

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

**Herausgeber:** Bundesamt für Gesundheit

**Band:** 73 (1982)

**Heft:** 1

**Artikel:** Heutiger Stand der enzymatischen Analyse von Lebensmitteln = Recent progress in the enzymatic analysis of food

**Autor:** Amadò, R.

**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-983436>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

**Download PDF:** 02.02.2025

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

R. Amadò, Institut für Lebensmittelwissenschaft der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich, Zürich

## Heutiger Stand der enzymatischen Analyse von Lebensmitteln

Recent Progress in the Enzymatic Analysis of Food

### Einleitung

Die Analyse von Lebensmitteln mit Hilfe von Enzymen hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen und gehört heute in vielen Laboratorien zu den routinemäßig eingesetzten Methoden. Dieser Entwicklung Rechnung tragend, wurde im Jahre 1979 eine Subkommission des Schweizerischen Lebensmittelbuches (LMB) gebildet, deren Auftrag die Ausarbeitung eines speziellen Kapitels «Enzymatische Bestimmungen» (Kapitel 61, LMB) ist. Die Aufnahme der enzymatischen Methoden in das LMB hat zur Folge, daß diese nun in der Schweiz amtlich anerkannt sind und in Streitfällen als Vergleichsmethoden herangezogen werden können. Dieser Umstand und die Tatsache, daß der erste Teil des neuen Kapitels 61 des LMB kurz vor der Veröffentlichung steht, gaben den Anstoß zum vorliegenden Übersichtsreferat, in welchem die enzymatischen Methoden vorgestellt werden sollen\*. Ziel der folgenden Ausführungen ist deshalb, den «Nicht-Enzymatikern» den Einstieg in diese, zum Teil wenigstens, neue Analysenmethode zu erleichtern. Neben den für das Verständnis enzymatischer Reaktionen benötigten Grundlagen der Enzymologie wird auf die Möglichkeiten und Grenzen der Methode hingewiesen. Anhand von Beispielen werden Enzymatik und konventionelle Methoden verglichen.

Enzymatische Lebensmittelanalytik umfaßt 3 Teilgebiete, nämlich:

- Bestimmung von Enzymaktivitäten
- Bestimmung von Inhaltsstoffen mit reinen Enzymen
- Bestimmung von «enzymstummen» Inhaltsstoffen mit Enzym-Immuno-Reaktionen.

\* In der Zwischenzeit ist das erwähnte Kapitel erschienen und erhältlich.

## Bestimmung von Enzymaktivitäten

Lebensmittel und Rohprodukte, welche zur Herstellung von Lebensmitteln dienen, enthalten das ganze Enzymspektrum der lebenden Zellen. Auf- und abbauende Enzyme behalten ihre Wirkung auch nach dem Schlachten von Tieren oder nach der Ernte von pflanzlichen Rohstoffen bei und verursachen zum Teil unerwünschte Veränderungen bei der Lagerung von Lebensmitteln. So bewirken Polyphenoloxidasen die enzymatische Bräunung, welche sich in einer meist nicht geschätzten Farbveränderung des Produktes ausdrückt, Lipoxigenasen führen durch oxidative Veränderungen der Lipide zu sogenannten «off-flavours» und Proteasen können zu Geschmacksänderungen, beispielsweise zum Auftreten von bitteren Peptiden, führen. Eine Inaktivierung der Enzyme vor der Verarbeitung eines Rohstoffes ist demnach notwendig.

In der Lebensmitteltechnologie werden seit langer Zeit Enzymaktivitäten gemessen, um den Grad der Inaktivierung lebensmitteleigener Enzyme durch Hitze zu überprüfen (1). Zwei Beispiele sollen dies belegen. Durch den Vorgang der Pasteurisation wird die alkalische Phosphatase der Milch vollständig inaktiviert (siehe Lebensmittelverordnung Art. 73 Abs. 5). Deren Bestimmung wird deshalb herangezogen um festzustellen, ob richtig pasteurisiert wurde oder ob Rohmilch der pasteurisierten Milch zugemischt worden ist, wobei eine Empfindlichkeit von 1‰ erreicht wird, d. h. ein Liter Rohmilch läßt sich in 1000 Litern pasteurisierter Milch problemlos nachweisen. Bei Blanchierungen wird die Effizienz der Hitzebehandlung durch Bestimmung des hitzeresistenten Enzyms Peroxidase überprüft.

