

Dôkaz aditívnych pšeničných a sójových proteínov v tepelne opracovaných mäsových výrobkoch metódou ELISA

ANDREJ MARCIN - RUDOLF FENCÍK - RASTISLAV MATI

SÚHRN. V článku je opísaný postup určený na dôkaz pšeničného a sójového proteínu v tepelne opracovaných mäsových výrobkoch vypracovaný na báze nepriamej sendvičovej imunochemickej techniky ELISA. Ako primárna protilátka bolo použité králičie antisérum pripravené proti týmto rastlinným proteínom, ako sekundárna protilátka prasačie antikráličie imunoglobulíny značené peroxidázou. Ako substrát pre peroxidázu bol použitý *o*-fenyldiamín. Testovaná bola citlivosť, opakovateľnosť, selektivita, schopnosť kvalitatívne klasifikovať slepé vzorky a detekčný limit. Dosiahnutá citlivosť pri detekcii pšeničných proteínov bola 220 mg.kg⁻¹ (t. j. 0,2 % pšeničnej múky pri pšeničnej múke obsahujúcej 11 % proteínov) a pri detekcii sójových proteínov 800 mg.kg⁻¹ (t. j. 0,2 % sójovej múky pri koncentrácii 40 % proteínov v bôboch).

KLÚČOVÉ SLOVÁ: mäsové výrobky; pšenica; sója; párky; imunochemická detekcia

Existuje viacero dôvodov, prečo sa neživočíšne proteíny pridávajú do mäsových výrobkov. Zlepšujú schopnosť mäsových výrobkov viazať vodu, ktorá sa obvykle stráca pri tepelnej úprave. Okrem toho tieto proteíny umožňujú lepšiu emulgáciu tukových častíc po pomletí svaloviny, čo vedie k lepšej konzistencii finálnych produktov [1]. Obohatenie mäsových výrobkov proteínmi neživočíšneho pôvodu je dnes akceptované a legalizované takmer vo všetkých štátoch Európy, na použitie týchto proteínov vo výrobkoch je však predpísaná prísna povinnosť označovania [2].

A tak detekcia pridávania neživočíšnych proteínov do mäsových výrobkov je dôležitá v dvoch základných prípadoch, a to, ak ich pridávanie:

- a) nie je deklarované,
- b) je zahrnuté v receptúre, ale koncentrácia je prekročená.

MVDr. Andrej MARCIN, CSc., Ing. Rastislav MATI, CSc., Oblastný výskumný ústav agroekológie, Špitálska 1273, 071 01 Michalovce.
Ing. Rudolf FENCÍK, CSc., Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 2696, Piešťany.

Pre prvý prípad je dostatočná kvalitatívna metóda. Kvantitatívna metóda bude dôležitá pri dôkaze náhodného primiešania [3].

V Európe je v najväčšej miere využívaný pšeničný proteín, pridávaný vo forme pšeničného gluténu alebo v neupravenej forme ako pšeničná múka a tiež sójový proteín vo forme izolátu alebo koncentráту [4,5]. Je však veľmi ťažké kvantifikovať aditívne rastlinné proteíny zvlášť vtedy, ak potravina bola uvarená alebo ináč tepelne upravená. Neimunochemické metódy na dôkaz rastlinných proteínov [6-8] nie sú dostatočne citlivé a špecifické. Imunochemické metódy ako imunodifúzia a imunoelektroforéza [9] boli použité predovšetkým na dôkaz spomenutých proteínov v surových mäsových výrobkoch. Ich nevýhodou je neschopnosť detegovať denaturované a teda nerozpustné proteíny. Hitchcock a kol. [10] použil veľmi citlivú ELISA metódu na stanovenie sójového proteínu v mäsových výrobkoch. Janssen a kol. [11] použil na podobný účel jednoduchšiu imunochemickú sendvičovú metódu dot-blot.

Po predchádzajúcich skúsenostiach s technikou dot-blot [12-14] použitou na dôkaz pšeničného a sójového proteínu sme si dali za cieľ vypracovanie nepriamej ELISA metódy (enzýmovej imunoabsorbentovej analýzy) umožňujúcej kvantitatívne stanovenie oboch spomínaných proteínov v tepelne upravených mäsových výrobkoch a určenie jej základných analytických parametrov.

