertés és baromfi esetében. Amennyiben a metionintartalom nagyobb, mint 2

g/100 g fehérje, a vizsgálati anyagot baromfi takarmányozásában célszerű felhasználni, vagy komplettáló hatását mérni alacsony kéntartalmú aminosav-tartalom esetében.

Amennyiben az állatkísérletek adatai alapján kedvező biológiai értéket kapunk, azaz *PER-értéke 1,8-nál, az NPU 60-nál, a BV pedig 70-nél nagyobb, akkor egy értékes fehérjeforrással van dolgunk*, ezért célszerű nézni a fehérje komplettáló hatását más egyéb, gyengébb minőségű fehérjékkel szemben. Amennyiben a kedvező biológiai érték mellett rossz a látszólagos emészthetőség, vagy csökkent mértékű a takarmányfogyasztás, akkor ez rossz valódi nitrogén emészthetőségre, nagy endogén bélsárnitrogén-ürítésre vagy *antinutritív anyagok (tripszingátló, szaponin) jelenlétére utal*. Ilyen esetben célszerű az in vitro emészthetőség vizsgálata vagy növekedési teszt végzése. Amennyiben az esszenciális aminosav-tartalom megfelelő, a modellállat igényeit kielégítő, ennek ellenére a PER- és az NPU-értékek kedvezőtlenek, akkor vagy rossz a valódi emészthetőség, vagy antinutritív anyagok nagy koncentrációjára lehet számítani a takarmányban. Amennyiben a takarmányfelvétel kezdetben csekély, majd lassan emelkedik közepes PER- és NPU-érték mellett, ennek oka a rossz íz, valamint a kedvezőtlen organoleptikus tulajdonságok lehetnek. Amennyiben a közepes takarmányfelvétel csökkenő tendenciát mutat, alacsony PER és NPU esetén, akkor valószínűleg antinutritív vagy toxikus anyagok találhatóak a takarmányban.

Ha a kísérleti állatok jelentős tömegvesztéséget szenvednek, akkor ez *kiegyensúlyozatlan aminosav-összetételre, aminosav-inbalance-ra, esetleg toxikus vagy antinutritív hatásokra vezethető vissza*. Orvosolni lehet a bajt a hiányos vagy a túlsúlyban lévő aminosavak mennyiségének megállapításával és annak kiküszöbölésével. Hasmenéses vagy egyéb klinikai tünetekben mutatkozik meg, ha a vizsgált fehérjehordozó toxikus anyagokat, esetleg toxikus mikrobafehérjéket tartalmaz, mikrobiális minősítése rossz, nagy a szaponintartalma, vagy kiegyensúlyozatlan, nagy sótartalmú az ásványianyag-tartalma.

Fentiekből következik, hogy egy takarmányfehérje-hordozó vagy fehérje-alapanyag *komplex minősítését csak kémiai és mikrobiológiai módszerekkel, laborállatokkal és gazdasági állatokkal végzett etetési kísérletek alapján lehet elvégezni*. Jó példa erre az aminosav-összetétel meghatározása, mely csak az aminosavak mennyiségéről tájékoztat, de azok hasznosulásáról nem ad információt. Kémiai módszerekkel meg tudjuk határozni a hasznosítható lizin és metionin mennyiségét is, de

hogy valójában ezekből az eredményekből mi valósul meg, mit tud hasznosítani az állat, azt csak etetési kísérletekkel lehet eldönteni. Ennek érdekében mindenképpen be kell állítani a fehérje hasznosulását mérő modell- és gazdasági állatokkal végzett etetési kísérletet, annak ellenére, hogy az utóbbi hosszú ideig tart és igen drága.

Az alapanyagokon túl lehetőség van keveréktakarmányok és különféle takarmánykombinációk minősítésére, sőt minősíthetők szintetikus aminosavak vagy nagy aminosav-tartalmú premixek is. Amint korábban már volt szó róla, ma már ipari méretekben tudunk lizint, metionint, treonint és izoleucint előállítani, melyeket széleskörűen alkalmaznak a gyakorlati takarmányozás során. Ezek minősítésénél fő szempont annak megállapítása, hogy *milyen a készítmény komplettáló hatása a kémiailag tiszta, aktív izomerhez, vagy a jó minőségű aminosav-hordozó takarmányfehérjéhez képest*. A komplettáló hatás megállapítása során ismerni kell, hogy a vizsgálati anyag a vizsgált aminosavon kívül milyen vitaminokat, nyomelemeket, esetleg növekedést gyorsító anyagokat tartalmaz, mert a kedvező komplettáló hatás részben ezeknek is tulajdonítható; így előfordulhat az is, hogy a takarmányozási célra gyártott készítmény kedvezőbb hatásúnak bizonyul az aktív, kristályos aminosavhoz viszonyítva. A kémiai vizsgálatok során elvégezzük a teljes analízist, beleértve a nyersfehérje-tartalom meghatározást, vizsgáljuk a hatóanyag-tartalmat aminosav-analízissel, kísérletet teszünk a toxikus szubsztrátok, prekursorok, egyéb alapanyag-maradványok kimutatására, majd a kémiai analízisadatok birtokában modellállat-kísérleteket állítunk be a komplettáló hatás mérésére. A kísérlet beállításánál figyelni kell arra, hogy a komplettálható fehérjék minőségi eltérései az eredményeket jelentősen befolyásolhatják, ezért tanácsos olyan mennyiségben átlagos minőségű alapanyagot használni, hogy mind a kontroll, mind a kísérleti tápok előállítására elegendő legyen.

RÖVIDÍTÉSEK

A

A – adenin
A – felszívódott nitrogén
(absorbed nitrogen)
 α -AGPA – α -amino- β -guanidino-
propionsav
Ac- – acetyl
AcCoA – acetyl-koenzim A
AD – látszólagos emészthetőség
(apparent digestibility)
ADH – alkohol dehidrogenáz
adoHcy –
S-adenozil-homocisztein
adoMet – S-adenozil-metionin
ADP – adenzin-difoszfát
AEP – 2-amino-etyl-foszfonsav
Ala – alanin
ALV – felhasználható lizin
(available lysine value)
AMP – adenzin-monofoszfát
Arg – arginin
AS – aminosav
Asn – aszparagin
Asp – aszpartát
Asx – aszparagin és aszpartát
ATP – adenzin-trifoszfát
ATPáz – adenzin-trifoszfátáz

B

B – a test nitrogéntartalma
a kísérlet végén (body nitrogen)

BÉ – biológiai érték

terc-BDMS –

N(O)-terc-butyl-dimethyl-szilil

BHA – butyl-hidroxi-anizol

BHT – butyl-hidroxi-toluol

B_k – a test nitrogéntartalma
nitrogénmentes táplálék
fogyasztásakor a kísérlet végén
(body nitrogen at zero N intake)

B_o – a test nitrogéntartalma
a kísérlet kezdésének
időpontjában (body nitrogen at
zero time)

1,3-BPG – 1,3 difoszfó-glicerát

izo-BOC – N(O,S)-izobutyl-
oxikarbonil-metilészter

BSA –

N,O-bis(trimethyl-szilil)acetamid

BSTFA – N,O-bis(trimethyl-
szilil)trifluor-acetamid

BV – biológiai érték (biological
value)

C

C – citozin

cAMP – ciklikus AMP
(adenozin-3',5'-ciklikus
monofoszfát)

CDP – citidin-difoszfát

CEAK – ciszteinsav ekvivalens
arányossági konstans

cGMP – ciklikus GMP

CMP – citidin-monofoszfát
CoA – koenzim A
CoQ – koenzim Q (ubikinon)
CTP – citidin-trifoszfát
Cys – cisztein
CS – kémiai index (chemical score)

D

d – 2'-dezoxiribo-
D – emészthetőség (digestibility)
DAB –
 p-dimetil-amino-benzaldehid
DABS-Cl – 4-dimetilamino-azo-
 benzol-4'-szulfonil-klorid;
 dabzil-klorid
DAPA – diamino-pimelinsav
DAS – diacetoxiscirpenol
DBC – festékkötési kapacitás
 (dye binding capacity)
DBL – festékmegkötő lizin (dye
 binding lysine)
DCM – diklórmétán
DDT – diklór-difenil-triklór-etán
DEAE – dietil-aminoetil
DG – diacil-glicerol
DHA – dehidroalanin
DHAP – dihidroxi-aceton-foszfát
DHF – dihidrofolát
DMBA –
 7,12-dimetilbenz(a)antracén
DMS – dimetil-szulfát
DNFB – 1-fluor-2,4-dinitrobenzol
 vagy 2,4-dinitro-1-fluorbenzol
DNP – dinitro-fenil-
 (dinitro-fenol)

DNP-lizin –
 dinitro-fenil- ϵ -amino-lizin
DNS – dezoxiribonukeinsav
DNS-Cl – 1-dimetil-amino-
 naftalin-5-szulfonil-klorid;
 danzil-klorid
DON – dezoxinivalenol
DOPA –
 3-4-dihidroxi-fenil-alanin
DPA – N,N'-di-n-propil-alanin
DPG – 2,3-difoszfó-glicerát
DTBNB – 5,5'-ditio-bis-(2-nitro-
 benzoészav)
DTE – ditioeritrit
DTT – ditriotrit

E

EAA –
 esszenciálisaminosav-index
 (essential amino acid index)
ECD – elektronbefogási detektor
EDTA –
 etilén-diamin-tetraecetsav
EGA – etilén-glikol-adipát
ERP – egyensúlyi relatív
 páratartalom
ERV – tojáshelyettesítési érték
 (egg-replacement value)

F

F – a bélsár nitrogéntartalma
 (faecal nitrogen)
F1P – fruktóz-1-foszfát
F6P – fruktóz-6-foszfát

FAD, FADH₂ – flavin-adenin-dinukleotid oxidált, illetve redukált alakja
FBPáz-1 – fruktóz-1,6-difoszfátáz
FBPáz-2 – fruktóz-2,6-difoszfátáz
FH₄ – tetrahidrofolát
FID – lángionizációs detektor
F_k – a metabolikus nitrogén, endogén nitrogén a bélsárban (metabolic nitrogen, endogenous fecal nitrogen)
FLEC – 1-(9-fluorenil)-etil-kloroformát
fMet – N-formil-metionin
FMN, FMNH₂ – flavin-mononukleotid oxidált, illetve redukált alakja
FMOOC – 9-fluorenil-metil-kloroformát (9-fluorenil-metil-klór-hangyasav-észter)
FP – flavoprotein
Fru – D-fruktóz

G

G – guanin
G1P – glükóz-1-foszfát
G3P – glicerinaldehid-3-foszfát
G6P – glükóz-6-foszfát
GABA – γ -amino-vajsav
Gal – D-galaktóz
GalN – D-galaktózamin
GalNAc – N-acetil-D-galaktózamin
GAP – glicerinaldehid-3-foszfát
GC – gázkromatográfia
GDH – glutamát-dehidrogenáz

GDP – guanozin-difoszfát
GH – növekedési hormon
GITC – 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glükopiranozil-izocianát
Glc – D-glükóz
GLC – gáz-folyadékkromatográfia
GlcN – D-glükózamin
GlcNAc – N-acetil-D-glükózamin
GlcUA – D-glükuronsav
Gln – glutamin
Glu – glutamát
Glx – glutamin és glutamát
Gly – glicin
GMP – guanozin-monofoszfát
GOT – glutaminsav-oxálacetát transzamináz
GPT – glutaminsav-piroszőlősav transzamináz
GPV – bruttó fehérjeérték (gross protein value)
GSH, GSSG – glutation és oxidált formája
GTP – guanozin-trifoszfát

H

Hb – hemoglobin (dezoxihemoglobin)
HbO₂ – oxihemoglobin
HCH – hexaklór-ciklohexán
HFBA – hexafluor-vajsav-anhidrid
His – hisztidin
HMDS – hexametil-diszilazan
HMG-CoA – β -hidroxi- β -metil-glutaril-CoA
HPLC – nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

Hyp, – Hy-Pro hidroxiprolin

I

I – az elfogyasztott nitrogén mennyisége (intake nitrogen)

I – inozin

I/D – esszenciális/nélkülözhető aminosav–nitrogén arány (indispensable/dispensable amino acid nitrogen ratio)