Enzymaktivitäten werden in Lebensmitteln aber auch gemessen, um mikrobielle Infektionen nachzuweisen. In vielen Fällen ist ein mikrobieller Befall mit dem Verderb des Lebensmittels verbunden. Eine stark erhöhte Aktivität gewisser Indikatorenzyme weist unter Umständen auf eine bestimmte Infektion hin. So zeigt zum Beispiel eine stark erhöhte Katalaseaktivität in der Milch eine bakteriell verursachte Erkrankung der Euter (Mastitis) an.

In den letzten Jahren hat sich in der Lebensmitteltechnologie eine neue Richtung enzymatischer Analysen mehr und mehr entwickelt. Durch laufende Messungen von spezifischen Enzymaktivitäten im Rahmen von Verarbeitungs-, Lagerungs- oder Reifungsprozessen wird versucht, einen Einblick in die Biodynamik der Lebensmittel zu gewinnen.

## Bestimmungen von Inhaltsstoffen mit Hilfe von Enzymen

### *Geschichtliches*

Bereits um die Mitte des letzten Jahrhunderts wurden enzymatische Methoden zum Nachweis bestimmter Substanzen vorgeschlagen. *Osann* wies 1845 Wasserstoffperoxid mit Hilfe einer Peroxidase nach, einige Jahre später gab *Schönbein* eine Grenzkonzentration von 0,5 ppm für diese Bestimmung an. 1862

schlug *Dragendorff* den Einsatz eines Malzextraktes vor, um Stärke in Lebensmitteln nachzuweisen (2). In den 80er Jahren des vorigen Jahrhunderts wurden vor allem Kohlenhydrate in größerem Umfang enzymatisch bestimmt. Die Entdeckung der wasserstoffübertragenden Enzyme (Dehydrogenasen) und der dazugehörigen Coenzyme Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-(Phosphat) (NAD(P)) durch *Warburg* et al. (3) eröffnete der enzymatischen Bestimmung von Substanzen neue Möglichkeiten. Weil sich die für die Wirkung der Enzyme notwendigen Coenzyme in ihrer oxidierten bzw. reduzierten Form optisch unterscheiden, wurden Analysen auf der Basis der Lichtabsorption dieser Coenzyme möglich. 1935 darf deshalb als das Geburtsjahr der modernen Enzymatik betrachtet werden. In den Jahren bis ca. 1950 gelang es, einerseits Enzyme und Coenzyme rein und in ausreichenden Mengen zu isolieren, andererseits die Photometer soweit zu verbessern, daß in der klinischen Chemie routinemäßige Bestimmungen durchgeführt werden konnten. Im Bereiche der Lebensmittelanalytik wurden in den frühen 60er Jahren erste Arbeiten zur Bestimmung von Inhaltsstoffen mit Hilfe von Enzymen veröffentlicht. Aus einer Fülle von Publikationen, welche von *Schormüller* (4) in einer Übersichtsarbeit zusammengestellt worden sind, sollen an dieser Stelle 3 Originalarbeiten erwähnt werden, welche in den «Mitteilungen» erschienen sind. *Mayer* und *Busch* (5) beschrieben 1963 eine enzymatische Methode zur Bestimmung von Äpfelsäure in Wein, *Tanner* und *Brunner* (6) 1964 eine solche für Ethanol in Fruchtsäften und *Mayer* und *Pause* (7) 1965 eine Citronensäurebestimmung in alkoholischen Getränken. Routinemäßig werden enzymatische Methoden in der Lebensmittelanalytik seit einigen wenigen Jahren eingesetzt, nicht zuletzt deshalb, weil die auf dem Gebiete der Enzymproduktion führende Firma Böhlinger Mannheim GmbH spezielle Arbeitsanleitungen für verschiedene Substrate bereitstellte (8). Auch im LMB sind bereits vor der Herausgabe des Kapitels über enzymatische Bestimmungen Ende des Jahres 1981 in verschiedenen Sachkapiteln enzymatische Analysen vorgeschlagen worden, so z. B. in den Kapiteln 2 (A + B) und 30. Gemessen an den Möglichkeiten, welche sich dem Lebensmittelanalytiker durch die enzymatischen Methoden eröffnen, ist selbst heute noch deren Anwendung bescheiden. Dies mag verschiedene Gründe haben, von denen 2 erwähnt sein sollen; enzymatische Analysen scheinen auf den ersten Blick wegen der Preise für Enzyme und Coenzyme recht teuer, und das Vertrauen in die für einen Chemiker fremde biochemische Arbeitsweise ist noch nicht überall vorhanden. Klassische, anorganische, organische oder physikalische Methoden werden deshalb vorgezogen.