Materiál a metódy

Na získanie pšeničného a sójového proteínu určeného pre prípravu imunogénu bola použitá pšeničná, resp. sójová múka. Z múky boli odstránené lipidy extrakciou s trojnásobným množstvom acetónu pri teplote 0 °C po dobu 60 min a po následnej centrifugácii pri 2000 g po dobu 15 min, použité na dvojstupňovú izoláciu pšeničného, resp. sójového proteínu. Na izoláciu bol použitý Tris-NaCl tlmivý roztok (0,02 mol.l⁻¹ a 0,5 mol.l⁻¹ NaCl), ktorý bol pridávaný v pomere 200 g odtučnenej múky a 600 ml tlmivého roztoku. Po centrifugácii (2000 g, 15 min) bol sediment použitý na opakovanú izoláciu proteínov. Supernatanty z oboch extrakcií obsahujúce pšeničný resp. sójový proteín boli dialyzované oproti destilovanej vode (veľkosť pórov membrány 10 kDa). Dialyzát bol následne lyofilizovaný a po termickom ošetrení (ohriatie na teplotu 100 °C 5 min) použitý na prípravu imunogénu. Proteíny boli emulgované v množstve 0,5 g s 2 ml fyziologického roztoku a 2 ml Freundovho kompletného adjuvans premiešavaním v dvoch 10 ml striekačkách vzájomne prepojených trubičkou [13]. Imunogény boli použité

na imunizáciu 4 králikov plemena novozélandský biely podľa bežnej imunizačnej schémy (dva pre pšeničný proteín a dva pre sójový proteín) [15].

Imunogén bol aplikovaný pri prvej imunizácii intradermálne a pri ďalších subkutánne. Pri jednej imunizácii bolo celkovo podané 2 ml imunogénu pre jedného králika na 4–6 miest do dorzálnej časti chrbta. Reimunizácia bola vykonávaná 14., 21., 28. a 42. deň po prvej imunizácii. Krv od králikov bola odoberaná z vena auricularis alebo arteria auricularis za účelom imuno-elektroforetického posúdenia špecificity protilátok v sére [13]. Sérum bolo izolované z králičej krvi bežným spôsobom. Z neho boli izolované imunoglobulíny s použitím etanolovej frakcionácie [16]. Dosiahnutý titer protilátok v antisére proti pšeničným proteínom bol 1:3000 a proti sójovým proteínom 1:2600. Študovali sme tiež nešpecifické reakcie pripravených imunoglobulínov s proteínmi izolovanými z bravčového, hovädzieho mäsa a tiež izolovanými z ražného, kukuričného a ovseného zrna.

Ako štandardné vzorky sme použili proteíny izolované z modelových mäsových výrobkov s definovaným prídavkom pšeničnej, resp. sójovej múky (3,2; 1,6; 0,8 a 0,2 %), t. j. 3,52; 1,76; 0,88 a 0,22 pšeničného [g.kg⁻¹], resp. 12,8; 6,4; 3,2 a 0,8 sójového proteínu [g.kg⁻¹].

Modelové mäsové výrobky boli pripravené podľa už publikovanej metódy [12,13]. Po pomletí chudého bravčového mäsa bola pšeničná resp. sójová múka pridaná do vytvorenej pasty. Pasta bola následne tepelne opracovaná (ohrievanie vo vodnom kúpeli na teplotu 100 °C 5 min).

Ako experimentálne vzorky boli použité proteíny izolované z komerčných tepelne upravených mäsových výrobkov, ktoré boli získané z miestnej obchodnej siete:

- a) výrobky obsahujúce pšeničnú múku - špekáčik, párková klobása, jemné párky (z produkcie mäsokombinátu MECOM, Humenné),
- b) výrobky obsahujúce sójový proteín - desiatová saláma, liptovská saláma, párky obyčajné (z produkcie mäsokombinátu TIPSO s. r. o., Michalovce),
- c) výrobky neobsahujúce pšeničnú resp. sójovú múku - Kalinka, Pribina; Hornád (z produkcie mäsokombinátu MECOM, Humenné; Mäso Východ, Košice).

Izolácia proteínov z modelových i komerčných mäsových výrobkov [12-14] bola vykonaná nasledovne: 20 g modelového alebo komerčného mäsového výrobku bolo pomleté a zo vzniknutej pasty boli odstránené lipidy extrakciou s použitím 60 ml acetónu pri teplote 0 °C po dobu 15 min (pomer pasty a acetónu 1:4). Ďalší postup bol ako pri izolácii pšeničných a sójových proteínov z pšeničnej alebo sójovej múky s použitím Tris-NaCl tlmivého roztoku [12-14].

