

# Vizsgálati módszerek gabonafélék csírázottságának meghatározására

*Salgó András, Lásztity Radomir és Varga János*

BME Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék, Budapest

Érkezett: 1998. január 15.

A növényi eredetű élelmi nyersanyagok minőségét, technológiai felhasználhatóságát, az azokból készíthető termékek tulajdonságait döntően meghatározza azok aktuális fiziológiai állapota, valamint a fiziológiai állapot várható változásai. Egy sor vizsgáló módszer és technológiai művelet szolgál ezen fiziológiai állapot meghatározására, befolyásolására, illetve stabilizálására.

A gabonafélék minőségét, beltartalmi és funkcionális tulajdonságaikon túl, két fontos fiziológiai jellemző: a csírázóképeség és a csírázottság mértéke határozza meg döntően. Az előbbi tulajdonság a termesztés hatékonysága, a várható hozamok (növénytermesztés), illetve a gabonák hatékony technológiai felhasználása (pl. maláta-előállítás és sörgyártás) szempontjából fontos.

A gabonafélék (búza, árpa, kukorica) csírázottságának mértéke meghatározza a nyersanyag potenciális technológiai értékét, felhasználhatóságát, valamint sütő- és édesipari termékek, extrudált készítmények, tésztafélék, sör- és szeszipari termékek, keményítő előállítás, takarmánygyártás stb. várható minőségét.

A gabonaszemek esetén mért speciális csírázottság, az aratás előtti csírázás folyamatoként fordulhat elő. Ez a folyamatsor a hazai éghajlati viszonyok mellett ritkán okoz minőségi problémákat a termesztők, tárolást végzők, feldolgozók számára, de az 1997. évi aratás során kifejezetten erős, területileg nagy változékonyságot mutató és jelentős gazdasági károkat okozó csírázási folyamatok (pre-harvest sprouting) voltak megfigyelhetők.

Mindezen dinamikus fiziológiai változások gyors kimutatásához jelentős gazdasági érdek fűződik.

Jelen dolgozat célja, azon vizsgálati módszerek kritikai bemutatása, amelyek alkalmasak a gabonafélék csírázottságának meghatározására. A kritikai bemutatás azért szükséges, mert bár ezen vizsgáló eljárások az utóbbi 25 évben jelentős fejlődést mutattak, több szempontból nem alkalmasak a széles körű ipari bevezetésre, és a gyakorlati bevezetést bizonyos körülmények is gátolják.

Ilyen körülmények, illetve szempontok a módszerek nem kielégítő specifikussága, az egyszerű kivitelezhetőség problémái a helyszíni vizsgálatok (ún. field tesztek) során, a mérés gyorsaságával és megbízhatóságával kapcsolatos kifogások, valamint más alkalmazási nehézségek voltak.

Közleményünkben áttekintést adunk a csírázottság mérésére alkalmas módszerekről, de kiemelten és részletesen csak azon technikákkal foglalkozunk, amelyek a fenti szempontokat kielégítik és várhatóan széleskörűen terjedni fognak a közeljövőben, mint pl. a gyors viszkoanalizátoros technika, a közeli infravörös spektroszkópiai eljárások és az immunkémiai mérőmódszerek.

## **A csírázottság mérésére alkalmas vizsgáló módszerek**

A csírázási folyamat kimutatására, követésére, illetve a csírázottság mértékének meghatározására több, alapelveiben különböző csoportba sorolható mérési módszer alkalmas, melyek közül a legfontosabbak a következők:

- 1., Szemrevételezés, vizuális meghatározás.
- 2., Kémiai módszerek, amelyek az aktiválódott hidrolitikus enzimek bontástermékeit mérik.
- 3., Funkcionális vizsgálati módszerek, amelyek a végfelhasználást imitálják.
- 4., Viszkozimetriás alapelvein működő mérési eljárások.
- 5., Közeli infravörös (NIR) spektroszkópiai vizsgálati módszerek.
- 6., Immunkémiai módszerek.

Az egyes módszerek elemzésére itt részletesen nem térünk ki, de foglalkozunk a használati szempontból könnyen kivitelezhető perspektivikus módszerek részleteivel.