Die nachfolgende, einer Arbeit von *Henniger* (9) entnommene Tabelle 1 soll aufzeigen, in welchen Gebieten heute Enzymatik betrieben wird.

In der Biochemie und auch in der Botanik, insbesondere in der Pflanzenphysiologie, werden Enzyme eingesetzt, um Stoffwechselprodukte spezifisch zu bestimmen. Das Hauptanwendungsgebiet stellt die klinische Chemie dar, wo einerseits Enzymaktivitäten in Serum und Plasma, andererseits Stoffwechselprodukte wie Blutzucker, Cholesterin, Harnstoff usw. im Blut und anderen Körperflüssigkeiten bestimmt werden. In der klinischen Chemie werden die enzymatischen Bestimmungen vorwiegend als Diagnosehilfe eingesetzt. In der Lebensmit-

*Tabelle 1.* Anwendungsgebiete der enzymatischen Analyse

- |                                  |                                   |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| – Biochemie und Naturstoffchemie |                                   |
| – Botanik und Agrikulturchemie   |                                   |
| – Klinische Chemie               | Humanmedizin und Veterinärmedizin |
| – Lebensmittelchemie             | Lebensmittel                      |
|                                  | Kosmetische Produkte              |
|                                  | Tabak                             |
| – Mikrobiologie                  |                                   |
| – organische Chemie              |                                   |
| – Pharmakologie                  |                                   |

telchemie werden Inhaltsstoffe wie organische Säuren, Zucker, Alkohole usw. in verschiedensten Lebensmitteln bestimmt. Bei kosmetischen Produkten werden zum Beispiel Feuchthaltemittel wie Glycerin in verschiedensten Pasten oder Ethanol in Haarwassern enzymatisch bestimmt. In der Zigarettenindustrie hat sich ebenfalls die enzymatische Glycerinbestimmung bewährt, daneben interessieren aber auch die Bestimmungen von Saccharose, Glucose und Fructose besonders. Im mikrobiologischen Bereich werden Enzyme sowohl zur Kontrolle von Wachstum und Stoffumsatz der Mikroorganismen als auch zur Überwachung von technischen Gärprozessen eingesetzt. Fehlgärungen lassen sich durch Bestimmung einzelner organischer Säuren (Acetat, Lactat) einfach und rasch erkennen. Die Bestimmungen einfacher organischer Säuren wie Ameisen-, Oxalsäure usw. interessieren vor allem den organischen Chemiker, sind doch spezifische chemische Bestimmungsmethoden für diese Substanzen recht aufwendig. Schließlich werden enzymatische Methoden sehr häufig im pharmazeutischen Sektor angewendet, um beispielsweise die Inhaltsstoffe von Infusionslösungen, Salben, Tabletten usw. spezifisch zu bestimmen.