Dôkaz prítomnosti sójového resp. pšeničného proteínu metódou ELISA

Vzorky boli aplikované v trojiciach. Inkubácia delených mikrotitračných doštičiek bola vykonávaná vo všetkých krokoch vo vlhkej komôrke (vo vodnom kúpeli) pri 37 °C. Tlmivé a premývacie roztoky boli aplikované pri izbovej teplote. Šachovnicovo boli skúmané optimálne podmienky ELISA analýzy (koncentrácia reagensie, inkubačné časy a teploty):

- a) aplikácia štandardných resp. vyšetrovaných vzoriek riedených s väzobným roztokom na povrch mikrotitračnej doštičky v množstve 100 μ l na 1 jamku, inkubácia 12 h pri 4 °C,
- b) blokovanie nešpecifických väzobných miest blokovacím tlmivým roztokom 30 min
- c) premývanie - po každom reakčnom kroku 4-krát premývacím roztokom,
- d) aplikácia primárneho antiséra riedeného v riediacom roztoku po 100 μ l na 1 jamku, inkubácia 90 min pri 37 °C,
- e) premývanie ako v c)
- f) aplikácia enzýmového konjugátu SwaR-Px (prasačie antikráličie imunoglobulíny značené peroxidázou - SEVAC, Praha, ČR) po 100 μ l na 1 jamku riedeného 1:4000 až 1:5000, inkubácia 90 min pri 37 °C,
- g) aplikácia substrátu pre peroxidázu - *o*-fenyléndiamínu (OPD) po 100 μ l do každej jamky (2 mg.ml⁻¹ tlmivého roztoku), inkubácia 15 min v tmavej komore pri laboratórnej teplote,
- h) zastavenie reakcie s 5 μ l 2 M H₂SO₄ v každej jamke mikrotitračnej doštičky,
- i) zmeranie absorbancie pri 492 nm.

V rámci vývoja metódy bolo výhodné použiť relatívne hodnoty absorbancií (% E). Pritom sa aplikovalo 5 negatívnych kontrol, t. j. negatívnych štandardov pri každom teste. Aritmetický priemer piatich jednotlivých výsledkov (hodnoty E) sa použil ako jeden negatívny štandard. Relatívna hodnota E jednej vzorky bola definovaná ako pomer nameranej hodnoty E vzorky ku hodnote E negatívneho štandardu v %. $\% E = (E \text{ vzorky} / E \text{ negatívneho štandardu}) \cdot 100$.

Roztoky

Extrakčný tlmivý roztok Tris-NaCl: Tris 0,02 mol.l⁻¹, NaCl 0,5 mol.l⁻¹,

Väzobný tlmivý roztok TBS: 1,215 g Tris (Tris-hydroxymetylaminometán), 9 g NaCl, 1000 ml H₂O, upravené 1 M HCl na pH 7,2),

Blokovací tlmivý roztok: 10 % odtučnené sušené mlieko Eligo v roztoku 0,9 % NaCl s 0,02 % Tween 20,

Premývací roztok: 9 g NaCl, 0,5 ml Tween 20, 1000 ml H₂O,

Riediaci roztok: 10 g hovädzí sérový albumín, 0,1 g mertiolát, 1000 ml väzobný tlmivý roztok TBS,

Substrátový tlmivý roztok: 29,4 g citran trojsodný, 0,1 g mertiolát, 1000 ml H₂O.

Stanovenie parametrov skúšky

Stanovenie citlivosti

Na stanovenie citlivosti boli použité vzorky 0; 220; 880; 1760 a 3520 mg pšeničného proteínu v 1 kg mäsového výrobku alebo 0; 800; 3200; 6400 a 12800 mg sójového proteínu v 1 kg mäsového výrobku. Aritmetický priemer hodnoty % E každej koncentrácie bol definovaný s použitím trojnásobnej hodnoty smerodajnej odchýlky (3 SD).

Stanovenie opakovateľnosti

Pri každej koncentrácii bola vzorka rozdelená do 20 jednotlivých vzoriek, ktoré boli identicky opracované s pšeničným alebo sójovým proteínom a vyšetrené ako slepé vzorky.

Stanovenie selektivity

Na skúšanie selektivity boli použité modelové mäsové výrobky s prídavkom rastlinných proteínov rozličnej skupinovej príslušnosti. Na stanovenie hodnôt % E bola stredná hodnota vypočítaná z piatich paralelne vyšetrovaných vzoriek, ktoré neobsahovali detegovaný analyt (negatívny štandard) a tie boli označené hodnotou 100 %.

Kvalitatívna klasifikácia slepých vzoriek

Na preskúšanie a potvrdenie skúmaných parametrov boli vyšetrované vzorky ako slepé. 20 vzoriek mäsa bez prídavku rastlinných proteínov bolo dotovaných pšeničným proteínom a vyšetrovaných pri simulovaní bežných praktických podmienok ako slepé vzorky. Negatívny štandard slúžil na odčítanie hodnoty extinkcie. Výsledky boli zaradené do tabuľky podľa relatívnych hodnôt absorbancií plus/mínus trojnásobná hodnota smerodajnej odchýlky (% E \pm 3 SD).