IDP – inozin-difoszfát

IEC – ioncserés

oszlopkromatográfia

IEF – izoelektromos fókuszálás

Ig – immunglobulin

IgG – immunglobulin G

Ile – izoleucin

IMP – inozin-monofoszfát

ITP – inozin-trifoszfát

K

α -KG – α -ketoglutarát

KLS – konjugált linolsav

KLMS – konjugált linolsav metilészter

L

LAL – lizinalanin

LD₅₀ – letális dózis

LDH – laktátdehidrogenáz

LDL – alacsony sűrűségű lipoprotein

Leu – leucin

LH – luteinizáló hormon

LPU – májfehérje-hasznosítás (liver protein utilization)

LSM – linolsav metilészter

Lys – lizin

M

Man – D-mannóz

Mb – mioglobin

MbO₂ – oximioglobin

MEAA – integrált aminosav index

Met – metionin

mRNS – messenger ribonukleinsav

MS – tömegspektrométer

MSA – mono(trimetil-szilil)acetamid

MSTFA – mono(trimetil-szilil)trifluor-acetamid

MTBSTFA – N-metil-N-(t-butil-dimetil-szilil)trifluor-acetamid

Mur – muraminsav

N

N – nitrogén

NAC – N-acetil-L-cisztein

NAD⁺, NADH+H⁺ – nikotinsavamid-adenin-dinukleotid oxidált, illetve redukált alakja

NADP⁺, NADPH+H⁺ –

nikotinsavamid-adenin-
dinukleotid-foszfát oxidált,
illetve redukált alakja

NAG – N-acetil-glükózamin

NAM – N-acetil-muraminsav

NBI – nitrogénegyensúly-,
nitrogénmérleg-index (nitrogen
balance index)

NEB – nem enzimes barnulás

NeuNAc – N-acetil-neuraminsav

NGI – nitrogénnövekedési index
(nitrogen growth index)

N-HFB – N-heptafluor-butiril

NIR – közeli infravörös
tartományban reflexió

NIT – közeli infravörös
tartományban transzmisszió

NMN⁺, – NMNH
nikotinsavamid-
mononukleotid és redukált
formája

NMP, – NDP, NTP
nukleozid-mono-, di- és
trifoszfát

NMR – magmágneses rezonancia

NPN – nemfehérje nitrogén

NPR – nettó fehérjehatékonyság
(nettó fehérjearány-index) (net
protein ratio)

NPU – nettó fehérjehasználás
(net protein utilization)

NPV – nettó fehérjeérték (net
protein value)

NR – nitrogénretenció (nitrogen
retention)

NSI – nitrogénoldhatósági index

N_u – nitrogénürítés

N-TFA – N(O,S)-trifluor-ecetsav

O

OAA – oxálacetát

ODC – ornitin dekarboxiláz

OPA – o-ftálaldehid

P

PAA – plazmaaminosav-arány
(plasma amino acid ratio)

PAB, – PABA p-amino-benzoesav

PAGE – poliakrilamid-gél
elektroforézis

PAH – policiklikus aromás
szénhidrogének

PDI – fehérjeoldhatósági index
(protein dispersibility index)

PDR – pepszinemészthetőségi
index (pepsin digest residues)

PE – foszfatidil-etanol-amin

PEP – foszfo-enolpiruvát

PEQ – fehérjeenergia-százalék
(protein/energy quotient)

PER – fehérjehatékonysági arány
(protein efficiency ratio)

PFK – foszfo-fruktokináz

2PG – 2-foszfo-glicerát

3PG – 3-foszfo-glicerát

Phe – fenil-alanin

PHT – fenil-tiohidantoin

PI – foszfatidil-inozitol

P_i – inorganikus foszfát

PIP₂ – foszfo-inozitol-difoszfát

PITC – fenil-izo-tiocianát

PK – proteinkináz vagy
piruvátkináz

PKU – fenilketonurea

PLP – piridoxál-5-foszfát

Pn – foszfo-pantetein
Pol – polimeráz
PPD – pepszin-pankratin-hidrolizátum index (pepsin-pancreatin digest)
PPDD – pepszin-pankreatin-dialízis index (pepsin-pancreatin-digest-dialysate)
PPDI – pepszin-pankreatin-emészthetőségi index (pepsin-pankreatin-digest-index)
PP_i – inorganikus pirofoszfát
PPW – produktív fehérjeérték index (productive protein value)
PQ – plasztokinon
PRE – fehérjeretenció-hatékonyság (protein retention efficiency)
Pro – prolin
PRPP – foszfo-ribozil-pirofoszfát

R

RGI – relatív növekedési index (relative growth index)
Rib – D-ribóz
RNáz – ribonukleáz
RNS – ribonukleinsav
RNU – relatív nitrogénhasznosítás (relative nitrogen utilization)
RNV – relatív táplálkozási érték (relative nutritive value)

RP-HPLC – fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
rRNS – riboszomális ribonukleinsav
RSD – relatív szórás
RV – helyettesítési érték (replacement value)

S

SAM – S-adenozil-metionin
SDS – nátrium-dodecil-szulfát
Ser – szerin
SMM – S-metil-metionin-szulfonium-klorid
SRNS – oldható RNS

T

T – timin
TATG – 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio- β -D-glükopiranozid
TCA – triklór-ecetsav
TD – valódi emészthetőség (true digestibility)
TFAA – trifluor-ecetsav
THF – tetrahidro-folsav
Thr – treonin
TIM – *trióz-foszfát izomeráz*
TMP, TDP, TTP – timidin-5'-mono-, di-, trifoszfát
TMS – trimetil-szilil-csoport
TPP – tiamin-pirofoszfát
tRNS – transzfer ribonukleinsav
Trp – triptofán

Tyr – tirozin

U

U – a vizelet nitrogéntartalma
(urinary nitrogen)

U – uracil

UDP – uridin-difoszfát

UDP-Gal –
uridin-difoszfát-galaktóz

UDP-Glc –
uridin-difoszfát-glükóz

U_k – endogénvizelet-nitrogén
(endogenous urinary nitrogen)

UMP – uridin-monofoszfát

UQ – koenzim-Q, ubikinon

UTP – uridin-trifoszfát

UV – ultraibolya

V

Val – valin

VIS – látható fény tartománya

SZAKIRODALOM

- AKESON, W. R.–STAHMANN, N. A.
1964 A Pepsin Pancreatin Digest Index for Protein Quality Evaluation. *J. Nutrition* 83. 257–261.
- ALLISON, J. B.
1955 Biological Evaluation of Proteins. *Physiol. Rev.* 35. 664–700.
1964 Mammalian Protein Metabolism. 2. Ed.:
Munro, H. N.–Allison, J. B. New York, Acad. Press.
- ALMQUIST, H. J.–STOKSTAD, E. L. R.–HALBROCK, E. R.
1935 *J. Nutr.* 10. 193. Ref.: Evaluation of Protein Quality.
NAS–NRC. Publ. No 1100. Washington, 1963.
- A.O.A.C.
1975 Biological Evaluation of Protein Quality. In: *Official methods of analysis*, 12. Ed.: Washington, 1–857.
- ARIYOSHI, Y.–KOHMURA, M.–HASEGAWA, Y.–OTA, M.–NIO, N.
1991 Sweet Peptides and Proteins: Synthetic Studies. *ACS Symposium Series* 450. 1–41.
- ASO, K.–YAMASHITA, M.–ARAI, S.–FUJIMAKI, M.
1974 Tryptophan-, Threonine-, and Lysine-Enriched Plasteins from Zein. *Agric. Biol. Chem.* 38. 679.
- BABINSZKY L.
1996 A sertéstakarmányok fehérjetartalmának értékelése az ileális emészthetőség alapján. In: *Új kihívások és stratégiák az agrártermelésben*. XXVI. Óvári Tudományos Napok. 1996. szeptember 25. 231–238.
2002 *Magyarország fehérjegyazdálkodásának helyzete és a fejlesztés stratégiája*. Budapest, Agroinform Kiadó.
- BABINSZKY L.–BOER, H.–Van Der MEER, J. H. et alii
1987 Új multienzim módszer az in vitro fehérjeemészthetőség megállapítására sertések részére. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 2. 151–156.
- BABINSZKY L.–GUNDEL J.–TOSSENBERGER J.–FÉBEL H. et alii
2000 Az aminosavak ileális emészthetősége sertésekben. II. A sertés abrakkeverékek összeállítása az aminosavak ileális emészthetősége alapján. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 5. 459–467.

- BABINSZKY L.–TOSSENBERGER J.
1996 Újabb lehetőségek a baromfi takarmányok emészthető aminosav-tartalmának a meghatározására. In: *Nemzetközi Baromfitenyésztési Tanácskozás Debrecen*. DATE Állattenyésztési Napok III. 1996. augusztus 18–19. 204–212.
- BABINSZKY, L.–TOSSENBERGER, J.–HORN, P.–KOVÁCS, R.
2001 Effect of Threonine Supply on the True Ileal Digestibility of Amino Acids and on Performance in Weaned Piglets. *Journal of Animal Science* 79. Suppl. 1. 147.
- BABINSZKY L.–TOSSENBERGER J.–KARAKAS P. et alii
1999 Az aminosavak emészthetőségének meghatározása különböző módszerekkel baromfiban. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 4. 445–453.
- BABINSZKY, L.–TOSSENBERGER, J.–ROTT, J. et alii
1994 *Die Wirkung der Theonin- Versorgung auf die präzäkale Aminosäurenverdaulichkeit und die Mastleistung von Schweinen 3. Tagung*. Schweine und Geflügelernährung. Halle.11. 29–12. 01. 18–21.
- BABINSZKY, L.–TOSSENBERGER, J.–SZABÓ, J.
1996 The Effect of Supplemental Threonine on the Ileal Digestibility of Amino Acids and the Performance of Growing and Fattening Pigs. *Krmiva* 4. 189–194.
- BABINSZKY, L.–Van Der MEER, J. M. et alii
1990 An in Vitro Method for Prediction of the Digestible Crude Protein Content in Pig feed. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 50. 173–178.
- BABINSZKY L.–VINCZE L.
2002 Ipari úton előállított aminosavak felhasználása a gazdasági haszonállatok takarmányozásában. In: Babinszky L. (szerk.): *Magyarország fehérjegyártásának helyzete és a fejlesztés stratégiája*. Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományok Osztálya, Budapest, Agroinform Kiadó. 113–160.
- BALTES, W. (ed.)
1990 *Rapid Methods for Analysis of Food and Food Raw Material*. Hamburg, Behr's Verlag.
- BARMES, R. H.–BATES, M. J.–MAACK, J. E.
1946 The Growth and Maintenance Utilization of Dietary Pprotein. *J. Nutrition* 32. 535–548.

- BARTON-WRIGHT, E. C.
1952 *The Microbiological Assay of the Vitamin B-complex and Amino Acids*. London, Ed.: Pittman and Sons.
- BAVETTA, L. A.–NARROD, S. A.
1957 Xanthine Oxidase in Pair-Fed Rats on Diets Marginally Deficient in Lysine. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 94. 289–290.
- BEDŐ S.–LAKI I.
1972 Adatok a takarmányanyagok táplálóanyag-tartalma és a felhasználás mértékének összefüggéséhez. *Állattenyésztés* 21. 1. 61–70.
- BELITZ, H. D.–GROSCH, W.
1999 *Food Chemistry*. Berlin, Springer Verlag.
- BELITZ, H. D.–WIESER, H.
1976 Zur Konfigurationsabhängigkeit des süßen oder bitteren Geschmacks von Aminosäuren und Peptiden. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 160. 251.
- BENDER, A. E.–DOELL, B. H.
1957 Biological Evaluation of Proteins: a New Aspect. *Brit. J. Nutr.* 11. 140–148.
- BENDER, M. L.–BERGERON, R. J.–KOMIYAMA, M.
1984 *The Bioorganic Chemistry of Enzymatic Catalysis*. New York, John Wiley and Sons.
- BERGMEYER, H. U.–BERGMEYER, J.–GRASSL, M.
1983 *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd edn. Vol. 1. Weinheim, Verlag Chemie.
- BERGMEYER, H. U.–GAWEHN, K.
1977 *Grundlagen der enzymatischen Analyse*. Weinheim, Verlag Chemie.
- BETZ, A.
1974 *Enzyme*. Weinheim, Verlag Chemie.
- BIRCH, G. G.–BLAKEBROUGH, N.–PARKER, K. J.
1981 *Enzyme and Food Processing*. London, Applied Science Publ.
- BIRK, J.
1969 Saponins. In: *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*. Ed.: Leiner, I. New York, Acad. Press.
- BJARNASON, J.–CARPENTER, K. J.
1970 Mechanism of Heat Damage in Proteins 2. *Brit. J. Nutr.* 24. 313–329.