### *Grundlagen der Enzymologie*

Die Durchführung enzymatischer Analysen ist heute wegen der großen Zahl ausgearbeiteter Arbeitsvorschriften (8, 10, 11) nahezu problemlos. Analysen nach dem «Kochbuch-Verfahren» verlangen wenig oder keine Kenntnisse der Grundlagen der Enzymologie, genaues Einhalten der Reaktionsbedingungen und sauberes Arbeiten genügen, um brauchbare und zufriedenstellende Resultate zu erhalten. Exakte und seriöse Enzymatik kann aber nur betrieben werden, wenn die einfachsten Grundlagen der Enzymologie bekannt sind. Im zweiten Teil dieser Übersicht sollen deshalb die grundlegenden Aspekte der Enzymologie aufgezeigt werden. Die Aussagen sind einer früheren Arbeit (12) entnommen und ergänzt worden. Durch Konsultation von biochemischen Lehrbüchern (z. B. 2, 13) können diese Kenntnisse vertieft werden.

## Natur und Wirkung von Enzymen

Definitionsgemäß handelt es sich bei Enzymen um lösliche hochmolekulare Katalysatoren, welche durch lebende Zellen produziert werden. Es sind also *Bio-katalysatoren*. Wie alle Katalysatoren erniedrigen Enzyme die Aktivierungsenergie einer Reaktion, beschleunigen dadurch deren Ablauf (sowohl Vorwärts- als auch Rückwärtsreaktion), verändern aber nie die Lage des chemischen Gleichgewichts. Katalysatoren zeichnen sich außerdem dadurch aus, daß sie an chemischen Reaktionen teilnehmen, nach Ablauf derselben aber unverändert im Gemisch vorliegen.

Chemisch gesehen gehören die Enzyme zu den *Eiweißstoffen*. Viele Enzyme sind reine Proteine, andere haben Glycoproteincharakter. Die Eigenschaften von Enzymen sind deshalb weitgehend vom Aufbau des Proteins (Sequenz der Aminosäuren) und der räumlichen Anordnung der Peptidketten (Kettenkonformation) abhängig. Zur Ausübung ihrer Wirkung benötigen viele Enzyme niedermolekulare Wirkgruppen, sogenannte Coenzyme (Cosubstrate oder prosthetische Gruppen) und/oder Cofaktoren.

An der katalytischen Wirkung nehmen nur einige wenige reaktive Gruppen teil, welche sich im *aktiven Zentrum* des Enzyms befinden. Wie Abbildung 1 für das Beispiel der Kreatinkinase zeigt, handelt es sich bei den für die Wirkung essentiellen Gruppen um einzelne Aminosäurereste, Cosubstrat (Adenosintriphosphat) und Cofaktor ( $Mg^{2+}$ ).