Stanovenie detekčného limitu

Dolnou hranicou rozptylu (priemer \pm 3 SD) bol kvantitatívny detekčný limit. Kvalitatívny detekčný limit bol horným ohraničením rozsahu pre vzorky.

Skúšanie komerčných tepelne opracovaných mäsových výrobkov

V oboch prípadoch (antisérum proti pšeničným i sójovým proteínom) boli vyšetrované dve skupiny tepelne opracovaných mäsových výrobkov, a to mäkké salámy, do ktorých sú obvykle pridávané múky rastlinného pôvodu alebo proteíny a suché salámy, do ktorých nie sú pridávané tieto aditíva.

Výsledky a diskusia

Skúšanie citlivosti (tab. 1, 2)

Hranica citlivosti ELISA metódy pre pšeničný proteín bola 220 mg pšeničného proteínu v 1 kg tepelne upraveného mäsového výrobku (t. j. 0,2 % pšeničnej múky pri obsahu 11 % pšeničného proteínu v múke) a pre sójový proteín dosiahla hodnotu 800 mg sójového proteínu v 1 kg tepelne upraveného mäsového výrobku (t. j. 0,2 % sójovej múky pri obsahu 40 % sójového proteínu v múke).

TABUĽKA 1. Stanovenie citlivosti ELISA metódy - dôkaz pšeničného proteínu.

TABLE 1. Sensitivity determination of the ELISA method - wheat protein detection.

Koncentrácia pšeničného proteínu ¹ [mg.kg ⁻¹]	0	220	880	1760	3520
Koncentrácia pšeničnej múky ² [%]	0	0,2	0,8	1,6	3,2
Počet vzoriek ³	20	20	20	20	20
XA % E	89,91	61,79	45,32	28,85	14,83
SD	4,095	3,367	2,093	2,639	1,729
XA % E \pm 3 SD	89,91 \pm 12,285	61,79 \pm 10,101	45,32 \pm 6,279	28,85 \pm 7,917	14,83 \pm 5,187
Percentuálny podiel vzoriek ⁴	100	100	100	100	100

TABUĽKA 2. Stanovenie citlivosti ELISA metódy - dôkaz sójového proteínu.

TABLE 2. Sensitivity determination of the ELISA method - soya protein detection.

Koncentrácia sójového proteínu ⁵ [mg.kg ⁻¹]	0	800	3200	6400	12800
Koncentrácia sójovej múky ⁶ [%]	0	0,2	0,8	1,6	3,2
Počet vzoriek ³	20	20	20	20	20
XA % E	65,42	44,92	32,32	29,10	15,20
SD	4,31	2,009	2,202	1,747	1,147
XA % E \pm 3 SD	65,42 \pm 12,93	44,92 \pm 6,027	32,32 \pm 6,606	29,10 \pm 5,241	15,20 \pm 3,441
Percentuálny podiel vzoriek ⁴	100	100	100	100	100

XA %E - aritmetický priemer relatívnej hodnoty absorbancie (% E), % E = (absorbancia vzorky/absorbancia negatívneho štandardu).100, SD - smerodajná odchýlka.

XA %E - arithmetic average of the relative value of absorbance (% E), % E = (absorbance of the sample/absorbance of the negative standard).100, SD - standard deviation.

1 - wheat protein concentration, 2 - wheat flour concentration, 3 - number of samples, 4 - percentage of samples, 5 - soya protein concentration, 6 - soya flour concentration.

Stanovenie opakovateľnosti (tab. 3, 4)

Variačné koeficienty ležia pre hodnoty % E medzi 3,376 pri 0 mg.kg⁻¹ a 2,45 pri 3520 mg.kg⁻¹ vzorky pre pšeničný proteín. Pre sójový proteín medzi 2,482 pri 0 mg.kg⁻¹ vzorky a 1,447 mg.kg⁻¹ vzorky pri 12800 mg.kg⁻¹ vzorky. To znamená, že hodnoty variačných koeficientov pri tých istých vzorkách sú rozptýlené len v malom rozsahu od strednej hodnoty. Kvalitatívne i kvantitatívne sa dá test spoľahlivo zopakovať.

TABUĽKA 3. Stanovenie opakovateľnosti ELISA metódy - dôkaz pšeničného proteínu.

TABLE 3. Repeatability determination of the ELISA method - wheat protein detection.

