

# **Bestimmung der Alpha-Amylase-Aktivität in Vollei und Eigelb mit dem Phadebas®-Amylase-Test = Determination of alpha-amylase activity in whole egg and egg yolk by means of the Phadebas® Amylase test**

Autor(en): **Jäckle, Margrit / Geiges, O.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **77 (1986)**

Heft 3

PDF erstellt am: **05.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983390>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

## Bestimmung der Alpha-Amylase-Aktivität in Vollei und Eigelb mit dem Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test

Determination of Alpha-Amylase Activity in Whole Egg and Egg Yolk by Means of the Phadebas<sup>R</sup> Amylase Test

Margrit Jäckle und O. Geiges

Institut für Lebensmittelwissenschaft, Eidg. Technische Hochschule, Zürich

### Einleitung

In Artikel 174 Absatz 3 der eidgenössischen Lebensmittelverordnung (1), der seit Anfang 1983 in Kraft ist, heisst es: «Eier und Eiprodukte dürfen als pasteurisiert bezeichnet werden, wenn das angewandte Hitzeverfahren alle vegetativen pathogenen Keime abgetötet hat. Dies ist der Fall, wenn durch die Behandlung bei der Eimasse die Amylase, beim Eigelb die Phosphatase inaktiviert wurde.»

Die Überprüfung der Amylase-Inaktivierung zur Kontrolle einer ausreichenden Pasteurisation in Vollei wurde in verschiedenen Arbeiten von *Brooks* (2), *Shrimpton* et al. (3), *Reinke* und *Baker* (4), *Imai* (5) auf ihre Eignung untersucht und als brauchbar beurteilt. Die Methode wird auch von der Codex Alimentarius Kommission der FAO/WHO (6) empfohlen.

Die Alpha-Amylase-Aktivität lässt sich ermitteln durch die Bestimmung der enzymatischen Stärkehydrolyse mittels verschiedener analytischer Messverfahren wie Abnahme der Trübung einer Stärkelösung, Abnahme der Viskosität einer Stärkesuspension, Zunahme der reduzierenden Endgruppen oder Abnahme der Jod-Stärke-Reaktion.

Die am häufigsten angewandten Bestimmungsmethoden, so auch das im Schweizerischen Lebensmittelbuch (7) angegebene Verfahren, beruhen alle auf dem Prinzip der Jod-Stärke-Reaktion. Sie sind nach heutigen Begriffen als relativ aufwendig zu bezeichnen. Durch die Verwendung neuer Substrate konnte dieser Aufwand erheblich reduziert werden. *Ceska* et al. (8) entwickelten ein Alpha-Amylase-Substrat auf der Basis von löslicher Kartoffelstärke, die mit blauen Farbstoffgruppen (Cibacronblau F3G-A) kovalent verbunden und mit 1,4-Butandiolglycidether zu einem wasserunlöslichen Stärkepolymer quervernetzt ist. Das Stärkederivat quillt in Wasser auf. Durch die hydrolytische Wirkung der Alpha-Amylase werden farbmarkierte Fragmente abgespalten. Diese blauen, löslichen Spaltprodukte werden durch Zentrifugation vom Substratüberschuss getrennt. Die Absorption dieser blauen Lösung ist der in der untersuchten Probe vorhandenen

Amylase-Aktivität proportional. Das erwähnte Stärkepolymer ist zusammen mit Phosphatpuffersalzen (pH 7,0) und Natriumchlorid in Tablettenform als Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test von Pharmacia AB, Uppsala, Schweden, im Handel.

Der Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test ist ursprünglich für die Bestimmung der Enzymaktivität in Serum und Urin entwickelt worden (8, 9). Das Substrat ist deshalb auf den pH-Wert von 7,0 abgepuffert, was dem pH-Optimum der Amylase in Serum entspricht. Neben seinem Einsatz in der Humanmedizin wurde der Test in der Zwischenzeit zur Untersuchung von Getreideprodukten (10, 11) und Honig (12) eingesetzt und als gut geeignet beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wird der Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test auf seine Eignung zur einfachen und raschen Bestimmung der Alpha-Amylase-Aktivität in Vollei und Eigelb geprüft und mit der offiziellen amyloklastischen Methode kritisch verglichen.

## Material und Methoden

### *Untersuchte Eier und Eiprodukte, Probenahme*

Lieferung der Schaleneier und Eiprodukte durch die Firma Eierschmid AG, Zürich-Kloten.

- Schaleneier: Lagerung der in Kartons zu 30 Stück nach Provenienz (Finnland, Ungarn, BRD, DDR, Schweiz) sortierten Schaleneier (Klasse: A; Gewicht: 52–64 Gramm; Alter: 2–3 Monate) bis zur Verarbeitung bei 4 °C.
- Nach vorsichtigem Aufschlagen der Schaleneier Probenahme bei Vollei: Homogenisation mit Ultra-Turrax-Stabmixer (20 Sekunden bei 20 000 rpm); Kühlung in Eiswasser bis zur Analyse.
- Eigelb: möglichst sorgfältige, manuelle Trennung von Eigelb und Eiweiss; Eigelb zur besseren Pipettierbarkeit 1:1 (w/v) mit Verdünnungslösung (0,9% NaCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>) nach Gebrauchsanleitung der Pharmacia Diagnostics (13) mischen; Homogenisation mit Ultra-Turrax-Stabmixer (20 Sekunden bei 20 000 rpm); Kühlung in Eiswasser bis zur Analyse.
- Eiprodukte: Enzymatische Analyse der in 2-kg-Kartons gelieferten, pasteurisierten und unpasteurisierten Vollechargen bis 24 Stunden nach Herstellung im Erzeugerbetrieb.