**1. A vizuális módszerek** olyan egyszerűen kivitelezhető szabványos eljárások, amikor statisztikailag értékeljük a gabonátétel csírázottságának mértékét, a csírázott vagy csírázási jeleket mutató (duzzadt, héjfelhasadt) szemek arányát. Amennyiben a csírázott szemek aránya meghalad bizonyos arányt (0,5-1%), nagy a valószínűsége a tétel magas amilolitikus aktivitásának, a minőséghibának.

**2. A kémiai módszerek** esetében az enzimes bontás során szabaddá váló végcsoportok számát színreakcióval, illetve a használt szubsztrátum festékkötő (festékeleresztő, kibocsátó) vagy fényszórási tulajdonságainak megváltozását követjük nyomon.

## **Színreakción alapuló módszerek a következők:**

- maltóz-szám meghatározás (1);
- jóddal történő színreakció (2);
- dinitro-szalicilsavas módszer (3);
- kálium-ferricianidos eljárás (4);
- Anthron módszer (5).

Az ún. Ektachem eljárás, egy többrétegű szárazszubsztrátumos vizsgáló módszer (6), ahol az amilázok aktivitását 10 perces 40 °C-on végzett emésztéssel mutatjuk ki.

Hasonló alapelven működik az ún. Ceralpha kolorimetriás módszer, amely helyszíni vizsgálatra jól használható.

Egy sor kolorimetriás enzimes módszer került kidolgozásra, a proteázok, az oxidoreduktázok, a nukleázok, a lipázok aktivitásának mérésére (7).

## **Fényszórás mérésén alapuló módszerekhez sorolható**

- a nefelometriás mérés szabványos eljárása (AACC 2207) (8), valamint
- a kinetikus mikrotitrációs aktivitás meghatározás, ahol 20 µl enzim és 250 µl β-határdextrin szuszpenzió 37 °C-on mérhető turbiditáscsökkenését detektáljuk 340 nm hullámhosszon (9).

## **Festékkötésen, illetve festék-felszabadításon alapuló mérőmódszerek:**

A Phadebas klinikai gyors tesztmódszer adaptációja (10) során az enzim a keményítő-festék mátrixból szabadítja fel a vízoldható festéket ellenőrzött, pufferelt feltételek mellett.

Ugyanezen elven alapul az ún. Amylzyme (vagy Megazyme) eljárás is (11).

## **A reakciótermékek detektálásának fluorimetriás módszerei a következők:**

- β-határdextrin-antranilát bontás követése fluorimetriás módszerrel (12).
- Maltóz-meghatározás glükóz NADH fluoreszcens módszer segítségével (13).

**3. Az ún. funkcionális mérési eljárások közül a következő technikákat alkalmazzuk:**

- Sütési próba, próbacipó vizsgálata, bélzettulajdonságok (pl. ragacsosság, rugalmasság, textura, bélzetszín) meghatározása.
- Gázképző tulajdonságok mérése.

Ezen vizsgáló eljárások rendkívül lassúak, pontatlanok és csak közvetett információt nyújtó módszerek.

**4. Viszkozimetriás** alapelvű aktivitásmérési eljárások körébe a következők tartoznak:

A viszkozimetriás eljárások során a liszt-víz szuszpenzió, esetleg a tészta viszkozitásának változását, illetve annak hőfok-függését elemezzük, és a viszkozitás változásokból következtetünk a hidrolitikus hatásokra, csírázottságra.

A Hagberg-Perten féle esésszám-meghatározás (14) és az amilográfos (viszkográfus) méréstechnika (15) széleskörűen alkalmazott szabványos eljárás.

Az esőgolyós és penetrométeres vizsgáló eljárások (16) elsősorban lassúságuk, viszonylagos pontatlanságuk és a készülékigényesség miatt nem terjedtek el széleskörűen.

A gyakorlati minősítés szempontjából egyre szélesebb körben kerül alkalmazásra a viszkozimetriás alapelvű méréstechnika, az ún. gyors, rotációs viszkooanalizátoros (RVA=rapid visco analyzer) eljárás. Az RVA eljárás során a gabona-őrlemény vagy liszt (3-5 g) és víz (25 cm<sup>3</sup>) szuszpenziójának viszkozitását határozzuk meg egy előre definiált hőfokprofil segítségével (50-100 °C tartomány). Az idő függvényében folyamatosan mérjük a szuszpenzió viszkozitását egy propelleres keverőelem segítségével és a viszkozitásprofil adatokból számítjuk az ún. keverési számot. A keverési szám szoros pozitív korrelációt mutat a Hagberg-féle esési számmal:

$$\text{Keverési szám} = \text{Hagberg-féle esési szám} - 9 / 2,92$$

A viszkozitás-hőfokprofil elemzésével egy sor további reológiai és technológiai jellemző is meghatározható.