- BLOCK, R. J.–MITCHELL, H. H.
1946 The Correlation of the Amino Acid Composition of Proteins with their Nutritive Value. *Nutr. Abstr. Rev.* 16. 249–278.
- BODANSZKY, M.
1988 *Peptide Chemistry*. Berlin, Springer-Verlag.
- BODWELL, C. E.
1975 Biochemical Parameters as Indices of Protein Nutritional Value. In: Friedmann, M. (1975): *Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds*. New York. 261–310.
- BOGGS, R. W.
1978 Bioavailability of Acetylated Derivatives of Methionine, Threonine and Lysine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 105. 571.
- BOLDIZSÁR H.
1974 *A fehérje- és az aminosav-anyagcsere kórélettana. Állatorvosi kórélettan*. Szerk.: Karsai F. Budapest, Mezőgazdasági Kiadó.
- BOYNES, A. W.–CARPENTER, K. J.–WOODHAM, A. A.
1961 Progress Report on an Assessment of Laboratory Procedures Suggested as Indicators of Protein Quality in Feeding Stuffs. *J. Sci. Food Agric.* 12. 832–848.
- BRESSANI, R.–ELIAS, L. G.
1979 Improvement of the Nutritional Quality of Food Legumes. *Food and Nutr. Bull.* 1. 4. 23–34.
- BRÜCKNER, H.–HAUSCH, M.
1990 D-Amino Acids in Dairy Products: Detection, Origin and Nutritional Aspects. I. Milk, Fermented Milk, Fresh Cheese and Acid Curd Cheese. *Milchwissenschaft* 45. 357–360.
1990 D-Amino Acids in Dairy Products: Detection, Origin and Nutritional Aspects. II. Ripened Cheeses. *Milchwissenschaft* 45. 421–429.
- CALHOUN, W. K.–HEPBURN, F. N.–BRADLEY, W. B.
1960 The Availability of Lysine in Wheat Flour, Bread and Gluten. *J. Nutr.* 70. 337–347.
- CAMPBELL, J. A.
1963 Method for Determination of PER and NPR. In: *Evaluation of Protein Quality*. Washington, Nat. Res. Council Publ. 1100. 1–31.
- CARPENTER, K. J.
1960 The Estimation of the Available Lysine in Animal-Protein Foods. *Biochem. J.* 77. 604–610.

- CARPENTER, K. J.–BOOTH, V. H.
1973 Damage to Lysine in Food Processing: its Measurement and its Significance. *Nutr. Abstr. Rev.* 43. 423–451.
- CARPENTER, K. J.–LEA, C. H.–PARR, L. J.
1963 Chemical and Nutritional Changes in Stored Herring Meal. 4. Nutritional Significance of Oxidation of the Oil. *Brit. J. Nutr.* 17. 151–169.
- CARPENTER, K. J.–MCDONALD, I.–MILLER, W. S.
1972 Protein Quality of Feeding Stuffs. 5. Collaborative Studies on the Biological Assay of Available Methionine Using Chicks. *Brit. J. Nutr.* 27. 7–17.
- CENKVÁRI É.–SCHMIDT J.
1989 Néhány takarmány in vitro és in sacco módszerrel mért lebonthatóságának összehasonlító vizsgálata. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 38. 6. 561–573.
1991 Védett metioninkészítmények bendőbeli lebonthatóságának vizsgálata in vivo módszerrel. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 40. 2. 163–171.
1991 Védett metioninkészítmények etetésének hatása a tehenek tejtermelésére és a tej összetételére. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 40. 2. 179–187.
1991 Einfluss verschieden geschützter Methioninpräparate auf Milchleistung und Milchinhaltsstoffe bei Kühen. *Die Mühle und Mischfüttertechnik* 128. 25. 313–314.
- CHERRY, J. P. (Ed.)
1981 Protein Functionality in Foods. *ACS Symposium Series 147*, Washington, D. C., American Chemical Society.
- CHESWORTH, J. M.–STUCHBURY, T.–SCAIFE, J. R.
1998 *Agricultural Biochemistry*. London, Chapman & Hall.
- CHOW, B. F.–ALLISON, J. B.–COLE, W. H.–SEELY, R. D.
1945 Effect of Protein Depletion on Plasma Proteins in the Dog Measured by Electrophoretic Analysis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 60. 14–17.
- CHOW, B. F.–ALPER, C.–DEBIASE, S.
1948 The Effect of Oral Administration of Different Proteins on the Plasma Proteins of Protein-Depleted Dogs. *J. Nutr.* 36. 785–801.
- COMBS, G. F.–BOSSARD, E. H.–CHILDS, G. R.
1968 Improved Chick Bioassays for Available Lysine and Available Methionine. *Feedstuffs* 40. 36–38.

COOPER, C.–PACKER, N.–WILLIAMS, K.

2001 *Amino Acid Analysis Protocols*. New Jersey, Humana Press.

COUCH, J. R.

1975 Collaborative Study of the Determination of Available Lysine in Proteins and Feeds. *J.A.O.A.C.* 58. 599–601.

CREIGHTON, T. E.

1983 *Proteins: Structures and Molecular Properties*. New York, W. H. Freeman and Co.

CREMER, H. D.

1963 Procedure for Protein Evaluation by Tests on Growing Rats. In: *Evaluation of Protein Quality*. Washington, NAS-NRC Publ. 1100.

CROFT, L. R.

1980 *Introduction to Protein Sequence Analysis*. 2nd ed., Chichester, John Wiley and Sons, Inc.

CSAPÓ J.

1982 Gyors módszer élelmiszerek és takarmányok cisztintartalmának meghatározására ioncserés oszlopkromatográfiával. *Élelmiszervizsgálati Közlemények* 4. 163–172.

1983 Takarmányok és élelmiszerek aminosav-összetételének meghatározása különböző fehérjehidrolízis módszerekkel. *Élelmiszervizsgálati Közlemények* 3–4. 159–169.

2000 Élelmiszereink. Alapvető élelmiszerek. Tej és tejtermékek. In: *A táplálkozás egészségkönyve*. Szerk.: Hajós Gy.–Zajkás G. Budapest, Kossuth Kiadó. 131–143.

CSAPÓ J.–CSAPÓ Jné

1985 A toll-liszt összetétele és részarányának kimutatása húslisztekben. *Szaktanácsok* 3. 36–43.

1985 *Új ioncserés oszlopkromatográfiás módszerek élelmiszerek és takarmányok analízisében*. MTA Kémiai Osztály Erdey László díjas pályamunka. Budapest.

1986 Takarmányok és élelmiszerek cisztintartalmának meghatározása cisztein formában. A redukció mint a cisztinmeghatározás hibaforrása. *Élelmiszervizsgálati Közlemények* 4. 224–233.

1986 Takarmányok és élelmiszerek triptofántartalmának meghatározása fotometriásan és ioncserés oszlopkromatográfiával. *Élelmiszervizsgálati Közlemények* 3. 150–161.

- 1989 D- és L-aminosavak elválasztása és meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával diasztereomer dipeptid formában. I. Az alanil dipeptidok szétválasztása és meghatározása. *Élelmiszervizsgálati Közlemények* 3. 140–152.
- CSAPÓ J.–CSAPÓ Jné–JURICSKAI I.
1986 Állati eredetű fehérjetakarmányok toll-liszt tartalmának mennyiségi meghatározása. *Magyar Állatorvosok Lapja* 7. 421–426.
- CSAPÓ J.–CSAPÓ Jné–PENKE B.
1989 D- és L-aminosavak elválasztása és meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával diasztereomer dipeptid formában. II. A 2-szulfonsav alanil dipeptidok szétválasztása és meghatározása. *Élelmiszervizsgálati Közlemények* 4. 201–208.
- CSAPÓ, J.–CSAPÓ, Jné–PENKE, B.–TÓTH-PÓSFAL, I.
1991 Separation and Determination of D- and L-Amino Acids by Ion Exchange Column Chromatography in the Form of Diastereomer Dipeptides. *Acta Alimentaria* 1. 87–104.
- CSAPÓ, J.–CSAPÓ, Jné–TÓTH, Lné
1986 Optimization of Hydrolysis at Determination of Amino Acid Content in Food and Feed Products. *Acta Alimentaria* 1. 3–21.
- CSAPÓ, J.–CSAPÓ, Jné–TÓTH, Lné–PENKE, B.
1986 Determination of the Cystine Content of Foods and Feeds by Mercaptoethanesulfonic Acid Hydrolysis. *Acta Alimentaria* 3. 227–235.
- CSAPÓ J.–CSAPÓ-KISS Zs.
2002 *Tej és tejtermékek a táplálkozásban*. Budapest, Mezőgazda Kiadó.
- CSAPÓ, J.–CSAPÓ-KISS, Zs.–CSAPÓ, J. Jr.
1998 Use of the Amino Acids and Amino Acid Racemization for Age Determination in Archaeometry. *Trends in Analytical Chemistry* 17. 3. 140–148.
- CSAPÓ, J.–CSAPÓ-KISS, Zs.–CSORDÁS, E. et alii
1995 Rapid Method for the Determination of Diaminopimelic Acid Using Ion Exchange Column Chromatography. *Analytical Letters* 28. 2049–2061.
- CSAPÓ J.–CSAPÓ-KISS Zs.–CSORDÁS E.–FOX, P. F. et alii
1997 Különböző technológiával készült sajtok összes szabad- és szabad D-aminosav-tartalma. *Tejipar* 57. 1. 25–30.

- CSAPÓ, J.–CSAPÓ-KISS, Zs.–FOLESTAD, S. et alii
1994 Determination of Tryptophan and Methionine by Mercaptoethanesulfonic Acid Hydrolysis at Elevated Temperature. *Acta Alimentaria* 23. 257–266.
- CSAPÓ, J.–CSAPÓ-KISS, Zs.–STEFLE, J.
1997 Influence of Mastitis on D-Amino Acid Content of Milk. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 62. 1–2. 162–167.
1997 Determination of the Proportion of Mastitic Milk in the Bulk Tank Milk Based on Free D-Amino Acid Content. *Authenticity and Adulteration of Food - the Analytical Approach*. Euro Food Chem IX. Interlaken. 1997. Sept. 24–26. 95–100.
- CSAPÓ, J.–CSAPÓ-KISS, Zs.–STEFLE, J. et alii
2000 D-Amino Acid Content of Mastitic Milk. *Hungarian Agricultural Research* 9. 3. 7–10.
- CSAPÓ J.–CSAPÓ-KISS Zs.–VARGÁNÉ VISI É. et alii
1997 Élelmiszerek D-aminosav-tartalma. Irodalmi áttekintés. *Acta Agraria Kaposváriensis* 1. 1. 3–20.
2001 The D-Amino Acid Content of Foodstuffs (Literature review). *Tejgazdaság* 41. 1–11.
- CSAPÓ J.–EINARSSON, S.
1993 Élelmiszerek és takarmányok D-aminosav tartalma. 1. Az aminosav enantiomerek szétválasztása és meghatározása az 1-/9-fluorenil/etil-kloroformáttal történő származékképzés után fordított fázisú folyadékkromatográfiával. *Élelmiszervizsgálati Közlemények* 39. 290–302.
- CSAPÓ, J.–FOLESTAD, S.–TIVESTEN, A.–CSAPÓ-KISS, Zs.
1994 Mercaptoethanesulfonic Acid as a Protecting and Hydrolysing Agent for the Determination of the Amino Acid Composition of Proteins Using an Elevated Temperature for Protein Hydrolysis. *Analytica Chimica Acta* 289. 1. 105–111.
- CSAPÓ J.–GOMBOS S.–CSAPÓ Jné–TOSSEBERGER J.
1991 A bakteriális eredetű fehérje mennyiségi meghatározása a bendőfolyadék és a béltartalom diamino-pimelinsav- és D-alanin-tartalma alapján. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 5. 431–441.
- CSAPÓ, J.–GOMBOS, S.–HENICS, Z.–TÓTH, Lné
1988 Modified Method of Diaminopimelic Acid Determination in Samples of Biological Origin. *Acta Alimentaria* 2. 159–167.