### *Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test*

Pharmacia-pdf-(Schweiz) AG, Dübendorf  
Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test Batch Nr. KE 75175

### *Testdurchführung*

Messstrahlung: 620 nm  
Schichtdicke: 1 cm

Inkubationstemperatur: 44 °C +/- 0,1 °C  
 Inkubationsdauer: 15 Minuten  
 Probevolumen: 0,3 ml Vollei / 0,2 ml Eigelb  
 Inkubationsvolumen: 4,3 ml bei Vollei / 4,2 ml bei Eigelb  
 Messvolumen: 5,3 ml bei Vollei / 5,2 ml bei Eigelb  
 Messung: gegen destilliertes Wasser

In Zentrifugenröhrchen pipettieren bzw. zugeben	Probe	Nullprobe
Probe: Vollei / Eigelb Destilliertes Wasser	0,3 ml / 0,2 ml 4 ml	— 4 ml
— 5 Minuten im Thermostat-Wasserbad bei 44 °C +/- 0,1 °C vorwärmen		
Phadebas <sup>R</sup> -Tablette	1	1
<ul style="list-style-type: none"> <li>— 10 Sekunden auf Vortex-Gerät schütteln;</li> <li>— Verschluss der Zentrifugenröhrchen;</li> <li>— Inkubation bei 44 °C +/- 0,1 °C für genau 15 Minuten</li> </ul>		
0,5 M NaOH-Lösung Probe: Vollei / Eigelb	1 ml —	1 ml 0,3 ml / 0,2 ml
<ul style="list-style-type: none"> <li>— Trennung der gefärbten Lösung vom unlöslichen Rückstand durch Zentrifugation bei 1500*<i>g</i> für 10 Minuten.</li> <li>— Messung der Extinktion des Überstandes bei 620 nm gegen destilliertes Wasser.</li> <li>— Subtraktion der Extinktion der Nullprobe von den gemessenen Probenwerten.</li> <li>— Ablesung und Berechnung der Aktivitätswerte aus der Eichkurve, die jeder Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test-Packung beigelegt ist.</li> </ul>		

### *Berechnung der Alpha-Amylase-Aktivitäten*

Berechnung der Alpha-Amylase-Aktivität in U\**l*<sup>-1</sup> für Vollei bzw. U\**kg*<sup>-1</sup> für Eigelb (empfohlene Standardeinheit der International Union of Biochemistry) aus der Standardkurve, die jeder Testpackung beiliegt.

- *Vollei*: Multiplikation des aus der Eichkurve abgelesenen Wertes mit dem Volumenfaktor  $(5,3/5,2 * 0,2/0,3) = 0,679$ , da die Standardkurve für ein Probevolumen von 0,2 ml bzw. ein Messvolumen von 5,2 ml gilt.
- *Eigelb*: Multiplikation des aus der Eichkurve abgelesenen Wertes mit dem Verdünnungsfaktor 2, da die Eigelbprobe 1:1 (w/v) verdünnt wird.

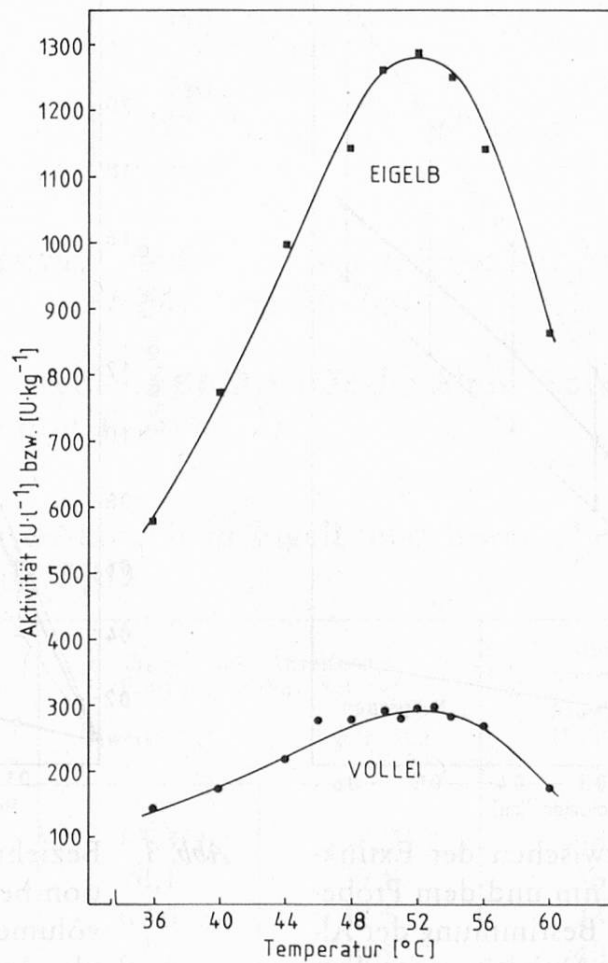


Verwendung von Stärke löslich p. a. Merck 1252 anstelle der vorgeschriebenen löslichen Stärke von Noredux; Trocknung der Stärke im Exsikkator über Diphosphorpentoxid unter (Wasserstrahl-)Vakuum während einer Stunde bei 80 °C; Einsatz der getrockneten Stärke nach Vorschrift des Schweizerischen Lebensmittelbuches (7).

## Ergebnisse

### *Methodische Untersuchungen zum Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test*

Bei einer Vollei- und einer Eigelbmischung, hergestellt aus je fünf Schalen-eiern der Provenienz BRD, wurde die Alpha-Amylase-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur im Bereich von 36 °C bis 60 °C geprüft (Abb. 1).



*Abb. 1.* Temperaturoptimum der Alpha-Amylase in Vollei [U·l<sup>-1</sup>] und Eigelb [U·kg<sup>-1</sup>] nach Bestimmung mit dem Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test

Danach zeigt die Alpha-Amylase die grösste Aktivität zwischen 50 °C und 54 °C, während bei einer Inkubationstemperatur von 44 °C noch rund 75% der maximalen Aktivität erfasst werden. In Anlehnung an die amyloklastischen Methoden nach FAO/WHO-Standard (6) und nach Vorschrift des Schweizerischen Lebensmittelbuches (7) wurden alle weiteren Versuche mit dem Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test bei 44 °C als Inkubationstemperatur durchgeführt.

Um den Einfluss der Probemenge auf die Extinktionswerte zu ermitteln, wurden in einer weiteren Versuchsreihe bei fünf unterschiedlichen Vollei- und Eigelbproben, hergestellt aus je einem Schalenei der Provenienz BRD, die Probevolumina für Vollei zwischen 0,1 ml und 0,6 ml, für Eigelb zwischen 0,1 ml und 0,4 ml variiert. In Abbildung 2 sind die Extinktionsmittelwerte zusammen mit den Extremwerten der fünf untersuchten Volleiproben in Abhängigkeit vom Probevolumen aufgeführt. Abbildung 3 zeigt die analogen Messwerte für Eigelb. Die Abweichungen der Extremwerte von den mittleren Extinktionswerten lagen bei den Nullproben in allen Fällen unter 0,02. Aus diesem Grunde sind in den Abbildungen 2 und 3 für die Nullproben nur die Mittelwerte der Extinktionen dargestellt.