A szuszpenziót tartalmazó fémküvetta és a keverőelem egyaránt eldobható kivitelű, a készülék szoftvervezérelt és 3-12 perc alatt kiválóan reprodukálható viszkozitás-idő-hőmérséklet jelsorozatot szolgáltat.

A technika a csírázottság mértékének meghatározása mellett kiválóan alkalmas bármely, viszkozitásváltozással járó folyamatsor érzékeny követésére, illetve elemzésére (17, 18, 19).

**5. A közeli infravörös spektroszkópia** reflexió (NIR) és transzmissziós (NIT) változatait közel tíz éve próbálják alkalmazni gabonafélék csírázottságának mérésére. Osborne és mtsai (20), valamint Williams (21) egyaránt azt találták, hogy a Hagberg-féle esési szám csak gyenge

korreláció mellett ( $R=0,5-0,8$ ) és nagy hibával (SEP, a meghatározás hibája, 35-50 mp a 60-260 mp értéktartományban) mérhető a NIR spektrumok alapján. A reflexiós mérés technika valamivel pontosabb eredményeket ( $R=0,88$  és  $SEP=35$  mp) szolgáltat, mint az őrlés nélküli transzmissziós módszer ( $R=0,76$  és  $SEP=45$  mp).

A csírázottság mértékének referenciaértékeként használhatjuk:

- az  $\alpha$ -amiláz enzimaktivitás értéket,
- az amilázok okozta, keményítőrendszer komplex változásait leíró, viszkozimetriás módszerek adatait (esési szám, keverési szám), valamint
- a csírázottság biológiai módszerrel mért adatait.

Az előbbi két esetben a NIR módszerrel elérhető mérési pontosság statisztikai adatait az 1. táblázat foglalja össze (22).

**1. táblázat: NIR kalibrációk statisztikai eredményei különféle referencia módszerek alkalmazása esetén**

Referencia módszer	Árpa			Búza		
	R	SEP	Tartomány y	R	SEP	Tartomány y
$\alpha$ -amiláz aktivitás	0,795	1,63	0,08-6,81	0,829	1,19	0,07-6,42
Esési szám (Hagberg)	0,810	68,1	60-388	0,786	63,3	60-340
Keverési szám (RVA)	0,796	115,3	8-533	0,857	45,0	20-262

Az eredmények azt jelzik, hogy az alkalmazott referencia módszerek korlátozott érzékenysége és/vagy a NIR spektrumokban található információk vagy azok hiánya miatt a csírázóképeség csak korlátozott pontossággal határozható meg NIR-NIT módszerekkel.

Hasonló pontosságot tudunk elérni, ha biológiai referencia módszereket alkalmazunk. Árpa és búza csírázása esetén, a 0-96 órás csírázási periódusban a csírázási időt 4-5 órás pontossággal lehet közeli infravörös spektroszkópiai módszerrel becsülni (23).

A NIR-NIT módszerekkel jelenleg elérhető pontosság csak tájékoztató, irányadó minőségi adatok nyerésére nyújt lehetőséget, ami a gabonák gyors minőségi osztálybesorolását nagyban segítheti.

Mivel ez a mérés technika a beltartalmi és funkcionális tulajdonságok gyors, roncsolásmentes meghatározására üzemi viszonyok mellett széleskörűen alkalmazott, várható a további intenzív módszerfejlesztés a csírázottság mérésének tekintetében is.

**6. Az immunkémiai alapelvű** eljárások között a következő technikákat használhatjuk a megnövekedett  $\alpha$ -amiláz enzimaktivitás meghatározására:

- Immunhisztokémiai eljárások (24),
- Multiphor izoelektromos fókuszalásos technika (25, 26),
- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) módszer.

Széleskörű gyakorlati alkalmazás szempontjából Skerritt és mtsai (27) legújabb fejlesztésű ELISA eljárása a leginkább figyelemre méltó.

A csírázás során aktiválódó és szintetizálódó amiláz izoenzimek szelektív kimutatását szolgálják a kidolgozott vizsgáló eljárások.