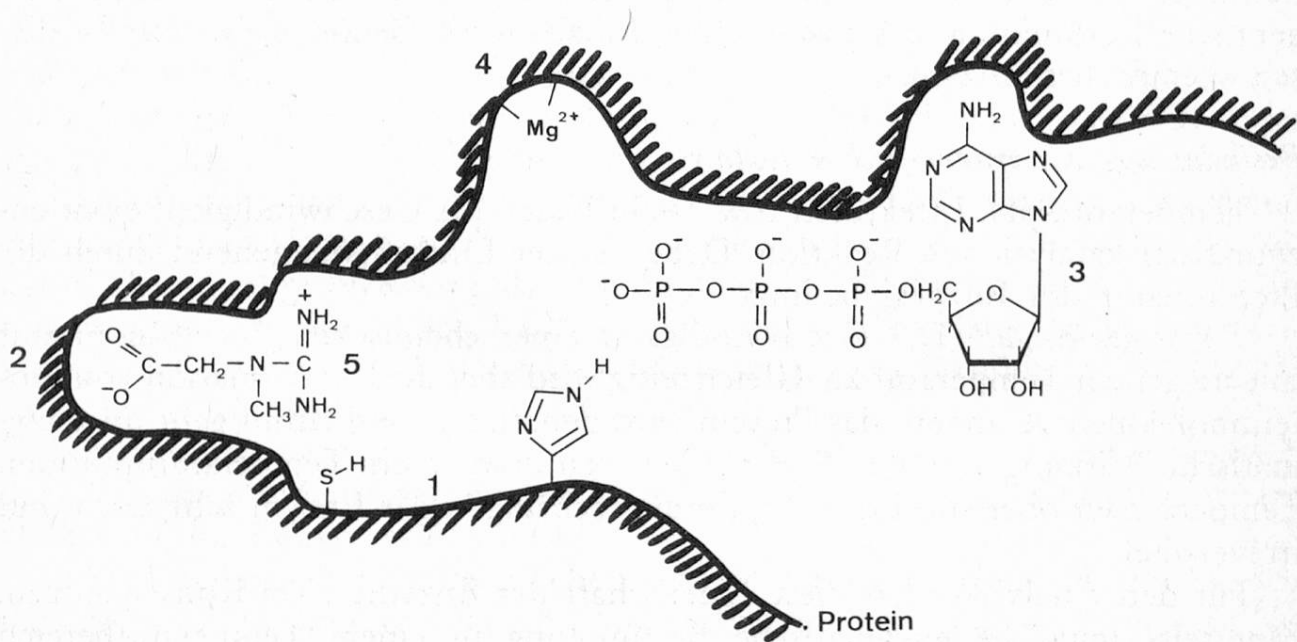


Abb. 1. Aktives Zentrum der Kreatinkinase

- |  |                          |
|--|--------------------------|
| 1 Katalytisches Zentrum (Cystein-, Histidinrest) | 4 Cofaktor ( $Mg^{2+}$ ) |
| 2 Bindungszentrum                                | 5 Substrat (Kreatin)     |
| 3 Cosubstrat (ATP)                               |                          |

Das aktive Zentrum ist in einer dreidimensionalen Einheit (Tasche, Hohlraum) lokalisiert und besteht aus dem *katalytischen Zentrum* und dem *Bindungszentrum*.

## *Spezifität von Enzymen*

Die Anordnung der Aminosäurereste im aktiven Zentrum ergibt das herausragendste Merkmal der enzymatischen Katalyse, die Spezifität von Enzymen. Dabei ist die *Wirkungsspezifität* im katalytischen Zentrum, die *Substratspezifität* im Bindungszentrum lokalisiert. Die Wirkungsspezifität eines Enzyms legt den zu katalysierenden Reaktionstyp fest. So beschleunigen Hydrolasen die hydrolytische Spaltung von Substraten (z. B. Proteasen), Phosphorylasen die Übertragung von Phosphorsäuregruppen (z. B. Hexokinase) und Oxidoreduktasen katalysieren Oxidations- bzw. Reduktionsvorgänge (z. B. Malat-Dehydrogenase). In bezug auf die Substratspezifität lassen sich 4 Gruppen von Enzymen unterscheiden. Absolut substratspezifische Enzyme (z. B. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) katalysieren die Umsetzung eines einzigen Substrates, stereospezifische Enzyme (z. B. L-Lactat-Dehydrogenase) sind für die entsprechenden Stereoisomere absolut spezifisch. Die gruppenspezifischen Enzyme (z. B.  $\alpha$ -Glucosidase) erkennen in verschiedenen Molekülen eine gemeinsame Gruppe (z. B. die  $\alpha$ -glucosidische Bindung) und setzen diese um. Schließlich sind noch die unspezifischen Enzyme zu erwähnen, welche verschiedene Substrate erkennen und umsetzen können (z. B. Xanthin-Aldehyd-Oxidase). Bei der enzymatischen Bestimmung von Lebensmittelinhaltsstoffen können nur absolut- oder stereospezifische Enzyme eingesetzt werden. Sowohl gruppenspezifische als auch unspezifische Enzyme können zwar im Verlaufe der Reaktion als Hilfsenzyme verwendet werden, die eigentliche Bestimmung des gewünschten Inhaltsstoffes benötigt aber ein für diesen spezifisches Enzym.