- CSAPÓ, J.–HENICS, Z.
1991 Quantitative Determination of Bacterial Protein from the Diaminopimelic Acid and D-Alanine Content of Rumen Liquor and Intestines. *Acta Agronomica Hungarica* 1–2. 159–173.
- CSAPÓ, J.–MARTIN, T. G.–CSAPÓ-KISS, Zs. et alii
1995 Influence of Udder Inflammation on the D-Amino Acid Content of Milk. *Journal of Dairy Science* 78. 2375–2381.
- CSAPÓ, J.–NÉMETHY, S.–FOLESTAD, S. et alii
1994 Age Determination Based on Amino Acid Racemization. A New Possibility. *Amino Acids* 7. 317–325.
- CSAPÓ, J.–POHN, G.–CSAPÓ-KISS, Zs. et alii
2001 Determination of the Enantiomers of Methionine and Cyst(e)ine in the Form of Methionine-Sulphon and Cysteic Acid after Performic Acid Oxidation by RP-HPLC. 7th International Congress on Amino Acids and Proteins. Vienna, Austria, 2001. Aug. 6–10. *Amino Acids* 4–5.
- CSAPÓ J.–POHN G.–VARGÁNE VISI É.
2001 *A mikrohullámú kezelés hatása húspogácsák vízzoldható vitamin- és D-aminosav-tartalmára*. Műszaki Kémiai Napok. Veszprém, 2001. április 24–26. 200–204.
- CSAPÓ, J.–SCHMIDT, J.–CSAPÓ-KISS, Zs.
2001 Determination of Protein of Bacterial Origin. A Review. *Trends in Analytical Chemistry* 20. 1. 42–48.
- CSAPÓ, J.–SCHMIDT, J.–CSAPÓ-KISS, Zs. et alii
2001 A New Method for the Quantitative Determination of Protein of Bacterial Origin on the Basis of D-Aspartic Acid and D-Glutamic Acid Content. *Acta Alimentaria* 30. 1. 37–52.
- CSAPÓ, J.–TÓTH-PÓSFAL, I.–CSAPÓ-KISS, Zs.
1990 Separation of D- and L-Amino Acids by Ion Exchange Chromatography in the Form of 2-Sulfonic Acid Alanyl Dipeptides. *Amino Acids* 1. 96–101.
1991 Separation of D- and L-Amino Acids by Ion Exchange Column Chromatography in the Form of Alanyl Dipeptides. *Amino Acids* 1. 331–337.
- CSAPÓ-KISS, Zs.–CSAPÓ, J.–KÖLTŐ, L.–NÉMETHY, S.
1997 A Possible Error in Amino Acid Dating. Archaeological Sciences 1995. Proceedings of a Conference on the Application of Scientific Techniques to the Study of Archaeology. *Oxbow Monograph* 64. 193.

- CSAPÓ-KISS, Zs.–FOX, P. F.–CSAPÓ, J.–WÁGNER, L.
1997 Total Free and Free D-Amino Acid Content of Cheeses Produced by Different Technologies. 5th International Congress on Amino Acids. Chalkidiki. 1997. aug. 25–29. *Amino Acids* 13. 26.
- CUTHBERTSON, D. P.–TILSTONE, W. J.
1972 Amino Acid and Protein Metabolism in the Gut. In: *Protein and Amino Acid Function*. Ed.: Bigwood, E. J. Oxford, Pergamon Press. 113–155.
- DÄNNER, E.–SCHMIDT, J.–KLUGE, H.–NONN, H.–HEROCH, H.
2001 The Effect of Treated Rapeseed Meal in the Diet of Growing Bulls on Dietary Protein Degradability in the Rumen. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 4. 353–362.
- DÄNNER, E.–SCHMIDT, J.–KLUGE, H.–NONN, H.–JEROCH, H.
1999 Einfluss technischer Behandlung von Rapskuchen auf die Abbaubarkeit des Futterproteins im Pansen. *Journal Anim. Physiol. and Anim. Nutr.* 82. 227–237.
- DAVIS, N. C.–WHIPPLE, G. H.
1921 Liver Regeneration Following Chloroform Injury as Influenced by the Feeding of Casein or Gelatin. *Arch. Int. Med.* 27. 679–687.
- DEGROOTH, A. P.–SLUMP, P.
1969 Effects of Severe Alkali Treatment of Proteins on Amino Acid Composition and Nutritive Value. *J. Nutr.* 98. 45–56.
- DEMUELENAERE, H. J. H.–CHEN, M. L.–HARPER, A. E.
1967 Assessment of Factors Influencing Estimation of Lysine Availability in Cereal Products. *J. Agr. Food. Chem.* 15. 310–317.
- DÉVÉNYI T.
1972 *Az aminosavanalítika újabb eredményei*. Agroinform. Témadokumentáció. Budapest.
- DÉVÉNYI, T.–BÁTI, J.–HALLSTRÖM, B.–TRÄGORDH, C. et alii
1974 Determination of Available Methionine in Plant Materials. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* 9. 395–398.
- DÉVÉNYI T.–GERGELY J.
1963 *Aminosavak, peptidek, fehérjék*. Budapest, Medicina.
- DUCKWORTH, J.–WOODHAM, A. A.–MCDONALD, I.
1961 The Assessment of Nutritive Value in Protein Concentrate by the Gross Protein Value Method. *J. Sci. Food Agric.* 12. 407–417.

DVORAK, Z.

1968 *Availability of Essential Amino Acids from Proteins*. I. *J. Sci. Food Agric.* 19. 71–76.

DWORSCHÁK E.

1977 *Szénhidrátok és aminosavak reakciói élelmiszerekben hevítés hatására*. Kand. ért. Budapest.

DWORSCHÁK E.–ŐRSI F.

1978 Aminosavszármazékok keletkezése az élelmiszer-fehérjék lúgos kezelése során. *Élelmiszervizsg. Közl.* 24. 104–111.

EGGUM, B. O.

1973 *A Study of Certain Factors Influencing Protein Utilization in Rats and Pigs*. 404. *Beretning fra forøgslaboratoriet*. Kobenhavn.

1973 The Levels of Blood Amino Acids and Blood Urea as Indicators of Protein Quality. In: *Proteins in Human Nutrition*. Ed.: Porter, J. W. G.–Rolls, B. A. New York–London, Academic Press. 317–327.

ELŐDI P.

1972 *A fehérjék titkai nyomában*. Budapest, Gondolat.

1989 *Biokémia*. Budapest, Akadémiai Kiadó.

ENSMINGER, M. E.–ENSMINGER, A. H. et alii

1995 *The Concise Encyclopedia of Foods & Nutrition*. New York, CPC Press.

ERBERSDOBLER, H.

1973 In: *Proteins in Human Nutrition*. Ed.:

Porter, J. W. G.–Rolls, B. A. New York–London, Acad. Press.

ERDEY L.

1966 *Bevezetés a kémiai analízisbe. Mennyiségi kémiai analízis*. Budapest, Tankönyvkiadó.

1966 *Bevezetés a kémiai analízisbe. Minőségi kémiai analízis*. Budapest, Tankönyvkiadó.

ERIKSSON, C. (Ed.)

1981 *Maillard Reactions in Food. Chemical, Physiological and Technological Aspects*. Oxford, Pergamon Press.

FAO (WHO)

1973 Energy and Protein Requirements. *Techn. Rep. Serie*. No. 552. Geneva.

FAO: Nutritional Studies

1972 *Amino Acid Content of Foods and Biological Data on Proteins*. Rome.

- FEENEY, R. E.
1977 Chemical Changes in Food Proteins. In: *Evaluation of Proteins for Humans*. Ed.: Bodwell, E. Avi. Connecticut, Publ. Co. Westport.
- FEENEY, R. E.–WHITAKER, J. R.
1977 *Food Proteins Improvement through Chemical and Enzymatic Modification*. Washington, American Chemical Society.
- FENNEMA, O. R.
1976 Water and Ice. In: *Principles of Food Science*. Part I. (Ed.: Fennema, O. R.) New York, Marcel Dekker, Inc. 1–13.
- FOLESTAD, S.–TIVESTEN, A.–CSAPÓ J.
1994 Élelmiszerek és takarmányok D-aminosav-tartalma. 2. Az aminosav enantiomerek szétválasztása és meghatározása OPA/TATG származékképzés után. *Élelmiszervizsgálati Közlemények* 40. 17–26.
- FOLIN, O.
1905 A Theory of Protein Metabolism. *Amer. J. Physiol.* 13. 117–138.
- FORD, J. E.
1960 A Microbiological Method for Assessing the Nutritional Value of Proteins. 1. *Brit. J. Nutr.* 14. 485–497.
1962 A Microbiological Method for Assessing the Nutritional Value of Proteins. 2. *Brit. J. Nutr.* 16. 409–425.
1964 A Microbiological Method for Assessing the Nutritional Value of Proteins. 3. *Brit. J. Nutr.* 18. 449–460.
- FORD, J. E.–SALTER, D. N.
1966 Analysis of Enzymically Digested Food Protein by Sephadex-Gel Filtration. *Brit. J. Nutr.* 20. 843–860.
- FRAENKEL-CONRAT, H.–COOPER, M.
1944 The Use of Dyes for the Determination of Acid and Basic in Proteins. *J. Biol. Chem.* 154. 239–246.
- FRANK, H.–NICHOLSON, G. J.–BAYER, E.
1977 Rapid Gas Chromatographic Separation of Amino Acid Enantiomers with a Novel Chiral Stationary Phase. *J. Chromatogr. Sci.* 15. 174.
- FRANKEL, E. N.
1991 Recent Advances in Lipid Oxidation. *J. Sci. Food Agric.* 54. 495.

FRANKS, F.

1975 Water, Ice and Solutions of Simple Molecules. In: *Water, Relations of Foods*. Ed.: Duckworth, R. B., London, Academic Press. 1–3.

FRIEDMAN, M.–FINLEY, J. W.

1975 Vinyl Compounds as Reagents for Available Lysine in Proteins. In: Friedman, M.: *Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds*. Ed.: Marcel Dekker I. New York. 503–520.

GARDNER, H. W.

1979 Lipid Hydroperoxide Reactivity with Proteins and Amino Acids. A Review. *J. Agric. Food Chem.* 27. 220.

GASZTONYI K.–LÁSZTITY R. (szerk.)

1992 *Élelmiszer-kémia 1*. Budapest, Mezőgazda Kiadó.

1992 *Élelmiszer-kémia 2*. Budapest, Mezőgazda Kiadó.

GERGELY P.–ERDŐDI F.–VEREB Gy.

1997 *Általános és bioszervetlen kémia*. Szerk.: Gergely P. Budapest, Semmelweis Kiadó.

GJOEN, A. U.–NJAA, L. R.

1977 Methionine Sulphoxide as a Source of Sulphur-Containing Amino Acid for the Young Rat. *Brit. J. Nutr.* 37. 93–105.

GLAZER, A. N.

1976 The Chemical Modification of Proteins by Group-Specific and Site-Specific Reagents. In: *The Proteins*. Eds.:

Neurath, H.–Hill, R. L.–Boeder, C. L., 3rd edn. Vol. II. p. 1. New York–London, Academic Press.

GONTZEA, I.–FERRANDO, L.

1968 *Substances antinutritives naturelles des aliments*. Paris, Vigot.

GUNDEL J.–BABINSZKY L.

1988 A takarmányok emészthetőségének megállapítása sertésekkel I. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 1. 73–80.

GUNDEL J.–SZENTMIHÁLYI S.

1979 A sertések táplálóanyag-szükséglete. *Magyar Mezőgazdaság* 34. 35.

GUNSTONE, F. D.–HARWOOD, J. L.–PADLEY, F. B.

1986 *The Lipid Handbook*. London, Chapman and Hall.

GYŐRI Z.

1983 *A mezőgazdasági termékek tárolása és feldolgozása*. Egyetemi jegyzet, DATE.