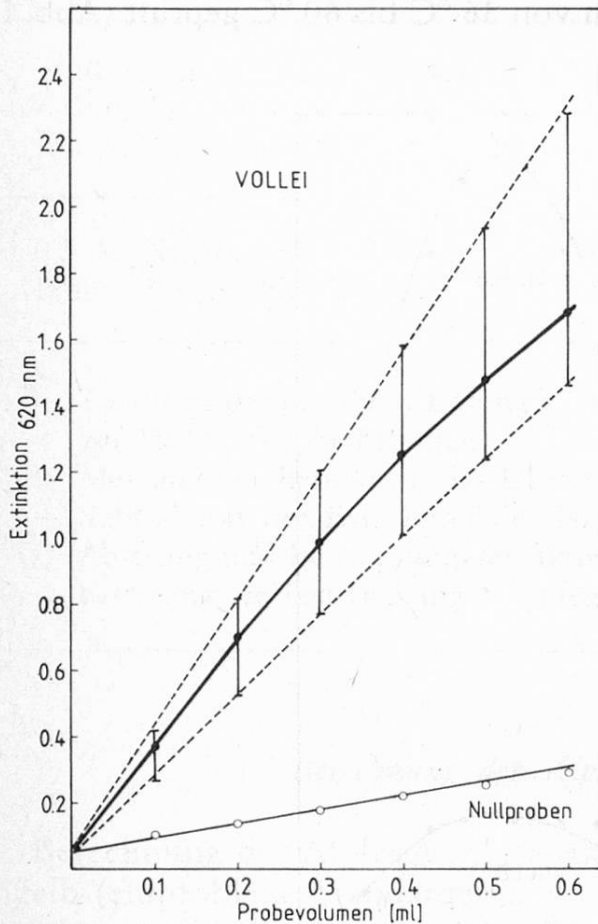


Abb. 2. Beziehung zwischen der Extinktion bei 620 nm und dem Probevolumen bei Bestimmung der Alpha-Amylase-Aktivität mit dem Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test bei 5 unterschiedlichen Volleiproben

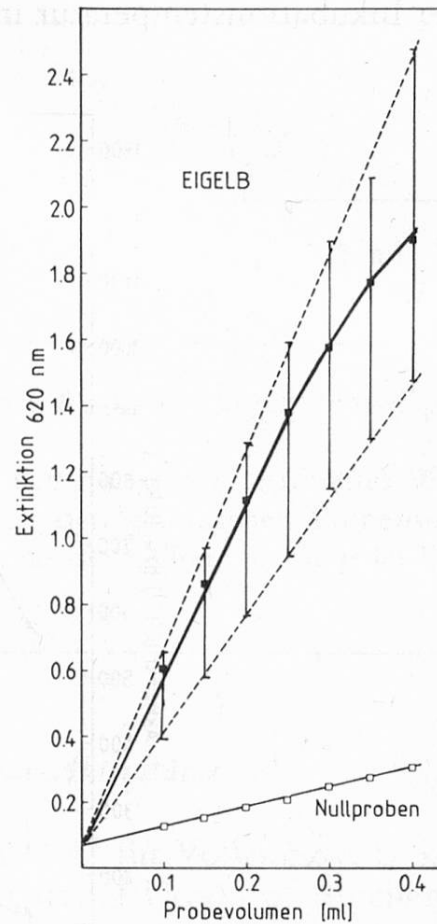


Abb. 3. Beziehung zwischen der Extinktion bei 620 nm und dem Probevolumen bei Bestimmung der Alpha-Amylase-Aktivität mit dem Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test bei 5 unterschiedlichen Eigelbproben

Während die Kurven der Extinktionsextremwerte im untersuchten Messbereich annähernd linear verlaufen, zeigen die Mittelwertkurven im oberen Extinktionsbereich ein von der Linearität leicht abweichendes Verhalten. Bei Vollei verläuft die Kurve der Extinktionsmittelwerte bis zu Werten von 1,0 bis 1,2 linear, entsprechend 0,3 bis 0,4 ml Probevolumen. Bei Eigelb liegen diese Werte bei 1,1 bis 1,3 Extinktion bzw. 0,2 bis 0,3 ml Probevolumen. In allen weiteren Untersuchungen wurde mit Probevolumina von 0,3 ml bei Vollei und 0,2 ml bei Eigelb gearbeitet.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Phadebas<sup>R</sup>-Methode wurde bei je zwei unterschiedlichen Vollei- und Eigelbproben (BRD-Schaleneier) mit je 28 Parallelbestimmungen ermittelt (Tabelle 1) und für befriedigend befunden.

*Tabelle 1.* Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Phadebas<sup>R</sup>-Methode bei je 28 Parallelbestimmungen derselben Eimasse

Eimasse	Mittelwerte der Alpha-Amylase-Aktivität	Standardabweichung	Variationskoeffizient
Vollei	260 U·l <sup>-1</sup>	16 U·l <sup>-1</sup>	6,1%
Vollei	430 U·l <sup>-1</sup>	31 U·l <sup>-1</sup>	7,2%
Eigelb	560 U·kg <sup>-1</sup>	27 U·kg <sup>-1</sup>	4,8%
Eigelb	1220 U·kg <sup>-1</sup>	69 U·kg <sup>-1</sup>	5,5%

*Bestimmung der Alpha-Amylase-Aktivität in Vollei, Eigelb und Eiweiss mit dem Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test*

Bei fünf Eiern der Provenienz BRD wurde die Alpha-Amylase-Aktivität in Eigelb und Eiweiss bestimmt (Tabelle 2).