Koncentrácia pšeničného proteínu ¹ [mg.kg ⁻¹]	0	220	880	1760	3520
Koncentrácia pšeničnej múky ² [%]	0	0,2	0,8	1,6	3,2
Počet vzoriek ³	20	20	20	20	20
XA % E	90,54	60,88	43,41	30,3	14,83
SD	3,276	3,270	3,731	2,73	1,91
VK %	3,376	3,180	3,735	2,61	2,45

TABUĽKA 4. Stanovenie opakovateľnosti ELISA metódy - dôkaz sójového proteínu.

TABLE 4. Repeatability determination of the ELISA method - soya protein detection.

Koncentrácia sójového proteínu ⁴ [mg.kg ⁻¹]	0	800	3200	6400	12800
Koncentrácia sójovej múky ⁵ [%]	0	0,2	0,8	1,6	3,2
Počet vzoriek ³	20	20	20	20	20
XA % E	65,95	44,35	30,98	30,4	14,01
SD	3,448	3,453	3,925	1,807	1,267
VK %	2,482	2,480	2,827	2,068	1,447

XA % E - aritmetický priemer relatívnej hodnoty absorbancie (% E), % E = (absorbancia vzorky/absorbancia negatívneho štandardu).100, SD - smerodajná odchýlka, VK - variačný koeficient.

XA % E - arithmetic average of the relative value of absorbance (% E), % E = (absorbance of the sample/absorbance of the negative standard).100, SD - standard deviation, VK - coefficient of variation.

1 - wheat protein concentration, 2 - wheat flour concentration, 3 - number of samples, 4 - soya protein concentration, 5 - soya flour concentration.

Stanovenie špecificity (tab. 5, 6)

Vzorky s hodnotou % E 61,05 pri detekcii pšeničného proteínu a 45,10 pri detekcii sójového proteínu boli označené ako negatívne.

Dôkaz pšeničného a sójového proteínu v slepých vzorkách - zisťovanie parametrov testu (tab. 7, 8)

Maximálne 11 % analyzovaných vzoriek bolo zaradených do zlého rozsahu koncentrácií.

TABUĽKA 5. Stanovenie špecificity ELISA metódy - dôkaz pšeničného proteínu.
TABLE 5. Specificity determination of the ELISA method - wheat protein detection.

Koncentrácia proteínu ¹ [mg.kg ⁻¹]	220	1800
Pšeničný proteín ² (% E)	61,05	31,2
Sójový proteín ³ (% E)	96,128	91,931
Ražný proteín ⁴ (% E)	93,71	99,83
Kukuričný proteín ⁵ (% E)	94,37	90,14
Ovsený proteín ⁶ (% E)	90,73	93,03

TABUĽKA 6. Stanovenie špecificity ELISA metódy - dôkaz sójového proteínu.
TABLE 6. Specificity determination of the ELISA method - soya protein detection.

Koncentrácia proteínu ¹ [mg.kg ⁻¹]	800	6400
Pšeničný proteín ² (% E)	97,566	98,135
Sójový proteín ³ (% E)	45,10	29,51
Ražný proteín ⁴ (% E)	91,744	89,112
Kukuričný proteín ⁵ (% E)	91,274	97,565
Ovsený proteín ⁶ (% E)	94,529	92,72

1 - protein concentration, 2 - wheat protein, 3 - soya protein, 4 - rye protein, 5 - maize protein, 6 - oat protein.

TABUĽKA 7. Kvalitatívna klasifikácia slepých vzoriek - dôkaz pšeničného proteínu.
TABLE 7. Qualitative classification of the unknown samples - wheat protein detection.

Koncentrácia pšeničného proteínu ¹ [mg.kg ⁻¹]	0	220	880–3520
Koncentrácia pšeničnej múky ² [%]	0	0,2	0,8–3,2
Počet vzoriek ³	20	20	60
% E min.	78,53	45,59	9,377
% E max.	99,92	71,16	54,054
Kvalitatívne negatívne ⁴ (% E 71,89)	100	0	0
Kvantitatívne pozitívne ⁵ (% E 51,688)	0	100	100

TABUĽKA 8. Kvalitatívna klasifikácia slepých vzoriek - dôkaz sójového proteínu.
TABLE 8. Qualitative classification of the unknown samples - soya protein detection.