- 1987 *Az évjárat, a műtrágyázás és az öntözés hatása főbb szántóföldi növényeink tápelem-tartalmára és minőségére.* Kandidátusi értekezés. Debrecen. 1–132.
- 1998 *A termesztési tényezők hatása egyes gabonafélék és maghüvelyesek minőségére.* MTA Doktori értekezés. Budapest. 197.
- 1999 A tápanyagellátás hatása a növények minőségére. In: *Tápanyaggazdálkodás* (Szerk.: Fülek Gy.) Budapest, Mezőgazda Kiadó. 560–714.
- 2001 NPK Mineral Fertilization and Crop Quality. Fertilization in the Third Millennium. In: *Fertilizer, Food Security and Environmental Protection*. Eds.: L. Ji–G. Chen–E. Schnug–C. Hera–S. Haneklaus. Braunschweig–Budapest–Vienna, CIEC 2. 635–642.
- 2003 Effect of NPK Mineral Fertilization on the Protein Content and Amino Acid Composition of Soybean and Peas. *II. Alps-Adria Scientific Workshop*. Eds.: Cs. Gyuricza. Hungarian Academy of Sciences. Budapest, Akaprint. 60–65.
- GYÓRI Z.–BOCZ E.
1991 A trágyázás és öntözés hatása a borsó ásványi elem-tartalmára és aminosav-összetételére. Nitrogéntartalom és aminosav-összetétel. *Növénytermelés* 40. 6. 509–518.
- GYÓRI, Z.–DÁNIEL, P.–KOVÁCS, B.–LOCH, J.
1998 *Schwefelgehalt in verschiedenen Maishybriden.* Vdlufa-Verlag. 227–230.
- GYÓRI Z.–GYÓRI Z.-né
1998 *A búza minősége és minősítése.* Budapest, Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó.
- GYÓRI Z.–GYÓRINÉ-MILE I.
2002 *A kukorica minősége és minősítése.* Budapest, Szaktudás Kiadó.
- GYÓRI, Z.–JÁSZBERÉNYI, I.–PALENCSÁR, A. J.–LOCH, J.
1999 *Improving Crop Quality through Balanced Nutrient Management. Balanced Fertilization and Crop Response to Potassium.* International Potash Institute. Teheran, 1999. May 15–18. 199–216.
- GYÓRI, Z.–NEMESKÉRI, E.–SZILÁGYI, Sz.
1998 Legumes Grown under Nonirrigated Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46. 8. 3087–3091.

- GYŐRI, Z.–RUZSÁNYI, L.–KOVÁCS, B. et alii
1994 The Effect of Different Factors on the Element Uptake by Corn. Pollution and Water Resources. *Columbia University Seminar Series*. 24–25. 266–280.
- GYŐRI, Z.–SZILÁGYI Sz.
2001 The Effect of NPK Mineral Fertilization on the Alveographic Parameters of Winter Wheat. Fertilization in the Third Millenium. In: *Fertilizer, Food Security and Environmental Protection*. Eds.: L. Ji–G. Chen–E. Schnug–C. Hera–S. Haneklaus. Braunschweig–Budapest–Vienna, CIEC 2. 643–649.
- HAAGSMA, N.–SLUMP, P.
1978 Evaluation of Lysinoalanine Determinations in Food Proteins. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 167. 238.
- HAJÓS, Gy.–ZAJKÁS G.
2000 *A táplálkozás egészségkönyve*. Budapest, Kossuth Kiadó.
- HALEVY, S.–GROSSOWICZ, N.
1953 A Microbiological Approach to Nutritional Evaluation of Protein. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 82. 567–571.
- HARDMAN, T. M. (Ed.)
1989 *Water and Food Quality*. London, Elsevier Applied Science.
- HARRISON, H. C.–LONG, C. N. H.
1945 The Regeneration of Liver Protein in the Rat. *J. Biol. Chem.* 161. 545–557.
- HASSALL, K. A.
1982 *The Chemistry of Pesticides*. Weinheim, Verlag Chemie.
- HASSAN, K.–LYMAN, R. L.
1966 Effect of Trypsine Inhibitors on Methionine Metabolism. *J. Nutr.* 78. 455.
- HATHWAY, D. E.
1984 *Molecular Aspects of Toxicology*. The Royal Society of Chemistry, Burlington House, London.
- HEGEDŰS M.
1973 *Fehérjék biológiai értékének vizsgálata mikrobiológiai módszerrel*. Műszaki dokt. ért. Budapest.
- HEGEDŰS M.–KRALOVÁNSZKY U. P.–MÁTRAI T.
1981 *A takarmányfehérjék minősítése*. Budapest, Mezőgazdasági Kiadó.

- HEGSTED, D. M.–CHANG, Y. O.
1965 Protein Utilization in Growing Rats. I. Relative Growth Index as a Bioassay Procedure. *J. Nutr.* 85. 159–168.
- HEGSTED, D. M.–NEFF, R.
1970 Efficiency of Protein Utilization in Young Rats at Various Levels of Intakes. *J. Nutr.* 100. 1173–1179.
- HEGSTED, D. M.–NEFF, R.–WORCESTER, J.
1968 Determination of the Relative Nutritive Value of Proteins. *J. Agr. Food Chem.* 16. 190–195.
- HENRY, K. M.–KOSTERLITZ, H. W.–QUENOUILLE, H. M.
1953 A Method for Determining the Nutritive Value of a Protein by its Effect on Liver Protein. *Brit. J. Nutr.* 7. 51–67.
- HERBERT, R. A.
1989 Microbial growth at low temperatures. In: *Mechanism of Action of Food Preservation Procedures*. Ed.: Gould, G. W. London, Elsevier Applied Science. 1–71.
- HOLME, D. J.–PECK, H.
1998 *Analytical Biochemistry*. New York, Addison Wesley Longman Limited.
- HOLZ, G. G.
1973 The Nutrition of Tetrahymena. In: *Biology of Tetrahymena*. Ed.: Elliot, A. M. Duden. Stroudsburg, Pennsylvania, Hutchinson and Ross, Inc. 89–98.
- HORN, M. J.–BLUM, A. E.–WOMACK, M.–GERSDORFF, C. E. F.
1952 Nutritional Evaluation of Food Proteins by Measuring Availability of Amino Acids to Microorganisms. *J. Nutr.* 48. 231–241.
- HUDSON, B. J. F. (Ed.)
1982 *Developments in Food Proteins-1*. London, Applied Science Publ.
- HURREL, R. F.–LERMAN, P.–CARPENTER, K. J.
1979 Reactive Lysine in Foodstuffs as Measured by a Rapid Dye-Binding Procedure. *J. Food Sci.* 44. 1221–1231.
- HURT, H. D.–FORSYTHE, R. H.–KRIEGER, C. H.
1975 Factors which Influence the Biological Evaluation of Protein Quality by the Protein Efficiency Ratio Method. In: *Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds*. Ed.: Mendel F. New York, Marcell Dekker.

IKENAKA, T.–ODANI, S.–KOIDE, T.

1974 *Chemical Structure and Inhibitory Activities of Soybean Proteinase Inhibitors*. Bayer-Symposium V „Proteinase inhibitors” Berlin–Heidelberg, Springer-Verlag.

JUHÁSZ A.–SCHMIDT J.

2001 A fehérje valódi emészthetőségének megállapítása vakbélirtott brojlerekkel. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 50. 4. 341–352.

2002 Apparent and True Digestibility of Protein on Amino Acids in Poultry Feeds. 1. Methods of Determining Protein and Amino Acid Digestibility in Poultry. *Acta Agronomica Óváriensis* 44. 1. 87–94.

2002 The Effect of Caecectomy on the N-Cycling of Broilers and on the Apparent Digestibility of Protein. *Acta Agronomica Óváriensis* 44. 2. 150–160.

2003 A kísérleti módszer hatása a brojlercsirkék endogén nitrogénürítésére. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 52. 3. 243–254.

2003 Néhány takarmány látszólagos és valódi emészthető lizin-, metionin-, cisztin- és treonintartalmának vizsgálata vakbélirtott brojlerekkel. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 52. 4. 319–329.

KAKADE, M. L.–LIENER, I. E.

1969 Determination of Available Lysine in Proteins. *Anal. Biochem.* 27. 273–280.

KAKADE, M. L.–RACKIS, J. J.–MCGHEE, J. E.–PUSKI, G.

1974 Determination of Trypsin Inhibitor Activity of Soy Products: A Collaborative Analysis of an Improved Procedure. *Cereal Chem.* 51. 376.

KAKADE, M. L.–SIMONS, N.–LIENER, I. E.

1969 An Evaluation of Natural vs. Synthetic Substrates for Measuring the Antitryptic Activity of Soybean Samples. *Cereal Chem.* 46. 518.

KAKUK T.–SCHMIDT J.

1988 *Takarmányozástan*. Budapest, Mezőgazdasági Könyvkiadó.

KÁLLAY L.–KRALOVÁNSZKY U. P.

1978 *A takarmányozás biológiája*. Budapest, Mezőgazdasági Kiadó.

KAREL, M.

1975 Water Activity and Food Preservation. In: *Principles of Food Science*. Part II. Eds.: Karel, M.–Fennema, O. R.–Lund, D. B. New York, Marcel Dekker, Inc.

- KAUFMAN, R. G.–CARPENTER, Z. L. et alii
1964 Interrelationship of Gross Chemical Components of Pork Muscle. *J. Agric. Food Chem.* 12. 102–105.
- KERESE, I.
1976 Differences and Correlations Between the Biological Value and in Vitro Examination Results of Proteins. *Acta Agr. Acad. Sci. Hung.* 25. 473–484.
- KERESE I. (szerk.)
1975 *Fehérjevizsgáló módszerek*. Budapest, Műszaki Könyvkiadó.
- KILARA, A.–SHAHANI, K. A.
1979 The Use of Immobilized Enzymes in the Food Industry: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 12. 161.
- KIM, S. H.–KANG, C. H.–CHO, J. M.
1991 Sweet Proteins: Biochemical Studies and Genetic Engineering. *ACS Symposium Series* 450. 1–28.
- KINSELLA, J. E.
1976 Functional Properties of Proteins in Foods: A Survey. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 7. 219.
- KISSNÉ KELEMEN G.–SCHMIDT J.
1999 A folyékony DL-metionin-hidroxi-analog biológiai hatékonysága sertésben. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 48. 6. 761–763.
- KOFRÁNYI, E.
1970 Die Überprüfung traditioneller Hypothesen über die Eiweisswertigkeit. *Ernährungs Umschau* 10. 402–404.
- KOFRÁNYI, E.–MÜLLER-WECKER, H.
1961 Zur Bestimmung der biologischen Wertigkeit von Nahrungsproteinen V. Hoppe-Seylers. *Z. f. phys. Chem.* 325. 60.
- KORPÁCZY I.–LINDNER K.–VARGA K.
1961 Élelmiszereink összetételének legújabb adatai. VII. Javított módszer élelmiszer-fehérjék biológiai értékének kiszámítására. *Élelmiszervizsg. Közl.* 7. 11–16.
- KORYCKA-DAHL, M. B.–RICHARDSON, T.
1978 Active Oxygen Species and Oxidation of Food Constituents. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 10. 209.
- KOSHLAND, D. E.–NEET, K. E.
1968 The Catalytic and Regulatory Properties of Proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 37. 359.

KRALOVÁNSZKY U. P.

1977 Az állati eredetű fehérjetakarmányok korszerű értékelése a baromfiak és sertések takarmányozásában. *Állattenyésztés* 26. 1–8.

KUBOVICS E.–FÉBEL H.–BABINSZKY L.

1989 Ileális kanülözési technika egyszerű T-fisztulával a sertések emésztés-fiziológiai vizsgálatához. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 1. 69–73.

KUIKEN, K. A.

1952 Availability of Essential Amino Acids in Cottonseed Meal. *J. Nutr.* 46. 13–25.

LABUZA, T. P.–RIBOH, D.

1982 Theory and Application of Arrhenius Kinetics to the Prediction of Nutrient Losses in Foods. *Food Technol.* 36. 10. 66.

LÁSZTITY R.

1966 *Élelmiszer-kémiai metodikai gyakorlatok*. BME jegyzet, Budapest, Tankönyvkiadó.

LÁSZTITY R.–TÖRLEY D.

1987 *Alkalmazott élelmiszer-analitika*. Budapest, Mezőgazdasági Kiadó.

LEDL, F.

1990 Chemical Pathways of the Maillard Reaction. In: *The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology*. Eds.: Finot, P. A. et al. Basel, Birkhäuser Verlag.