*Tabelle 2.* Alpha-Amylase-Aktivität in Eigelb und Eiweiss bei fünf Schaleneiern der Provinienz BRD

Ei	Prozentuale Anteile des Eiinhaltes (ohne Schale)		Alpha-Amylase-Aktivität	
	Eiweiss [%]	Eigelb [%]	Eiweiss [U·l <sup>-1</sup> ]	Eigelb [U·kg <sup>-1</sup> ]
1	63,3	36,7	48	1386
2	70,1	29,9	36	1137
3	67,5	32,5	23	1158
4	65,2	34,8	40	1234
5	60,2	39,8	32	1190

Der Inhalt der untersuchten Eier setzte sich im Mittel aus 65,3% Eiweiss und 34,7% Eigelb zusammen. Dabei waren durchschnittlich 95% der gesamten Alpha-Amylase-Aktivität im Eigelb- und nur etwa 5% im mengenmässig überwiegenden Eiweissanteil enthalten.

In 25 Eiern unterschiedlicher Herkunft (Finnland, Ungarn, BRD, Schweiz, DDR) und in 15 industriell hergestellten Volleimassen wurde die Alpha-Amylase-Aktivität bestimmt. Damit sollte die Variationsbreite der Alpha-Amylase-Aktivität in Eiern und Eimassen erfasst werden (Abb. 4 und 5).

Bei den einzelnen Eiern waren sowohl zwischen den Provenienzen als auch innerhalb der Provenienzen deutliche Aktivitätsunterschiede zu beobachten. Bei den 25 Schaleneiern wurden im Vollei Alpha-Amylase-Aktivitäten von 175 U\*l<sup>-1</sup> bis 576 U\*l<sup>-1</sup>, mit einem Mittelwert von 337 U\*l<sup>-1</sup> bestimmt. Innerhalb der Provenienzen traten Alpha-Amylase-Aktivitätsunterschiede auf zwischen 154 U\*l<sup>-1</sup> (BRD) und 316 U\*l<sup>-1</sup> (Schweiz).

Die Alpha-Amylase-Aktivitäten der 15 Volleimassen lagen zwischen 218 U\*l<sup>-1</sup> und 412 U\*l<sup>-1</sup>, bei einem Mittelwert von 328 U\*l<sup>-1</sup>.

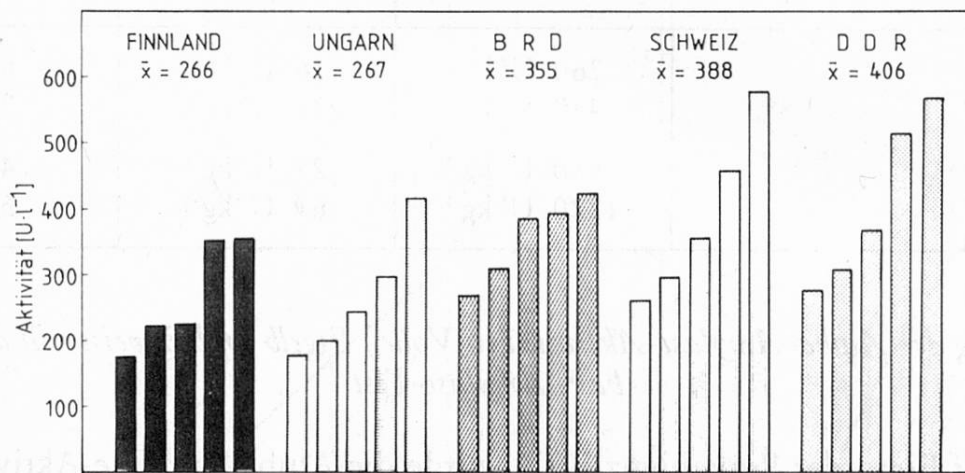


Abb. 4. Alpha-Amylase-Aktivität in Vollei von 25 Schaleneiern aus fünf verschiedenen Provenienzen

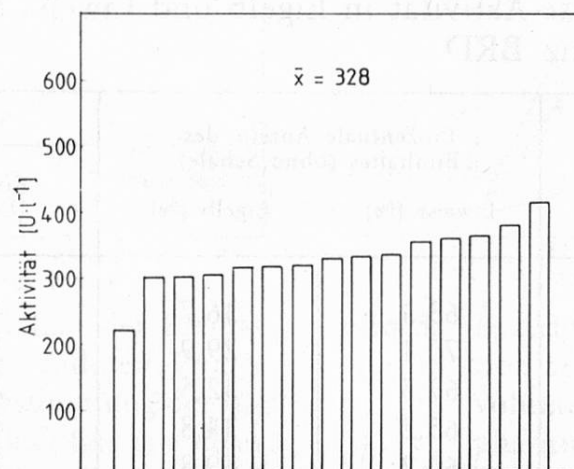


Abb. 5. Alpha-Amylase-Aktivität in 15 industriell hergestellten Volleimassen



Vergleichende Untersuchung der Phadebas<sup>R</sup>-Methode und der amyloklastischen Methode nach Schweizerischem Lebensmittelbuch (7) bei unterschiedlichen Amylase-Aktivitäten

Für die vergleichende Untersuchung der beiden Methoden bei unterschiedlichen Alpha-Amylase-Aktivitäten wurden Volleiprobe eingesetzt, deren Alpha-Amylase durch Hitzepasteurisation teilweise inaktiviert war. Die Korrelation zwischen der Extinktion bei 560 nm als Mass für die Jod-Stärke-Reaktion und den Extinktionsänderungen bei 620 nm nach der Phadebas<sup>R</sup>-Methode ist in Abbildung 6 A dargestellt.