Az alacsonyabb (savasabb) izoelektromos ponttal (pI) rendelkező amiláz izoenzimek szerepe elsősorban a magfejlődés során jelentős, a csírázás során ezen izoenzimek viszonylag kisebb jelentőségűek. A csírázási folyamatban a magasabb pI értékkel bíró (pI=6,0-6,2) izoenzimek játszanak döntő szerepet.

Magas pI értékkel bíró izoenzimeket nyertek és tisztítottak affinitás-kromatográfiás módszerrel, majd a tisztított enzim egerekbe történő befecskendezésével monoklonális antitesteket termeltettek.

Párhuzamosan magas és alacsony pI értékkel bíró amiláz izoenzimek tisztított keverékével poliklonális antitesteket termeltettek nyúlakkal.

A termeltetett monoklonális és poliklonális antitesteket peroxidáz enzimmel jelölve használhatjuk az immunkémiai vizsgálatokban.

Az aktivitásmérés során a gabonaőrleményből készült extraktumot (0,6 g őrlemény + 6 ml 0,5 %-os NaCl) reagáltatjuk a peroxidázjelölt antitesttel, amit a vizsgáló polisztirol kémcső falán stabilizálunk. 5 perc (magas pI, monoklonális), illetve 10 perc (magas+alacsony pI, poliklonális) reakcióidő után a felesleget a kémcsőből kimossuk és a kötött antitest mennyiségét - színreakció segítségével - 450 nm hullámhosszon mérjük. A fotometriás reakció detektálását szemmel vagy egyszerű, hordozható fotométerrel végezhetjük. A mérés kivitelezésének teljes időszükséglete monoklonális technika esetén 15, poliklonális esetben 8 perc.

A gyorsabb mérési eljárás elsősorban a helyi, terményátvételi mérés esetén szükséges. Mindkét módszer specifikus, érzékeny, könnyen kivitelezhető, nem igényel labor felszerelést (teszt-készlet változatban is elkészíthető).

Az ELISA eljárás mindkét változata (mono- és poliklonális) szoros korrelációt mutat ( $R=0,90-0,92$ ) az esési szám (Hagberg) adatokkal, de csak az aktív enzimeket detektálja.

A gyors, olcsó (néhány dollár/mérés), helyben végezhető, egyszerű meghatározás új lehetőséget nyújt a területileg nagy változékonyságot mutató csírázottság szelektív kimutatására, az aratási és átvételi minőség ellenőrzésére.

## Irodalomjegyzék

- (1) AACC (1983) 8<sup>th</sup> ed. Method 22-15.
- (2) Farrand E. A. (1964) *Cereal Chem.* **41**, 98-111.
- (3) Bendelow, V.M. (1963) *J. Inst. Brew.* **69**, 467-472.
- (4) AACC (1983) 8<sup>th</sup> ed. Method 22-16.
- (5) Kibrick A. C., Rogers H. E., Skupp S. (1951) *J. Biol. Chem.* **190**, 107-110.
- (6) Kruger J. E., Hatcher D. W. (1993) In: *Pre-harvest sprouting in cereals.* ed. Walker-Simmons, M.K. and Ried, J.L. pp.400-408.
- (7) Salgó A., Feller U. (1987) *Microchemical Journal* **35**, 12-21.
- (8) AACC (1983) 8<sup>th</sup> ed. Method 22-07.
- (9) Kruger J. E., Hatcher, D. W. (1993) *Cereal Chem.* **70**, 234-235.
- (10) Drews E. és mtsai (1976) *Getreide, Mehl, Brot* **30**, 320-323.
- (11) Megazyme (1992) *Amylzyme method AMZ 7/92 Megazyme Aust. Pty.Ltd. Sydney, Australia*
- (12) Kruger J.E., Marchylo B. (1972) *Cereal Chem.* **49**, 453-459.
- (13) Guilbault, G.G., Rietz, E.B. (1976) *Clin. Chem.* **22**, 1702-1704.
- (14) Hagberg S. (1960) *Cereal Chem.* **37**, 218-222.
- (15) AACC (1983) 8th ed. Method 22-10.
- (16) Mitchell T. A. (1968) *J. Sci. Food Agric.* **19**, 102-106.
- (17) AACC (1995) 9th ed. Method 22-08.
- (18) ICC (1995) Standard No. 161.
- (19) Wrigley C. W. és mtsai (1996) *Cereal Foods World* **41**, 6-11.
- (20) Osborne B. G. és mtsai. (1987) In: *NIR technology in the agricultural and food industries.* ed. Williams P. and Norris K. pp. 185-200.
- (21) Williams P.C. (1989) In: *Proceeding ICC-89 Wheat end-use properties.* ed. Salovaara H. pp. 391-409.
- (22) Czuchajowska Z., Pomeranz Y. (1993) In: *Pre-harvest sprouting in cereals.* ed. Walker-Simmons, M.K. and Ried, J.L. pp. 409-416.
- (23) Salgó A. és mtsai. (1994) In: *Leaping ahead with NIR spectroscopy.* ed. Batten, G.D., Flinn, P.C., Welsh, L.A., Blakeney, A.B. pp. 506-509.
- (24) Gibbons, G.C., Nielsen, E.B. (1983) *J. Inst. Brew.* **89**, 8-14.
- (25) Daussant, J., McGregor, A.W. (1979) *Anal. Biochem.* **93**, 261-266.
- (26) Daussant, J., Hill, R.D. (1979) *Physiol. Plant.* **45**, 255-259.
- (27) Skerritt, J.H., Verity, J.C., Hac, L., Hill, A.S. (1997) *Development of simple field test for pre-harvest sprouting (submitted test method) (személyes közlés)*