Koncentrácia sójového proteínu ⁶ [mg.kg ⁻¹]	0	800	3200–12800
Koncentrácia sójovej múky ⁷ [%]	0	0,2	0,8–3,2
Počet vzoriek ³	20	20	20
% E min.	51,883	28,858	25,8
% E max.	80,134	54,137	18,71
Kvalitatívne negatívne ⁴ (% E 71,89)	100	0	0
Kvantitatívne pozitívne ⁵ (% E 51,688)	0	100	100

% E min. - minimum relatívnej hodnoty absorbancie, % E max. - maximum relatívnej hodnoty absorban-
cie.

% E min. - minimum of the relative value of absorbance, % E max. - maximum of the relative value
of absorbance.

1 - wheat protein concentration, 2 - wheat flour concentration, 3 - number of samples, 4 - qualitatively
negative, 5 - quantitatively positive, 6 - soya protein concentration, 7 - soya flour concentration.

Stanovenie detekčného limitu (tab. 9, 10)

Pozitívny štandard obsahoval 220 mg pšeničného proteínu v 1 kg modelového mäsového výrobku (t. j. 0,2 %) alebo 800 mg sójového proteínu v 1 kg modelového mäsového výrobku (t. j. 0,8 %). Kvantitatívny detekčný limit bol pri dôkaze pšeničného proteínu 51,688 % E a pri dôkaze sójového proteínu 34,273 % E. Kvalitatívny detekčný limit bol pri dôkaze pšeničného proteínu 71,89 % E a pri dôkaze sójového proteínu 55,567 % E.

TABUĽKA 9. Detekčný limit ELISA metódy - dôkaz pšeničného proteínu.
TABLE 9. Limit of detection of the ELISA method - wheat protein detection.

Koncentrácia pšeničného proteínu ¹ [mg.kg ⁻¹]	0	220
Koncentrácia pšeničnej múky ² [%]	0	0,2
Počet vzoriek ³	20	20
% E min.	80,899	54,236
% E max.	97,279	66,43
XA % E (n=20)	89,908	61,789
SD (VK %)	4,095 (4,186)	3,367 (4,914)
XA % E - 3 SD	77,632	51,688
XA % E + 3 SD	102,184	71,89

Pozitívny štandard 220 mg.kg⁻¹. Všetky vzorky s hodnotou % E 71,89 obsahujú pšeničný proteín.
The positive standard 220 mg.kg⁻¹. All samples with the value % E 71,89 contain the wheat protein.

TABUĽKA 10. Detekčný limit ELISA metódy - dôkaz sójového proteínu.
TABLE 10. Limit of detection of the ELISA method - soya protein detection.

Koncentrácia sójového proteínu ⁴ [mg.kg ⁻¹]	0	800
Koncentrácia sójovej múky ⁵ [%]	0	0,8
Počet vzoriek ³	20	20
% E min.	61,08	40,95
% E max.	70,625	48,23
XA % E (n=20)	65,356	44,92
SD (VK %)	5,187 (5,369)	3,549 (4,932)
XA % E - 3 SD	49,795	34,273
XA % E + 3 SD	80,917	55,567

Pozitívny štandard 800 mg.kg⁻¹. Všetky vzorky s hodnotou % E 55,567 obsahujú sójový proteín.
The positive standard 800 mg.kg⁻¹. All samples with the value % E 55,567 contain the soya protein.

% E min. - minimum relatívnej hodnoty absorbancie, % E max. - maximum relatívnej hodnoty absorbancie, XA % E (n=20) - aritmetický priemer relatívnej hodnoty absorbancie (% E) - celkom 20 meraní, % E = (absorbancia vzorky/absorbancia negatívneho štandardu).100, SD - smerodajná odchýlka, VK - variačný koeficient.

% E min. - minimum of the relative value of absorbance, % E max. - maximum of the relative value of absorbance, XA % E (n=20) - arithmetic average of the relative value of absorbance (% E) - total number of measurement 20, % E = (absorbance of the sample/absorbance of the negative standard).100, SD - standard deviation, VK - coefficient of variation.

1 - wheat protein concentration, 2 - wheat flour concentration, 3 - number of samples, 4 - soya protein concentration, 5 - soya flour concentration.

Skúšanie komerčných tepelne opracovaných mäsových výrobkov (tab. 11, 12)

Dosiahnuté výsledky zodpovedali hodnotám uvedeným vo výrobných receptúrach.

Opísaný postup, založený na nepriamej ELISA metóde, je vhodný na kvantifikáciu pšeničného a sójového proteínu v mäsových výrobkoch pred i po tepelnej úprave.

V našich experimentoch maximálne 11 % vzoriek bolo zaradených do zlého rozsahu koncentrácií. Neboli pozorované falošne pozitívne a ani falošne negatívne výsledky.