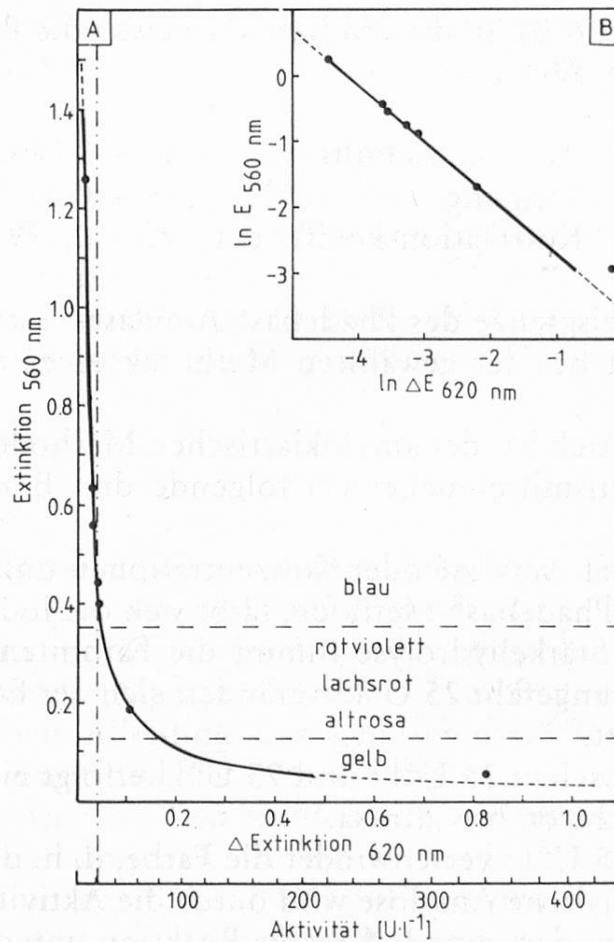


Abb. 6 A. Korrelation zwischen der Extinktion bei 560 nm nach der amyloklastischen Methode (Schweizerisches Lebensmittelbuch (7)) mit der Extinktionsänderung bei 620 nm bzw. der Amylase-Aktivität in Vollei [U·l<sup>-1</sup>] nach dem Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test (untere Nachweisgrenze der Alpha-Amylase-Aktivität in Vollei mit dem Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test bei  $\Delta E_{620 \text{ nm}}$  von 0,040 [= 21 U·l<sup>-1</sup>])

Abb. 6 B. Beziehung zwischen  $\ln E_{560 \text{ nm}}$  und  $\ln \Delta E_{620 \text{ nm}}$ ;

Parameter der Regressionsgeraden

$$\ln E_{560 \text{ nm}} = a + b \cdot \ln \Delta E_{620 \text{ nm}}$$

a = Achsenabschnitt

b = Steigung

r = Korrelationskoeffizient

Werden die Extinktionswerte logarithmisch aufgetragen, resultiert im Messbereich zwischen den Wertepaaren

$$\begin{aligned} & [\Delta E_{620 \text{ nm}} = 0,01 \text{ und } E_{560 \text{ nm}} = 1,22] \\ & \text{sowie} \\ & [\Delta E_{620 \text{ nm}} = 0,47 \text{ und } E_{560 \text{ nm}} = 0,05] \end{aligned}$$

eine lineare Beziehung, die durch die allgemeine Gleichung

$$\ln E_{560 \text{ nm}} = a + b \cdot \ln \Delta E_{620 \text{ nm}}$$

beschrieben wird (Abb. 6 B). In diesem Bereich weisen die Parameter der Regressionsgeraden folgende Werte auf:

Achsenabschnitt	a: - 3,638
Steigung	b: - 0,854
Korrelationskoeffizient	r: - 0,999

Die untere Nachweisgrenze des Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Tests liegt bei  $\Delta E_{620 \text{ nm}} = 0,040$ . Dies entspricht bei der gewählten Methodik einer Amylase-Aktivität in Vollei von  $21 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Rein visuell lassen sich bei der amyloklastischen Methode nach Vorschrift des Schweizerischen Lebensmittelbuches (7) folgende drei Bereiche unterscheiden (Abb. 6 A):

- Bei Abwesenheit der Amylase oder Konzentrationen unter  $25 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$ , nach Bestimmung mit der Phadebas<sup>R</sup>-Methode, färbt sich die Jod-Stärke-Lösung blau. Bei zunehmender Stärkehydrolyse nimmt die Farbintensität des Komplexes allmählich ab. Bei ungefähr  $25 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$  verändert sich der Farbton der Probe von blau zu blauviolett.
- Bei Aktivitäten zwischen  $25 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$  und  $75 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$  erfolgt ein Farbumschlag von rotviolett über lachsrot bis altrosa.
- Bei Werten über  $75 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$  verschwindet die Farbe, d. h. die in den 2 ml 0,7%-Stärke-Lösung enthaltene Amylose wird durch die Aktivität der Alpha-Amylase so weit gespalten, dass eine Jod-Stärke-Reaktion unterbleibt. Diese Proben weisen eine gelbe Farbe auf.

## Diskussion

### *Phadebas<sup>R</sup>-Methode*

Die offizielle Vorschrift zum Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test (13) ist für den Einsatz in der medizinischen Analytik konzipiert. *Barnes et al.* (10), *Regula et al.* (11) und *Siegenthaler* (12) haben die bestehenden Testvorschriften für den Nachweis der Al-



pha-Amylase-Aktivität in Getreideprodukten bzw. in Honig den spezifischen Ansprüchen dieser Produkte angeglichen. Die entsprechende Anpassung der Methodik war auch für die Anwendung des Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Tests bei Vollei und Eigelb notwendig.

Für den sinnvollen und sicheren Einsatz der Methode waren dabei zwei grundlegende Punkte zu berücksichtigen:

- Photometrisches Prinzip der Methode;
- Testparameter: welche Parameter sind variierbar und wie sind diese festzulegen, damit die Methode einfach durchführbar bleibt und sichere, reproduzierbare Werte liefert?

Bei photometrischen Messmethoden unterliegen die Extinktionswerte nur innerhalb eines bestimmten Bereiches linearen Gesetzmässigkeiten. Oberhalb dieses Bereiches flachen Extinktionskurven mehr oder weniger stark ab und lassen keine rechnerisch einfache Auswertung mehr zu. Die genannten Werte liegen im allgemeinen bei Extinktionswerten zwischen 1,0 und 1,5. Es galt deshalb, die Methodik derart anzugleichen, dass auch bei höheren Alpha-Amylase-Aktivitäten in Ei und Eiprodukten keine oder möglichst wenige Extinktionswerte oberhalb des linearen Bereiches lagen.

Die variablen Testparameter beim Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test sind die Inkubationstemperatur, die Probemenge, der pH-Wert des Reaktionsgemisches und die Reaktionszeit.