# **Vizsgálati módszerek gabonafélék csírázottságának meghatározására**

*Salgó András, Lásztity Radomir és Varga János*

A gabona minőség szerinti átvétele szempontjából alapvető jelentőségű, hogy olyan gyors, megbízható, egyszerűen kivitelezhető módszerek terjedjenek el, amelyekkel lehetőség szerint az aratáskor, gyorsan, a helyszínen megbízható adatokhoz juthatunk a csírázottságról. Az általánosan használt Hagberg-féle esési szám mérés mellett, illetve helyett a sokkal gyorsabb, roncsolásmentes közeli infravörös spektroszkópiai módszerek vagy az aratás helyszínén végezhető specifikus immunkémiai eljárások (ELISA módszerek) intenzív terjedése várható. Ezen eljárások gyorsaságuk mellett alacsony költségigényűek. A helyszíni vizsgálatok céljára ugyancsak alkalmas a nagyobb beruházás igényű gyors viszkozimetriás, ún. RVA eljárás, amely a feldolgozó területen többfunkciósan használható ki.

## **Methods for Determination of Sprouting of Grains**

*Salgó, A., Lásztity, R. and Varga, J.*

In daily practice of grain growers, processors and quality controllers as well as in the receipt of grains, the spreading of fast, reliable, simple measuring methods capable to provide reliable data on sprouting quickly in the field at harvest is of basic importance. Besides or instead of the generally used Hagberg falling number, intensive spreading of much faster near infrared spectroscopic methods or specific immunochemical procedures (ELISA methods) is expectable. These procedures are fast and at the same time low cost. The fast viscosimetric procedure called RVA with a multifunctional use on processing field demanding a larger investment is also applicable for on the spot investigations.

## **Untersuchungsmethoden zur Bestimmung der Keimung von Getreidearten**

*Salgó, A., Lásztity, R. und Varga, J.*

Für die Bewertung der Qualität des Getreides ist es von grundlegender Bedeutung, daß solche zuverlässige und einfach durchführbare Schnellmethoden verbreitet angewandt werden, mit denen bei der Ernte, je nach Möglichkeit am Ort, schnell zuverlässige Daten über die Keimung erhalten werden können. Neben bzw. anstelle der Messung der allgemein verwendeten Fallzahl nach Hagberg ist die intensive Verbreitung der wesentlich schnelleren zerstörungsfreien spektroskopischen Methoden im nahen Infrarotbereich oder der am Ernteort durchführbaren spezifischen immunchemischen Verfahren (ELISA-Methoden) zu erwarten. Diese Verfahren sind neben ihrer Schnelligkeit auch ziemlich kostengünstig. Für die Untersuchungen am Ort ist das viskosimetrische Schnellverfahren, das sogenannte RVA-Verfahren ebenfalls geeignet, das zwar mit einem größeren Investitionsbedarf verbunden ist, aber im Verarbeitungsbereich für mehrere Funktionen eingesetzt werden kann.