LEDL, F.–FRITUL, G.–HIEBL, H.–PACHMAYR, O.–SEVERIN, T.

1986 Degradation of Maillard Products. In: *Aminocarbonyl Reactions in Food and Biological Systems*. Eds.: Fujimaki, M.–Namiki, M.–Kato, H. Amsterdam, Elsevier.

LEDL, F.–SCHLEICHER, E.

1990 Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper – neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin. *Angewandte Chemie* 102. 597.

LEEUWEN, Van P.–BABINSZKY, L. et alii

2000 A Procedure for Ileostomisation of Adult Roosters to Determine Apparent Ileal Digestibility of Protein and Amino Acids of Diets: Comparison of Six Diets in Roosters and Growing Pigs. *Livestock Production Science* 67. 101–111.

- LIENER, I. E.
1955 The Photometric Determination of the Haemagglutinating Activity of Soyin and Crude Soybean Extracts. *Arch. Biochim. Biophys.* 54. 223.
- LIENER, I. E.–ROSE, J. F.
1953 Growth Depressing Effects of Soyabeans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83. 539.
- LINDNER K.
1966 *Táplálékfehérjéink és egyéb aminosavforrásaink*. Doktori ért. Budapest.
- LOHREY, E.–HUGHES, I. R.–GRAY, I. K.
1978 Effect of Dietary Lipid Oxidation on Measurement of Protein Efficiency Ratios. *A. O. A. C.* 61. 104.
- LOTTSPEICH, F.–HENSCHEN, A.–HUPE, K. P. (Eds.)
1981 *High Performance Liquid Chromatography in Protein and Peptide Chemistry*. Berlin, Water de Gruyter.
- LUND, D. B.
1979 Effect of Commercial Processing on Nutrients. *Food Technol.* 33. 2. 28.
- LYMAN, C. M.–CHANG, W. Y.–COUCH, J. R.
1953 Evaluation of Protein Quality in Cottonseed Meals by Chick Growth and by a Chemical Index Method. *J. Nutr.* 49. 679–690.
- MACHOLZ, R.–LEWERENZ, H.
1989 *Lebensmitteltoxikologie*. Berlin, Springer-Verlag.
- MASTERS, P. M.–FRIEDMAN, M.
1979 Racemization of Amino Acids in Alkali-Treated Food Proteins. *J. Agric. Food Chem.* 27. 507.
- MATHEIS, G.
1989 Polyphenoloxidase and Enzymatic Browning of Potatoes (Solanum). *Chem. Microbiol. Technol. Lebensm.* 12. 86.
- MÁTRAI T.
1977 Növényi fehérjehordozók antinutritív kísérőanyagai. *Állattenyésztés* 26. 9–16.
- MAURON, J.
1970 Nutritional Evaluation of Proteins by Enzymatic Methods. In: *Improving Plant Protein by Nuclear Techniques*. Vienna, Int. Atomic Energy Agency. 303–318.

- 1973 Biochemical Assessments of Protein Quality. In: *Proteins in Human Nutrition*. Eds.: Porter, J. W. G.–Rolls, B. A. New York, London Acad. Press. 5.
- 1973 The Analysis of Food Proteins, Amino Acid Composition and Nutritive Value. In: *Proteins in Human Nutrition*. Eds.: Porter, J. W. G.–Rolls, B. A. London, Acad. Press. 139–154.
- MCCOLLUM, E. V.
- 1914 The Value of the Proteins of the Cereal Grains and of Milk for Growth in the Pig, and the Influence of the Plane of Protein Intake on Growth. *J. Biol. Chem.* 19. 323–333.
- MCLAUGHLAN, J. M.
- 1963 Relationship between Protein Quality and Plasma Amino Acid Levels. *Fed. Proc.* 22. 1122–1125.
- 1976 The Relative Nitrogen Utilization Method for Evaluating Protein Quality. *J.A.O.A.C.* 59. 42–45.
- MEISER, A.
- 1965 *Biochemistry of the Amino Acid*. 2nd edn. Vol I. New York–London, Academic Press.
- MELNICK, D.–COWGILL, G. R.–BURACK, E.
- 1936 The Influence of Diet upon the Regeneration of Serum Protein. *J. Exp. Med.* 64. 897–920.
- MENDEN, E.–CREMER, H. D.
- 1966 A Laboratory Method for the Evaluation of Changes in Protein Quality. *Nutr. Diet.* 8. 188–198.
- MILLER, D. S.
- 1963 *A Procedure for Determination of NPU Using Rats Body-N Technique Evaluation of Protein Quality*. NAS-NRC. Publ. 1100, Washington. 1–34.
- MILLER, D. S.–BENDER, A. E.
- 1955 The Determination of the Net Utilization of Proteins by a Shortened Method. *Brit. J. Nutr.* 9. 382–388.
- MILLER, D. S.–PAYNE, P. R.
- 1961 Problems in the Prediction of Protein Values of Diets. The Influence of Protein Concentration. *Brit. J. Nutr.* 15. 11–19.
- 1963 A Theory of Protein Metabolism. *J. Theoret. Biol.* 5. 398–411.
- MILLER, E. L.
- 1967 Determination of the Tryptophan Content of Feedingstuffs with Particular Reference to Cereals. *J. Sci. Fd. Agric.* 18. 381–386.

MILLER, E. L.–CARPENTER, K. J.–MORGAN, C. B.

1965 Availability of Sulphur Amino Acids in Protein Foods. *Brit. J. Nutr.* 19. 249–267.

MITCHELL, H. H.

1924 A Method of Determining the Biological Value of Protein. *J. Biol. Chem.* 58. 873–903.

1952 The Nutritive Evaluation of Protein: A Half Century of Progress. *Nutr. Rev.* 10. 33–37.

1954 *Symposium on Methods for Evaluation of Nutritional Adequacy and Status*. Eds.:

Spector, H.–Peterson, M. S.–Friedmann, T. E. Nrc. Washington D. C. 1–13.

MITCHELL, H. H.–BLOCK, R. J.

1946 Some Relations between the Amino Acid Contents of Proteins and their Nutritive Values for the Rat. *J. Biol. Chem.* 163. 599–620.

MOKÁDY, S.–VIOLA, S.–ZIMMERMANN, G.

1969 A New Biological Method for Estimating Food Protein Nutritive Value. *Brit. J. Nutr.* 23. 491–495.

MORRISON, A. B.–SABRY, Z. I. et alii

1963 Evaluation of Protein in Foods, VIII. Influence of Quality and Quantity of Dietary Protein on Net Protein Utilization. *Can. J. Biochem. Physiol.* 41. 275–281.

MORUP, I. K.–OLESEN, E. S.

1976 New Method for Prediction of Protein Value from Essential Amino Acid Pattern. *Nutr. Rep. Internat.* 13. 355–365.

NJAA, L. R.

1977 A Method for Determining the Methioninesulphoxine Content of Protein Concentrates. 11th *FEBS Copenhagen Proc.* No. A. 3–8. 933.

OPSTVEDT, J.–MUNDHEIM, H.

1977 *Determination of Available Lysine and Methionine by a Chick Growth Assay*. 5th Int. Symp. on Amino Acids. Budapest.

OSBORNE, T. B.–MENDEL, L. B.

1914 Amino Acids in Nutrition and Growth. *J. Biol. Chem.* 17. 325–349.

OSBORNE, T. B.–MENDEL, L. B.–FERRY, E. L.

1919 A Method Expressing Numerically the Growth-Promoting Value of Proteins. *J. Biol. Chem.* 37. 223–229.

OSER, B. L.

1951 Method for Integrating Essential Amino Acid Content in the Nutritional Evaluation of Protein. *J. Am. Diet. Ass.* 27. 369–402.

PACK, M.–FICKLER, J.–RADEMACHER, M.–LEMME, A. et alii

2002 *Amino Acids in Animal Nutrition: A Compendium of Recent Reviews and Reports*. Bukarest, Degussa.

PÁSZTOR K.–FORGÁCS B.–GYŐRI Z.–SZILÁGYI Sz.

1997 Kukoricahibridek fehérje- és aminosav-összetételének vizsgálata. *Növénytermelés* 46. 1. 23–35.

PÁSZTOR K.–GYŐRI Z.

1991 Nagy lizintartalmú kukoricahibridek aminosav-összetételének változása. *DATE, Tudományos Közlemények* 30. 117–133.

PÁSZTOR K.–GYŐRI Z.–NAGY M.

1996 Kukoricaszem fehérjék aminosav-tartalmának változása különböző szülőtörzseknel és hibridjeiknel. *Növénytermelés* 45. 2. 97–108.

PÁSZTOR, K.–GYŐRI, Z.–PINTÉR, J.–STÉHLI, L.

1990 *Izmenenije szosztava aminokiszlot vizokolizinobih gibridov kukuruzi. Informacionij bjulleteni po kukuruzi*. Koordinacionnij centr SzEB po probleme KOC-2. MTA Mezőgazdasági Kutató Intézet, 8. 253–267.

PÁSZTOR K.–GYŐRI Z.–SZILÁGYI Sz.

1998 A fehérje-, a keményítő-, a hamu-, a rost- és a zsírtartalom változása kukorica-szülőtörzsekben és hibridjeikben.

Növénytermelés 47. 3. 1–8.

1999 *A kukorica fehérjetartalmának és aminosav összetételének javítása nemesítéssel*. Siófok, Magyar Genetikusok Egyesülete.

PELLET, P. L.

1973 Methods of Protein Evaluation with Rats. In: *Proteins in Human Nutrition*. Eds.: Porter, J. W. G.–Rolls, B. A. London–New York, Acad. Press. 225–224.

PERET, J.–JACQUOT, R.

1972 Nitrogen Excretion on Complete Fasting and on a Nitrogen-Free Diet. Endogenous Nitrogen. In: *Protein and Amino Acid Functions*. Ed.: Bigwood, E. J. Oxford, Pergamon Press. 73–118.

PERKINS, E. G.

1960 Nutritional and Chemical Changes Occurring Heated Fats: A Review. *Fd. Technol.* 14. 508–514.

PERKINS, E. G. (Ed.)

1975 Analysis of Lipids and Lipoproteins. *American Oil Chemists' Society*, Champaign. III.

PION, R.

1973 The Relationships between the Levels of Free Amino Acids in Blood and Muscle and the Nutritive Value of Proteins. In: *Proteins in Human Nutrition*. Eds.: Porter, J. W. G.–Rolls, B. A. London–New York, Acad. Press. 329–342.

PLATT, B. S.–MILLER, D. S.

1959 The Net Dietary Protein Value of Mixtures of Foods: its Definition Determination and Application. *Proc. Nutr. Soc.* 18. VII–VIII.

PONGPAEW, P.–GUGGENHEIM, K.

1968 The Nutritional Availability of Tryptophan in Foods. *Nutr. Diets.* 10. 297–308.

POTTHAST, K.–HAMM, R.–ACKER, L.

1975 Enzymic Reactions in Low Moisture Foods. In: *Water Relations of Foods*. Ed.: Duckworth, R. B. London–New York–San Francisco, Academic Press.

PROVONSAL, M. P.–CUQ, J. A.–CHEFTEL, J.

1975 Chemical and Nutritional Modifications of Sunflower Proteins Due to Alkaline Processing. Formation of Amino Acid Cross-Link and Isomerization of Lysine Residues. *J. Agr. Food Chem.* 23. 938–943.

PUIGSERVER, A. J.–SEN, L. C.–CLIFFORD, A. J. et alii

1978 A Method for Improving the Nutritional Value of Food Proteins: Covalent Attachment of Amino Acids. *Adv. Exp. Med. Biol.* 105. 587.

RACKIS, J.

1972 *Biological and Physiological Factors in Soybeans*. Proc. of World Soy Protein Conference, München, J.A.O.C.S. edition.

RATTRAY, E.–PUSZTAI, Á.

1974 Toxicity of Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris*) to Conventional and Gnotobiotic Rats. *J. Sci. Fd. Agric.* 25. 1035.

REED, G.

1975 *Enzymes in Food Processing*. 2nd edn. London–New York–San Francisco, Academic Press.

RUBNER, M.

1897 *Z. Biol.* 15. 115. Ed.: Gebhardt, G.