Percentuálny podiel pšeničného alebo sójového proteínu v mäsových výrobkoch je možné stanoviť dvoma spôsobmi, a to vizuálnym porovnaním intenzity sfarbenia vzoriek v jednotlivých jamkách so štandardmi (semi-kvantitatívne vyhodnotenie) alebo spektrofotometricky (kvantitatívne vy-

TABUĽKA 11. Dôkaz pšeničného proteínu v extraktoch z komerčných tepelne upravených mäsových výrobkov.

TABLE 11. Wheat protein detection in the extracts from the commercial heat-treated meat products.

Mäsový výrobok ¹	% E	Koncentrácia pšeničného proteínu ² [g.kg ⁻¹]
špekáčik ³	15,63	>3,0
párková klobása ⁴	15,573	>3,0
jemné párky ⁵	14,176	>3,0
Kalinka	93,03	0
Pribina	90,09	0
Hornád	86,86	0

1 - meat product, 2 - wheat protein concentration, 3 - tender pork sausage, 4 - tender beef sausage, 5 - delicate frankfurters.

TABUĽKA 12. Dôkaz sójového proteínu v extraktoch z komerčných tepelne upravených mäsových výrobkov.

TABLE 12. Soya protein detection in the extracts from the commercial heat-treated meat products.

Mäsový výrobok ¹	% E	Koncentrácia sójového proteínu ² [g.kg ⁻¹]
desiatová saláma ³	28,65	>6,4
párková klobása ⁴	30,72	>6,4
párky obyčajné ⁵	27,41	>6,4
Kalinka	93,03	0
Pribina	90,09	0
Hornád	86,86	0

1 - meat product, 2 - soya protein concentration, 3 - snack salami, 4 - tender beef sausage, 5 - normal frankfurters.

hodnotenie), keď je koncentrácia aditívneho rastlinného proteínu stanovená na základe nameranej absorpcie odčítaním z kalibračnej krivky. Na kalibráciu je vhodné používať extrakty z modelových mäsových výrobkov s prídavkom pšeničného proteínu (resp. pšeničnej múky) alebo sójového proteínu (resp. sójovej múky). Pozadie, ktoré vytvárajú živočíšne proteíny je analógické s pozadím vznikajúcim pri analýze rastlinných proteínov v komerčných mäsových výrobkoch.

Detekčné parametre popísanej metódy sú porovnateľné a v niektorých aspektoch i lepšie ako doteraz vyvinuté metódy. Janssen a kol. [3] použil metódu elektroblotting na dôkaz sójového proteínu a pšeničného gluténu a dosiahol citlivosť 0,1 %. Medina [17] aplikoval nepriamu ELISA techniku na detekciu a meranie kvantity sójového proteínu v extraktoch modelových frankfurtských párkov a v komerčných tepelne opracovaných a neopracovaných párkoch. Podarilo sa mu kvantifikovať sójový proteín v rozsahu citlivosti od 0–5 %. Ďalšie zvýšenie detekčnej citlivosti tejto metódy je možné s použitím špecifického antiséra pripraveného proti natívnym termorezistentným antigénom, hoci tepelná rezistencia proteínov nie je absolútna.

Inú alternatívu poskytujú metódy založené na báze analýzy nukleových kyselín, DNA-hybridizácii a polymerázovej reťazovej reakcii (PCR). Vlastné vykonávanie analýzy je prácnejšie. DNA-hybridizácia je veľmi vhodná identifikačná metóda pre detekciu aditívnych proteínov v mäsových výrobkoch opracovaných pri vysokej teplote [5]. PCR metóda deteguje sójový proteín v komerčných tepelne opracovaných mäsových výrobkoch s detekčnou citlivosťou 1 % [18].

Vyvinutá sendvičová imunochemická metóda, založená na nepriamej ELISA metóde, je vhodná na kvantitatívne vyhodnotenie koncentrácie pšeničného a sójového proteínu v tepelne opracovaných mäsových výrobkoch.

Literatúra

1. JANSSEN, F. W. - DE BAAIJ, J. A. - HÄGELE, G.: Wärmebehandelte Fleischprodukte, Feststellung von modifizierten Gluten mit Hilfe der SDS-Elektrophorese, Western-Blotting und immunochemischer Färbung. Fleischwirtschaft, 79, 1994, s. 176-178.
2. SKERITT, J. H. - HILL, A. S.: Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods. Journal of Agricultural Food Chemistry, 38, 1990, s. 1771-1778.
3. JANSSEN, F. W. - VOORTMAN, G. - DE BAAIJ, J. A.: Detection of wheat gluten, whey protein, casein, ovalbumin and soya protein in heated meat products by electrophoresis, blotting and immunoperoxidase staining. Journal of Agricultural Food Chemistry, 35, 1987, s. 563-567.