### *Inkubationstemperatur*

Nach den vorliegenden Untersuchungen zeigt die Alpha-Amylase in Vollei und Eigelb ihre maximale Aktivität im Temperaturbereich von 50 °C bis 54 °C. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Angaben von *Monsey* und *Jones* (14), die ein Optimum der Alpha-Amylase bei Temperaturen zwischen 40 °C und 46 °C festgestellt haben. Allerdings bezogen sich diese Resultate auf Alpha-Amylase in Eiweiss. Zur Ermittlung der Alpha-Amylase-Aktivität in Vollei und Eigelb mit dem Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test wurden alle weiteren Proben bei 44 °C inkubiert, weil auch bei der amyloklastischen Methode, wie sie von der Codex Alimentarius Kommission der FAO/WHO (6) und dem Schweizerischen Lebensmittelbuch (7) festgelegt ist, die Aktivitätsbestimmung der Alpha-Amylase in Vollei bei dieser Temperatur durchgeführt werden.

Dieses Vorgehen bietet gleichzeitig die Möglichkeit, mit etwas höheren Probemengen zu arbeiten und die Testdurchführung dadurch praktikabler zu gestalten. Nicht zuletzt verringert sich damit die Differenz zur Umgebungstemperatur. Bei Wasserbädern mit vergleichsweise kleinen Volumina, wie sie in Routinelabors häufig zu treffen sind, ergeben sich dadurch weniger Schwankungen bei der Temperaturregelung und damit verbunden grössere Sicherheit in der Temperaturkonstanz. Die Erhöhung der Temperatur auf 52 °C würde die Empfindlichkeit der Methode um rund 30% steigern. Dies dürfte insbesondere dann von Vorteil sein, wenn Alpha-Amylase-Restaktivitäten von hitzebehandelten Eiprodukten zu bestimmen sind.

### Probemenge

Als Probenvolumina erwiesen sich 0,3 ml bei Vollei und 0,2 ml einer 1:1-Verdünnung bei Eigelb als praktikabel. Bis zu diesen Werten zeigen die vorliegenden Versuche gut lineare Abhängigkeit der Extinktion von der eingesetzten Probemenge, und dies auch bei Ei-proben mit erhöhter Alpha-Amylase-Aktivität. Der Einsatz grösserer Probemengen führt zu höheren Extinktionswerten bei den jeweiligen Nullproben, weshalb auch aus diesem Grund die vorgeschlagenen Probemengen angezeigt erscheinen. Der Umstand, dass Proben mit extremen Aktivitätswerten bis zu höheren Extinktionen Linearität zeigen, kann nicht plausibel erklärt werden.

### pH-Wert

Der pH-Wert der Reaktionslösung ist beim Phadebas<sup>R</sup>-Test durch Puffersubstanzen, die in der Testtablette enthalten sind, auf den pH-Wert 7,0 festgelegt. Für die Bestimmung der Alpha-Amylase-Aktivität in Honig hat *Siegenthaler* (12) mit verschiedenen Pufferlösungen anstelle von destilliertem Wasser gearbeitet, um den pH-Wert der Testlösung dem pH-Optimum der Honig-Amylase anzugleichen. Für das pH-Optimum der Alpha-Amylase in Vollei gibt *Brooks* (2) einen pH-Wert von 7,5 an. *Monsey* und *Jones* (14) fanden für Eiweiss-Amylase den gleichen Wert. Da die gepufferte Phadebas<sup>R</sup>-Lösung (pH 7,0) nur geringfügig vom pH-Wert von Vollei (pH 7,6) und Eigelb (pH 6,0 bis 6,9) und dem pH-Optimum ihrer Alpha-Amylasen abweicht, und zudem die amyloklastische Methode beim pH-Wert der untersuchten Produkte arbeitet, wurde darauf verzichtet, den pH-Wert der Phadebas<sup>R</sup>-Lösung mit Pufferlösung anzuheben. Damit bleibt insbesondere die einfache Handhabung des Testsystems erhalten, und die aufwendige Zubereitung von Pufferlösung entfällt.

### Reaktionszeit

Prinzipiell kann die Empfindlichkeit des Testsystems durch Verlängerung der vorgeschriebenen Reaktionszeit erhöht werden. Dies erwies sich aber als unnötig, da bereits durch Anpassung der Inkubationstemperatur und der Probemenge sowie die Durchführung des Testes im pH-Bereich des untersuchten Produktes optimale Versuchsbedingungen erreicht wurden.

### Präzision der Ergebnisse

Die in der Gebrauchsinformation (13) angegebene Präzision der Ergebnisse des Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Testes für Serum und Urin mit Variationskoeffizienten von 1,6% bis 2,5% bei Aktivitäten von 210 U\*l<sup>-1</sup> bis 1090 U\*l<sup>-1</sup> bzw. 3,6% bis 4,8% bei 590 U\*l<sup>-1</sup> bis 790 U\*l<sup>-1</sup> werden für Vollei und Eigelb nicht ganz erreicht. Bei Vollei und Eigelb wurden Variationskoeffizienten von 6,1% bis 7,2% bei 260 U\*l<sup>-1</sup> bis 430 U\*l<sup>-1</sup> bzw. 4,8% bis 5,5% bei 570 U\*kg<sup>-1</sup> bis 1260 U\*kg<sup>-1</sup> ermittelt. *Siegenthaler* (12) erreichte bei der Anwendung des Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Testes für Honig einen Variationskoeffizienten von 4,4%, *Regula* et al. (11) für Malzmehle 8,7%. Die Unterschiede der Variationskoeffizienten bei Eigelb und Vollei im



Vergleich zu jenen bei Serum und Urin lassen sich durch die Inhomogenität des Probenmaterials erklären. Trotz Homogenisation können bei Vollei lokale Bereiche auftreten, bei denen das Eiweiss-Eigelb-Verhältnis vom Durchschnittswert abweicht. Bei Eigelb ist nicht auszuschliessen, dass der hohe Lipidanteil bei der Probenverdünnung geringfügige Inhomogenität verursacht. Insgesamt darf die Reproduzierbarkeit des Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Tests aufgrund der Ergebnisse bei der Bestimmung der Amylase-Aktivität in Vollei- und Eigelbmassen als gut bezeichnet werden.