- 1966 Die Bewertung des Eiweissqualität von Nahrungs- und Futtermitteln mit Hilfe des N-Bilanzversuches. In: *Vergleichende Ernährungslehre des Menschen und seiner Haustiere*. Ed.: Hock, A. Jena, Gustav Fischer.
- SAUNDERS, R. M.–CONNOR, M. A.–BOOTH, A. N. et alii
1973 Measurement of Digestibility of Alfalfa Protein Concentrates by in Vivo and in Vitro Methods. *J. Nutr.* 103. 530–535.
- SCEFFNER, A. L.
1967 In Vitro Protein Evaluation. In: *Newer Methods of Nutritional Biochemistry*. III. London, Acad. Press. 125–195.
- SCEFFNER, A. L.–ADACHI, R.–SPECTOR, H.
1956 Measurement of the Net Utilization of Heat-Processed Proteins by Means of the Pepsin Digest Residue (PDR) Amino Acid Index. *J. Nutr.* 60. 507–516.
- SCHMIDT J.
1972 *Adatok a magyar nagy fehér húsertés malacok metionin anyagforgalmához*. Kand. ért. Mosonmagyaróvár.
1977 A hízósertések aminosavsükséglete. *Iparszerű Sertéster. Tájé.* III. 2. 1–5.
1995 *Gazdasági állataink takarmányozása*. Budapest, Mezőgazda Kiadó.
1996 *Takarmányozástan*. Budapest, Mezőgazda Kiadó.
- SCHMIDT J. (szerk.)
2003 *A takarmányozás alapjai*. Budapest, Mezőgazda Kiadó.
- SCHMIDT J.–CENKVÁRI É.–KASZÁS I.
1988 Védett metionin felhasználása a tehének takarmányozásában. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 37. 1. 13–19.
1989 Eltérő bendőbeli lebonthatóságú takarmányok hatása a borjak N-forgalmára. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 38. 5. 471–479.
- SCHMIDT, J.–CENKVÁRI, É.–SIPŐCZ, J.–GERGÁCZ, Z.
1993 Wirkung der Extrudierung auf den Abbau des Eiweisses im Pansen. *Acta Agronomica Óváriensis* 35. 2. 147–154.
- SCHMIDT, J.–KISS, G. B.–KASZÁS, I.
1996 Die biologische Wirksamkeit von flüssigem Methionin-Hydroxyanalog (DL-MHA-FA) in der Broilermast. *Die Mühle und Mischfuttertechnik* 49. 812–814.

- SCHMIDT J.–KISSNÉ KELEMEN G.–KASZÁS I.
1997 DL-metionin és folyékony DL-metionin-hidroxi-analóg (Alimet) biológiai hatékonyságának összehasonlítása a broilerhizlalásban. *Magyar Állatorvosok Lapja* 119. 4. 229–233.
- SCHMIDT, J.–NGUYEN T. D.
1990 Der Einfluss von DL-Methionin, N-Hydroxymethyl-DL-Methionin-Calciumsolt (Mepron^R) und DL-Methionin-Hydroxyanalogs-Calciumsolt (MHA^R) auf den N-Ansatz von Kälbern. *Archiv für Tierernährung* 39. 1–2. 441–449.
- SCHMIDT, J.–SIPŐCZ, P.–CENKVÁRI, É.–SIPŐCZ, J.
1999 Use of Protected Methionine (Mepron M85) in Cattle. *Acta Veterinaria Hungarica* 47. 4. 409–418.
- SCHMIDT J.–SIPŐCZ P.–SIPŐCZ J.
1999 Védett fehérje és védett zsír felhasználása a nagy tejtermelésű tehenek takarmányozásában. *Acta Agronomica Óváriensis* 41. 2. 165–176.
2000 A takarmány bendőbeli lebonthatóságának jelentősége a nagy tejtermelésű tehenek takarmányozásában. *Takarmányozás* 3. 3. 24–27.
2000 Védett fehérje a nagy tejtermelésű tehenek takarmányozásában. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 49. 1. 37–50.
- SCHMIDT J.–SZŰCSNÉ PÉTER J.
1998 Új fehérjeértékelési rendszer a juhok takarmányozásában. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 47. 7. 303–310.
- SCHMIDT, J.–TÓTH, J.–SIPŐCZ, J.
1988 Geschützte Aminosäuren für Milchkühe. *Der Tierzüchter* 40. 7. 300–302.
- SCHMIDT, J.–VÁRHEGYI, I.–VÁRHEGYI, J. et alii
1999 New Hungarian Protein Evaluation System for Ruminants. *Hungarian Agricultural Research* 8. 1. 8–11.
- SCHMIDT, J.–VÁRHEGYI, I.–VÁRHEGYI, J.–CENKVÁRI, É.
2000 Hungarian Metabolizable Protein Evaluation System. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds* 3. 2. 83–89.
- SCHMIDT J.–VÁRHEGYI Jné–VÁRHEGYI J. et alii
1999 A kérődzők metabolizálható fehérje-szükséglete. *Takarmányozás* 2. 3. 5–7.
2000 *A kérődzők takarmányainak energia- és fehérjeértékelése.* Budapest, Mezőgazda Kiadó.

- SCHMIDT J.–VÁRHEGYI Jné–VÁRHEGYI J.–CENKVÁRI É.
1998 Javaslat a kérődzők takarmányozásában bevezetendő új, hazai fehérjeértékelési rendszerre. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 47. 2. 165–178.
1998 Új hazai fehérjeértékelési rendszer a kérődzők takarmányozásában. *Takarmányozás* 1. 1. 7–10.
- SCHULZ, G. E.–SCHIRMER, R. H.
1979 *Principle of Protein Structure*. Berlin–Heidelberg, Springer-Verlag.
- SHEPHERD, N. D.–TAYLOR, T. G.–WILTON, D. C.
1977 An Improved Method for the Microbiological Assay of Available Amino Acids in Proteins Using *Tetrahymena Pyriformis*. *Brit. J. Nutr.* 38. 245–253.
- SHEPPARD, R. C. (Ed.)
1970 *Amino-Acids, Peptides, and Proteins*. Vol 1. The Chemical Society, London, Berlington House.
- SHORROCK, C.
1976 An Improved Procedure for the Assay of Available Lysine and Methionine in Feedstuffs Using *Tetrahymena Pyriformis*. *W. Brit. J. Nutr.* 35. 333–341.
- SIKORSKI, Z. (ed.)
1997 *Chemical and Functional Properties of Food Components*. Technomic Publ. Lancaster.
- SIMIC, M. G.–KAREL, M. (Ed.)
1980 *Autooxidation in Food and Biological systems*. New York, Plenum Press.
- SLADE, W.–LEVINE, H.
1991 Beyond Water Activity–Recent Advances Based on an Alternative Approach to the Assessment of Food Quality and Safety. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 30. 115.
- SMITH, R. V.
1972 Acetylation of Methionine Sulfoxide or Methionine Sulfone by Rat. *Biochim. Biophys. Acta* 261. 304–309.
- SODA, K.–TANAKA, H.–ESAKI, N.
1983 Amino Acids. In: *Biotechnology*. Vol 3. Eds.: Rehm, H. J.–Reed, G. Weinheim, Verlag Chemie. 1–479.
- SPACKMANN, D. H.–STEIN, W. H.–MOORE, S.
1958 Automatic Recording Apparatus for Use in Chromatography of Amino Acids. *Anal. Chem.* 30. 1190–1206.

- STAHMANN, M. A.–WOLDEGIORGIS, G.
1975 Enzymatic Methods for Protein Quality Determination. In: *Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds*. Ed.: Mendel, F. New York, Marcel Dekker. 211–234.
- STEFFENS, W.
1977 *Possibilities for Reducing Protein in Diets of Rainbow Trout (Salmo gairdneri) by Using Adequate Fats*. Internat. Seminar on Fish nutrition and diet development. Szarvas.
- STÉHLI, L.–PINTÉR, J.–GYÓRI, Z.–PÁSZTOR, K. et alii
1988 Aktualnie voproszi biokimii kukuruzi. Informacionij bjulleteni po kukuruzi. Koordinacionnij centr SzEB po probleme KOC-2. MTA Mezőgazdasági Kutató Intézet, 7. 265–278.
- STERNBERG, M.–KIM, C. Y.
1977 Lysinoalanine Formation in Protein Food Ingredients. *Adv. Exp. Med. Biol.* 86B. 73.
- STEWART, K. K.–WHITAKER, J. R. (Ed.)
1984 *Modern Methods of Food Analysis*. Wesport, AVI Publishing Inc., Westport.
- STOTT, I. A.–SMITH, H.
1963 Microbiological Evaluation of Protein Quality with *Tetrahymena Pyriformis* W. 3. A simplified Assay Procedure. *Brit. J. Nutr.* 17. 227–233.
- STUCKI, W. P.–HARPER, A. E.
1962 Effect of Altering the Ratio of Indispensable to Dispensable Amino Acids in Diets for Rats. *J. Nutr.* 78. 278–286.
- SUMMERS, J. D.–FISHER, H.
1961 Net Protein Values for the Growing Chicken as Determined by Carcass Analysis: Exploration of the Method. *J. Nutr.* 75. 435–442.
- SVENSSON, S.
1977 Inactivation of Enzymes During Thermal Processing. In: *Physical, Chemical and Biological Changes in Food Caused by Thermal Processing*. Eds.: Hoyem, T.–Kvalle, O. London, Applied Science Publ.
- SWENDSEID, M. E.–VILLABOS, J.–FRIEDRICH, B.
1963 Evaluation of protein quality. 1100. Washington, NAS-NRC. Publ. *J. Nutr.* 80. 99. Ref.
- SZABO, Cs.–JANSMAN, A. J. M.–BABINSZKY, L. et alii
2000 Ileal Digestibility of Amino Acids in Pig Feeds and its Use in Diet Formulations. *Agriculture* 6. 61–63.

SZABOLCSI G.

1990 *Enzimes analízis*. Budapest, Akadémiai Kiadó.

SZELÉNYI M.–BABINSZKY L.–SMIED I.–FÉBEL H. et alii

1991 Takarmányok táplálóanyagainak ileális és fekális emészthetősége növendék sertésekben. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 5. 441–450.

SZEPESY L.

1970 *Gázkromatográfia*. Budapest, Műszaki Könyvkiadó.

SZILÁGYI, Sz.–TRIBOI, E.–GYŐRI, Z.–TRIBOI, A. M. et alii

2002 *Environmental and Genetical Effects on Protein Composition Measured by SE-HPLC and Mixograph Characteristics of the Winter Wheat Grown in France and Hungary*. ICC Conference Proceedings. Budapest.

TAGLE, M. A.–DONOSO, G.

1967 *Arch. lat. Am. Nutr.* 17. 295–310. Ref.: Pellett, P. L. (1973) In: *Proteins in Human Nutrition*. Eds.: Porter, J. W. G.–Rollas, B. A. London–New York, Acad. Press.

TEERI, A. E.–VIRCHOW, W.–LOUGHLIN, M. E.

1956 A Microbiological Method for the Nutritional Evaluation of Proteins. *J. Nutr.* 59. 587–593.

THOMAS, K.

1909 Über die biologische Wertigkeit der Stickstoffsubstanzen in verschiedenen Nahrungsmitteln. *Arch. Anat. Physiol. Abt.* 25. 219–302.

TOSSENBERGER J.–FÉBEL H.–BABINSZKY L. et alii

2000 Az aminosavak ileális emészthetősége sertésekben. I. Az ileális emészthetőség meghatározása különböző módszerekkel. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 4. 375–384.

TRAUB, W.–PIEZ, K. A.

1971 The Chemistry and Structure of Collagen. *Adv. Protein Chem.* 25. 267. 1971.

TRESSL, R.–HELAKE, B.–MARTIN, N.–KERSTEN, E.

1989 Formation of Amino Acid Specific Maillard Products and their Contribution to Thermally Generated Aromas. *ACS Symp.* Ser. 409. 156.

TSCHESCHE, H. (Ed.)

1985 *Modern Methods in Protein Chemistry*. Vol 2. Berlin, Walter de Gruyter.

VÁRADI, A.–PONGOR, S.–KAUL, A. K.

1976 Quantitative Determination of Methionine in Proteins: Gas Chromatography of Methylthiocyanate Liberated by Cleavage with Cyanogen Bromide. *Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung.* 11. 87–93.

VARGA J.–SCHMIDT J.–BAINTNER F.

1975 A propionsavas kezelés hatása szenázsok fehérjetartalmának kihasználási együtthatójára. *Állattenyésztés* 24. 5. 463–470.