4. MEYER, R. - CADRIAN, U. - LÜTHY, J.: Tierartbestimmung und Sojanachweis in erhitzten Fleischprodukten mittels Polymerase-Ketten Reaktion (PCR). Mitteilung Gebiete Lebensmittel Hygiene, *84*, 1993, s. 112-121.
5. SVOBODA, I. - BARTOŠ, J.: Druhové specifické proteiny masných výrobcích. Maso, *2*, 1994, s. 38-40.
6. KAISER, K. P. - KRAUSE, J.: Analytik von Proteinen in Lebensmitteln mit elektrophoretischen Verfahren. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, *180*, 1985, s. 181-185.
7. OLSMAN, W. J. - HITCHCOCK, C.: Detection and determination of vegetable proteins in meat products. In: KING, R. D.: Developments in food analysis techniques. London : Applied Science, 1980, s. 255-260.
8. ELDRIDGE, A. C.: Determination of soya protein in processed foods. Journal of American Oil Chemical Society, *58*, 1981, s. 483-485.
9. KALTWASSER, E. - BAUDNER, S. - GUNTHER, H. O.: Immunochemical determination of textured soya protein (TVP). Fleischwirtschaft, *64*, 1984, s. 722-723.
10. HITCHCOCK, C. H. S. - BAILEY, F. J. - CRIMES, A. A. - DEAN, D. A. G. - DAVIES, P. J.: Determination of soya proteins in food using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) procedure. Journal of Food Science and Agriculture, *32*, 1981, s. 157-165.
11. JANSSEN, F. W. - VOORTMAN, G. - DE BAAIJ, J. A.: Een snelle screeningsmethode voor sojaeiwit in vleeswaren door middel van een enzyme immunoassay of nitrocellulose. De Ware (N) - Chemicus, *15*, 1985, s. 42-45.
12. MARCIN, A. - FENCÍK, R. - BELÍČKOVÁ, E. - SIKLENKA, P.: Dot-Blot technique for the quantitative detection of the wheat protein in the sausages. Veterinary Medicine - Czech, *40*, 1995a, s. 227-231.
13. MARCIN, A. - FENCÍK, R. - BELÍČKOVÁ, E. - SIKLENKA, P.: Detekcia sójových proteínov v tepelne opracovaných mäsových výrobkoch jednoduchou sendvičovou imunologickou metódou. Slovenský veterinársky časopis, *20*, 1995b, č. 5, s. 227-230.
14. MARCIN, A. - FENCÍK, R. - BELÍČKOVÁ, E. - SIKLENKA, P.: Detection of wheat protein in sausages by DOT-EIA technique. Journal of Food Science and Technology, *3*, 1996, s. 421-424.
15. DUNBAR, B. S. - SCHWOEBEL, E. D.: Preparation of polyclonal antibodies. Methods of Enzymology, *182*, 1990, s. 663-670.
16. MASOPUST, J. - DOLEŽALOVÁ, V.: Základy imunochemických vyšetřovacích metod. Praha : Ústav sér a očkovacích látek, 1976, 153 s.
17. MEDINA, M. B.: Extraction and quantitation of soy protein in sausages by ELISA. Journal of Agricultural Food Chemistry, *36*, 1988, s. 766-771.
18. MEYER, R. - CHARDONNENS, F. - HÜBNER, W. - LÜTHY, J.: Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, *203*, 1996, s. 336-344.

Do redakcie došlo 12.11.1999.

**ELISA detection of the added wheat and soya proteins
in the heat processed meat products**

MARCIN, A. - FENCÍK, R. - MATI, R.: Bull. potrav. Výsk., 39, 2000, p. 135-147.

SUMMARY. A procedure is described for the detection of wheat and soya proteins in heat processed meat products and sausages based on an indirect sandwich ELISA, an immunochemical technique. An antiserum of rabbit allotype prepared against the mentioned plant proteins was used as a primary antibody. Swine antirabbit immunoglobulins conjugated with peroxidase were used as a secondary antibody. *o*-Phenylenediamine was used as a substrate for peroxidase. Sensitivity, reproducibility, selectivity, qualitative classification of unknown samples and the detection limit were determined. The achieved sensitivity of the wheat protein detection was 220 mg.kg⁻¹ (i. e. 0.2 % of the wheat flour containing 11 % of protein) and, for the soya protein, 800 mg.kg⁻¹ (i. e. 0.2 % of the soya flour at 40 % protein in beans).

KEYWORDS: meat products; wheat; soya; sausages; immunodetection