### *Alpha-Amylase-Aktivität in Eiern und Eiprodukten*

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Alpha-Amylase-Aktivitäten in Eiweiss, Eigelb und Vollei lassen den Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test in der vorgeschlagenen Modifikation für den Nachweis von Alpha-Amylase in Eiprodukten als sehr gut geeignet erscheinen. Es konnte gezeigt werden, dass rund 95% der Alpha-Amylase-Aktivität im Eigelb- und nur 5% im Eiweissanteil zu finden sind. Dabei wurde mit  $23 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$  in einer der Eiweissproben die untere Nachweisgrenze der Methode erreicht.

Auch die bei den Einzeleiern unterschiedlicher Provenienz beobachteten Aktivitätsunterschiede bei Vollei liegen alle im Messbereich der Methode. Die in dieser Versuchsserie gemessenen Extremwerte der Alpha-Amylase-Aktivität betragen  $180 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$  und  $560 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$ . Erwartungsgemäss sind die Aktivitätsunterschiede bei industriellen Volleimassen weniger ausgeprägt. Bei einer durchschnittlichen Aktivität von  $328 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$ , ermittelt an 15 Proben, wurden Extremwerte von  $220 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$  und  $410 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$  beobachtet. Soll die Restaktivität der Alpha-Amylase für den Nachweis einer thermischen Behandlung von Vollei dienen, könnten derartige unterschiedliche Ausgangsaktivitäten eine Rolle spielen, weil bei gleicher Hitzebehandlung unterschiedliche Restaktivitäten erreicht würden.

### *Vergleich der beiden Methoden*

Beim Vergleich der amyloklastischen Methode nach Vorschrift des Schweizerischen Lebensmittelbuches (7) mit dem Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test zur Bestimmung der Alpha-Amylase-Aktivität ist primär festzustellen, dass die beiden Methoden auf gegensätzlichen Messprinzipien beruhen. Die amyloklastische Methode misst die Färbung des Jod-Stärke-Komplexes, wobei eine intensive Blaufärbung der Lösung eine geringe Amylase-Aktivität anzeigt. Im Gegensatz dazu ist die Farbintensität beim Phadebas<sup>R</sup>-Test der Alpha-Amylase-Aktivität in der Probe proportional. Die blaue Farbe wird durch gefärbte, lösliche Hydrolyseprodukte eines unlöslichen Stärkederivates verursacht.

Der Bestimmungsansatz für den Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test ist in den vorliegenden Untersuchungen so festgelegt worden, dass die Alpha-Amylase-Aktivität in Vollei über einen Konzentrationsbereich von  $21 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$  bis  $700 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$  bestimmt

werden kann. Für Eigelb liegt der Nachweisbereich der Alpha-Amylase-Aktivität zwischen  $60 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$  und  $2000 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ . In diesem Bereich besteht folgender Zusammenhang zwischen den gemessenen Extinktionswerten und der Amylase-Aktivität in  $\text{U} \cdot \text{l}^{-1}$ :

$$\ln [\text{U} \cdot \text{l}^{-1}] = \ln 60 + A + \sqrt{B + C \cdot \ln \Delta E_{620 \text{ nm}}}$$

(A, B, C: vom Hersteller empirisch ermittelte und für jede Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test-Charge angegebene Konstanten)

Im Gegensatz zur Phadebas<sup>R</sup>-Methode ist die amyloklastische Methode nach Vorschrift des Schweizerischen Lebensmittelbuches (7) auf einen engen Konzentrationsbereich beschränkt und ist für die Erfassung geringer Amylase-Konzentrationen bestimmt. Aufgrund der guten Korrelation der Phadebas<sup>R</sup>-Methode mit der amyloklastischen Methode im ermittelten Gültigkeitsbereich der Regressionsgeraden (Abb. 6B) lassen sich auch die Extinktionswerte der amyloklastischen Methode in Alpha-Amylase-Aktivitäten umrechnen nach der Formel:

$$\ln [\text{U} \cdot \text{l}^{-1}] = \ln 60 + A + \sqrt{B + C \cdot \left( \frac{\ln E_{560 \text{ nm}} - a}{b} \right)}$$

Die vergleichende Untersuchung der amyloklastischen Methode mit der Phadebas<sup>R</sup>-Methode zeigt, dass eine visuell wahrnehmbare Blaufärbung der Jod-Stärke-Reaktion annähernd mit der unteren Nachweisgrenze der Alpha-Amylase-Aktivität beim modifizierten Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test korreliert. Die beiden Methoden sind also beim Nachweis der ausreichenden Pasteurisation von Vollei, die bei Einsatz der Methode des Schweizerischen Lebensmittelbuches (7) durch eine blaue bzw. blauviolette Färbung der Probe angezeigt wird, in ihrer Empfindlichkeit vergleichbar.

Die im Schweizerischen Lebensmittelbuch (7) beschriebene Methode weist allerdings im Gegensatz zur Phadebas<sup>R</sup>-Methode subjektive Aspekte auf. Bereits die Angabe von zwei Farbtönen deutet darauf hin, dass die vielen Schattierungen der Dextrinfärbung mit Jod eine eindeutige Festlegung des Messpunktes erschweren. Die amyloklastische Methode lässt sich deshalb nur durch Angabe des Farbtönen nach einer klar definierten Farbskala oder eines festgesetzten Extinktionswertes objektivieren. Im übrigen können die Färbung der Jod-Stärke-Lösung wie auch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse dieser Methode in hohem Masse von der Art des verwendeten Stärkesubstrates und von dessen Vorbehandlung abhängig sein. Es ist weiter zu beachten, dass die Bildung des Jod-Stärke-Komplexes durch die in der Lösung vorhandenen Proteine gestört werden kann. Diese Störung spielt dann eine Rolle, wenn geringe Alpha-Amylase-Aktivitäten in proteinreichen Lösungen bestimmt werden sollen (14). Dies ist bei pasteurisierten Volleimassen von Bedeutung, zumal Proteine wie Ovalbumin, Ovomuroid, Ovomucin u. a. eine relativ hohe Hitzeresistenz aufweisen (15).