VARGA-VISI, É.–TERLAKY-BALLA, É.–POHN, G. et alii

2000 RP-HPLC Determination of L- and D-Cystine and Cysteine as Cysteic Acid. *Chromatographia* 51. 325–327.

VÁRHEGYI Jné–SCHMIDT J.–CENKVÁRI É.–VÁRHEGYI J.

1998 A hazai új kérődző fehérjeértékelés összehasonlíthatósága a külföldi rendszerekkel. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 47. 3. 239–246.

VÁRHEGYI Jné–VÁRHEGYI J.–SCHMIDT J.–HAJDA Z.

1999 A hazai új és néhány külföldi fehérjeértékelési rendszer tesztelése növendékbikákkal folytatott hizlalási kísérletek alapján. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 48. 4. 419–425.

VARNISH, S. A.–CARPENTER, K. J.

1971 A Comparison of Ileal and Faecal Analysis to Determine the Availability of Dietary Amino Acids. *Proc. Nutr. Soc.* 30. 70A–71A.

VINCZE, L.

1999 *A baromfitakarmányok energia- és fehérjeértékelése.* Keszthely, Keszthelyi Akadémiai Alapítvány.

VOIT, C.

1872 Über die Bedeutung des Leimes bei der Ernährung. *Z. Biol.* 8. 297–387.

VÖRÖS O.–CSAPÓ J.–BARANYI M.–CSAPÓ-KISS Zs.–STEFLE J.

1999 A tejfehérje vizsgálata poliakrilamid gélelektroforézissel és izoelektromos fókuszálással kancatejből. *Acta Agraria Kaposváriensis* 3. 1. 1–10.

WAIBEL, P. E.–CARPENTER, K. J.

1972 Mechanisms of Heat Damage in Proteins. 3. *Brit. J. Nutr.* 27. 509–515.

WALLER, G. R.–FEATHER, M. S. (Eds.)

1983 *The Maillard Reaction in Foods and Nutrition.* ACS Symposium Series 215, Washington D. C., American Chemical Society.

WALTON, A. G.

1981 *Polypeptides and Protein Structure*. New York–Oxford, Elsevier North Holland, Inc.

WHITAKER, J. R.–FUJIMAKI, M. (Eds.)

1980 *Chemical Deterioration of Proteins*. ACS Symposium Series 123. Washington D. C., American Chemical Society.

WILLIAMS, J. N.–ELVEHJEM, C. A.

1949 The Relation of Amino Acid Availability in Dietary Protein to Liver Enzyme Activity. *J. Biol. Chem.* 181. 559–564.

WILLIAMS, P. C.

1975 Application of Near Infrared Reflectance Spectroscopy to Analysis of Cereal Grains and Oilseeds. *Cereal Chem.* 52. 561.

YAMASHITA, M.–ARAI, S.–AMANO, Y.–FUJIMAKI, M.

1979 A Novel One-Step Process for Enzymatic Incorporation of Amino Acids Into Proteins: Application to Soy Protein and Flour for Enhancing their Methionine Levels. *Agric. Biol. Chem.* 43. 1065.

YAMASHITA, M.–ARAI, S.–FUJIMAKI, M.

1976 A Low-Phenylalanine, High-Tyrosine Plastein as an Acceptable Dietetic Food. *J. Food Sci.* 41. 1029.

A JEGYZET SZERZŐI

Albert Csilla gyógyszerész, 2001-ben végzett a Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetemen. Kétéves gyógyszerészi munka után 2003 végén kezdett el dolgozni a Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem Csíkszeredai Campusán gyakornokként. Jelenleg a biokémia, a toxikológia és a műszeres analitika tárgyakból gyakorlatokat tart környezet- és élelmiszermérnök hallgatóknak. Kutatómunkáját a fehérje- és aminosav-analitika területén fejti ki, az utóbbi időben pedig a D- és L-aminosavak szétválasztásával és meghatározásával foglalkozik.

Dr. Csapó János az MTA doktora, egyetemi tanár, okleveles vegyész, több mint 30 éve foglalkozik élelmiszerek és takarmányok fehérjetartalmának, aminosav-összetételének, újabban D-aminosav-összetételének meghatározásával, a fehérje biológiai értékének mérésével. A vezetésével kidolgozott új analitikai-kémiai módszereket több élelmiszer- és takarmányanalitikai laboratóriumban alkalmazzák. Tudományos munkáját is nagyrészt ezen a területen fejtette ki. A graduális és posztgraduális képzésben, valamint a doktori képzésben oktatja a Biokémia, az Élelmiszerkémia, a Mezőgazdasági kémia, a Tej és tejtermékek a táplálkozásban tárgyakat, a PhD. hallgatóknak pedig az Állattermék-előállítás biokémiája című tárgyat. Többször meghirdette fakultatív tárgyként az Élelmiszerek és takarmányfehérjék minősítése tárgyat, melyet egy féléven keresztül heti három órában oktatott.

Dr. Csapó Jánosné dr. Kiss Zsuzsanna okleveles vegyész, tudományos munkatárs, több mint három évtizede foglalkozik élelmiszerek és takarmányok összetételének meghatározásával, elsősorban makro- és mikroelemeinek elemzésével. Doktori disszertációjában eltérő genotípusú szarvasmarhák kolosztrum- és tejösszetételét vizsgálta, és tudományos munkáját is – az analitikai kémia mellett – nagyrészt ezen a területen fejtette ki. Részt vesz a graduális és posztgraduális képzésben a Kémia, a Biokémia és az Élelmiszer-kémia című tárgyak oktatásában.

**A SAPIENTIA –
ERDÉLYI MAGYAR TUDOMÁNYEGYETEM JEGYZETEI**

Megjelent:

BEGE ANTAL

Számelméleti feladatgyűjtemény. Marosvásárhely, Műszaki és Humán Tudományok Kar, Matematika–Informatika Tanszék. 2002.

BEGE ANTAL

Számelmélet. Bevezetés a számelméletbe. Marosvásárhely, Műszaki és Humán Tudományok Kar, Matematika–Informatika Tanszék. 2002.

VOFKORI LÁSZLÓ

Gazdasági földrajz. Csíkszereda, Csíkszeredai Kar, Gazdaságtan Tanszék. 2002.

TÓKÉS BÉLA–DÓNÁTH-NAGY GABRIELLA

Kémiai előadások és laboratóriumi gyakorlatok. Marosvásárhely, Műszaki és Humán Tudományok Kar, Gépészmérnöki Tanszék. 2002.

IRIMIAȘ, GEORGE

Noțiuni de fonetică și fonologie. Csíkszereda, Csíkszeredai Kar, Humán Tudományok Tanszék. 2002.

SZILÁGYI JÓZSEF

Mezőgazdasági termékek áruismerete. Csíkszereda, Csíkszeredai Kar, Gazdaságtan Tanszék. 2002.

NAGY IMOLA KATALIN

A Practical Course in English. Marosvásárhely, Műszaki és Humán Tudományok Kar, Humán Tudományok Tanszék. 2002.

BALÁZS LAJOS

Folclor. Noțiuni generale de folclor și poetică populară. Csíkszereda, Csíkszeredai Kar, Humán Tudományok Tanszék. 2003

POPA-MÜLLER IZOLDA

Műszaki rajz. Marosvásárhely, Műszaki és Humán Tudományok Kar, Gépészmérnöki Tanszék. 2004.

- FODORPATAKI LÁSZLÓ–SZIGYÁRTÓ LÍDIA–BARTHA CSABA
Növénytani ismeretek. Kolozsvár, Természettudományi és Művészeti Kar, Környezettudományi Tanszék. 2004.
- MARCUȘ ANDREI–SZÁNTÓ CSABA–TÓTH LÁSZLÓ
Logika és halmazelmélet. Marosvásárhely, Műszaki és Humán Tudományok Kar, Matematika–Informatika Tanszék. 2004.
- KAKUCS ANDRÁS
Műszaki hőtan. Marosvásárhely, Műszaki és Humán Tudományok Kar, Gépészmérnöki Tanszék. 2004.
- BIRÓ BÉLA
Drámaelmélet. Csíkszereda, Gazdasági és Humántudományi Kar, Humántudományi Tanszék. 2004.
- BIRÓ BÉLA
Narratológia. Csíkszereda, Gazdasági és Humántudományi Kar, Humántudományi Tanszék. 2004.
- MÁRKOS ZOLTÁN
Anyagtechnológia. Marosvásárhely. Műszaki és Humán Tudományok Kar, Gépészmérnöki Tanszék. 2004.
- GRECU VICTOR
Istoria limbii române. Csíkszereda, Gazdasági és Humántudományi Kar, Humántudományi Tanszék. 2004.
- VARGA IBOLYA
Adatbázis-kezelő rendszerek elméleti alapjai. Marosvásárhely, Műszaki és Humántudományok Kar, Matematika–Informatika Tanszék. 2004.
- CSAPÓ JÁNOS
Biokémia. Csíkszereda, Műszaki és Társadalomtudományi Kar, Műszaki és Természettudományi Tanszék. 2004.
- CSAPÓ JÁNOS
Élelmiszerkémia. Csíkszereda, Műszaki és Társadalomtudományi Kar, Műszaki és Természettudományi Tanszék. 2004.
- KÁTAI ZOLTÁN
Programozás C nyelven. Marosvásárhely, Műszaki és Humántudományok Kar, Matematika–Informatika Tanszék. 2004.

WESZELY TIBOR

Analitikus geometria és differenciálgeometria.
Marosvásárhely, Műszaki és Humántudományok Kar,
Matematika–Informatika Tanszék. 2005.

GYÖRFI JENŐ

A matematikai analízis elemei. Marosvásárhely, Gazdaság- és
Humántudományok Kar, Matematika–Informatika Tanszék. 2005.

FINTA BÉLA–KISS ELEMÉR–BARTHA ZSOLT

Algebrai struktúrák feladatgyűjtemény. Marosvásárhely,
Műszaki és Humántudományok Kar. Matematika–Informatika
Tanszék. 2006.

ANTAL MARGIT

Fejlett programozási technikák. Marosvásárhely, Műszaki és
Humántudományok Kar. Matematika–Informatika Tanszék.
2006.

OLÁH-GÁL RÓBERT

Az informatika alapjai közgazdász- és mérnökhallgatóknak.
Marosvásárhely, Gazdasági és Humántudományi Kar.
Matematika–Informatika Tanszék. 2007.

A PARTIUMI KERESZTÉNY EGYETEM JEGYZETEI

Megjelent:

KOVÁCS ADALBERT

Alkalmazott matematika a közgazdaságban. Lineáris
algebra. Nagyvárad, Alkalmazott Tudományok Kar,
Közgazdaságtan Tanszék. 2002.

HORVÁTH GIZELLA

A vitatechnika alapjai. Nagyvárad, Bölcsészettudományi Kar,
Filozófia Tanszék. 2002.

ANGI ISTVÁN

Zeneesztétikai előadások. I. Nagyvárad, Alkalmazott
Tudományok Kar, Zenepedagógiai Tanszék. 2003.

PÉTER GYÖRGY–KINTER TÜNDE–PAJZOS CSABA

Makroökonómia. Feladatok. Nagyvárad, Alkalmazott
Tudományok és Művészetek Kar, Közgazdaságtan Tanszék.
2003.

ANGI ISTVÁN

Zeneesztétikai előadások. II. Nagyvárad, Alkalmazott
Tudományok Kar, Zenepedagógiai Tanszék. 2005.

TONK MÁRON

Bevezetés a középkori filozófia történetébe. Nagyvárad,
Bölcsészettudományi Kar, Filozófiai Tanszék. 2005.

Scientia Kiadó

400112 Kolozsvár (Cluj-Napoca)
Mátyás király (Matei Corvin) u. 4. sz.
Tel./fax: +40-264-593694
E-mail: kpi@kpi.sapientia.ro

Korrektúra:

Sztranyicky Mihály

Műszaki szerkesztés:

Mikó Csilla, Lineart kft.

Tipográfia:

Könczey Elemér

Készült a T3 Kiadó nyomdájában

200 példányban, 30 nyomdai ív terjedelemben
520085 Sepsiszentgyörgy (Sf. Gheorghe)
Sport u. 8/A., tel.: +40-267-351684
Felelős vezető: Bács Attila