Der Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test weist gegenüber dem amyloplastischen Verfahren folgende Vorteile auf:

- Die Phadebas<sup>R</sup>-Testtabletten stellen ein Substrat dar, dessen Qualität vom Hersteller für jede Charge exakt ermittelt wird. Die Eichergebnisse variieren von Charge zu Charge kaum und liegen jeder Packung bei. Die Testtabletten zeichnen sich durch ihre gute Lagerfähigkeit bei Raumtemperatur aus.
- Der Test ist rasch und problemlos durchzuführen. Die aufwendige Herstellung von Lösungen, insbesondere der Stärke-Lösung, entfällt. Die nach der Phadebas<sup>R</sup>-Methode ermittelten Amylase-Aktivitäten sind eindeutig quantifizierbar.

### *Zusammenfassung*

Die eidgenössische Lebensmittelverordnung bezeichnet Volleimasse als ausreichend erhitzt und damit hygienisch sicher, wenn die Alpha-Amylase inaktiviert ist. Als Testmethode empfiehlt das Lebensmittelbuch eine amyloplastische Methode.

Die vorliegende Arbeit zeigt die Möglichkeit auf, die Alpha-Amylase in Vollei und Eigelb mit Hilfe des Phadebas<sup>R</sup>-Amylasetests nachzuweisen. Dieses Testverfahren, das in der medizinischen Analytik verbreitet ist, erfasst die Alpha-Amylase-Aktivität eines Produktes durch die photometrische Messung löslicher, farbmarkierter Fragmente, die von einem definierten, unlöslichen Substrat abgespalten worden sind. Die Vorschriften für die Phadebas<sup>R</sup>-Methode wurden in der Weise abgeändert, dass mit der amyloplastischen Methode vergleichbare Ergebnisse zu erreichen sind. Der Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test besticht durch seine Einfachheit in der Durchführung und die Möglichkeit der sicheren quantitativen Erfassung der Alpha-Amylase-Aktivität.

### *Résumé*

L'Ordonnance suisse sur les denrées alimentaires qualifie la masse d'oeufs entiers comme suffisamment échauffée et par conséquent hygiéniquement sûre si l'amylase du produit est inactivée. La méthode prescrite par le Manuel suisse des denrées alimentaires pour le dosage de l'amylase est une méthode amyloplastique.

La publication présentée propose l'usage du test de Phadebas<sup>R</sup> au lieu de la méthode officielle. Le test de Phadebas<sup>R</sup> est repris de l'analytique médicale. Les prescriptions du test sont changées de telle manière que les résultats à attendre sont comparables à ceux de la méthode officielle. Le test de Phadebas<sup>R</sup> s'est révélé simple. Il offre la possibilité du dosage quantitatif et exact.

### *Summary*

The Swiss food ordinance considers whole egg as sufficiently heattreated and therefore hygienically safe as soon as the alpha-amylase is inactivated. The Swiss food manual recommends an amyloplastic method as test to determine the inactivation of alpha-amylase.

The paper describes the possibility to proof the alpha-amylase activity in whole egg and egg yolk by means of the Phadebas<sup>R</sup> amylase test. This method, well known in medical ana-



lytics, is a photometrical test. The regulations concerning the Phadebas<sup>R</sup> test have been altered so that comparable results can be expected as when applying the amyloclastic method. The Phadebas<sup>R</sup> amylase test is a simple method for a safe and quantitative determination of the amylase activity.

### Literatur

1. Eidg. Lebensmittelverordnung, Änderung vom 20. Oktober 1982. Kapitel 16, Eier und verarbeitete Eier, Artikel 174 Absatz 3. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1984.
2. Brooks, J.: Alpha-amylase in whole egg and its sensitivity to pasteurization temperatures. *J. Hyg. Camb.* **60**, 145–151 (1962).
3. Shrimpton, D. H., Monsey, B., Hobbs, B. C. and Smith, M. E.: A laboratory determination of the destruction of alpha-amylase and salmonellae in whole egg by heat pasteurization. *J. Hyg. Camb.* **60**, 153–162 (1962).
4. Reinke, W. C. and Baker, R. C.: The effect of pasteurizing liquid whole egg on viscosity, alpha-amylase and Salmonella senftenberg. *Poultry Sci.* **45**, 1321–1327 (1976)
5. Imai, C.: Alpha-amylase test as a method for distinguishing unpasteurized egg products from pasteurized products. *Poultry Sci.* **58**, 815–823 (1979).
6. FAO/WHO: Recommended international code of hygienic practice for egg products — the alpha-amylase test. Joint FAO/WHO Food Standards programme. Codex Alimentarius Commission, 9th session. FAO/WHO, Rome 1971.
7. Schweiz. Lebensmittelbuch, 5. Auflage, 2. Band, Kapitel 21, Eier und Eikonserven. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1969.
8. Ceska, M., Hultman, E. and Ingelman, B. G. A.: A new method for determination of alpha-amylase. *Experientia* **25**, 555–556 (1969).
9. Soinen, K., Härkönen, M., Ceska, M. and Adlercreutz, D.: Comparison between a new chromogenic alpha-amylase test (Phadebas) and the Wolgemuth amyloclastic method in urine. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **30**, 291–297 (1972).
10. Barnes, W. C. and Blakeney, A. B.: Determination of cereal alpha-amylase using a commercially available dye-labelled substrate. *Stärke* **26**, 193–197 (1974).
11. Regula, E., Kohn, M. und Wassermann, L.: Eine einfache Methode zur Bestimmung der Alpha-Amylase in Lebensmitteln. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **7**, 57–59 (1974).
12. Siegenthaler, U.: Bestimmung der Alpha-Amylase in Bienenhonig mit einem handelsüblichen farbmarkierten Substrat. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **66**, 393–399 (1975).
13. Pharmacia Diagnostics: Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test Gebrauchsinformation, 1979.
14. Monsey, J. B. and Jones, J. B.: A simple, enzymatic test for monitoring the efficient thermal pasteurization of chicken egg-white. *J. Food Technol.* **14**, 381–388 (1979).
15. Marciniak, G. G. und Kula, M.-R.: Vergleichende Untersuchung der Methoden zur Bestimmung der Aktivität bakterieller Alpha-Amylasen. *Stärke* **34**, 422–430 (1982).
16. Stadelman, W. and Cotterill, O. J.: Egg science and technology, 2nd ed., Avi Publ. Co., New York 1977.

Margrit Jäckle  
Dr. O. Geiges  
Labor für Lebensmittelmikrobiologie  
Institut für Lebensmittelwissenschaft  
ETH-Zentrum  
CH-8092 Zürich