## *Beeinflussung der enzymatischen Katalyse*

Temperatur, pH, Effektoren usw. beeinflussen die Geschwindigkeit einer enzymatisch katalysierten Reaktion. Dabei ist der Einfluß weitgehend durch die Proteinnatur des Enzyms bedingt.

*Temperatureinfluß:* Die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion nimmt mit steigender Temperatur zu. Gleichzeitig wird aber die Konformation von Proteinmolekülen verändert, das Protein wird denaturiert und damit geht die enzymatische Wirkung verloren. Enzyme besitzen deshalb ein Temperaturoptimum. Temperaturen oberhalb dieses Optimums schädigen das Enzym sehr rasch und irreversibel.

Für den Analytiker hat diese Eigenschaft der Enzyme zwei Konsequenzen. Einerseits muß die enzymatische Bestimmung in einem Temperaturbereich durchgeführt werden, in welchem das Enzym möglichst aktiv ist (meist Zimmertemperatur bis 37 °C), andererseits müssen die zur Bestimmung benötigten Enzyme stets in der Kühle aufbewahrt werden, damit sie ihre Aktivität nicht verlieren.

*pH-Einfluß:* pH-Veränderungen beeinflussen den Ladungszustand des Enzymmoleküls und damit die Aktivität des Enzyms. Dabei ist zu beachten, daß kleine Abweichungen vom pH-Optimum reversibel sind, während bei größeren Abweichungen eine irreversible Schädigung des Enzyms durch Entfalten des Proteins

entstehen kann. Damit kurze Analysenzeiten erreicht werden können, muß der pH der Probelösung dem pH-Optimum des einzusetzenden Enzyms angepaßt werden.

*Einfluß von Effektoren:* *Aktivatoren* können auf zwei Arten die enzymatische Reaktion beeinflussen. Einerseits stabilisieren sie die optimale Enzym- bzw. Substratkonformation, andererseits zeigen sie antagonistische Wirkung gegenüber Hemmstoffen. Bei den Aktivatoren handelt es sich meist um anorganische Ionen. *Inhibitoren* können Enzyme irreversibel oder reversibel schädigen. Bei der irreversiblen Hemmung wird ein Inhibitor kovalent an die Wirkgruppe im katalytischen Zentrum gebunden. Reversible Inhibition kann entweder kompetitiv oder nicht-kompetitiv erfolgen. Kompetitive Inhibitoren treten am Bindungszentrum mit den Substratmolekülen in Konkurrenz, dadurch verdrängen sie das Substrat, und die Affinität des Enzymes für sein Substrat wird herabgesetzt. Nicht-kompetitive Inhibitoren setzen die maximale Geschwindigkeit einer enzymatisch katalysierten Reaktion herab, indem sie einen nicht umsetzbaren Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex ausbilden. Inhibitoren können bei enzymatischen Bestimmungen zu Störungen führen. Die meisten Inhibitorwirkungen lassen sich aber durch geeignete Probenvorbereitung auf ein vernachlässigbar kleines Minimum reduzieren.

### *Aktivität von Enzymen*

Die Wirksamkeit eines Enzymes hängt vom Grad seiner Aktivität ab, welche in *Enzymeinheiten* gemessen wird. Eine Einheit (U, vom engl. unit) entspricht der Enzymaktivität, welche die Umwandlung von  $1\mu$  Mol Substrat pro Minute unter standardisierten Versuchsbedingungen (pH, Temperatur, Puffersalz) katalysiert. Die spezifische Aktivität eines Enzyms ist aus dieser Definition abgeleitet und gibt die Anzahl U pro mg Protein an. Seit Einführung des «Système International» (S. I.) im Jahre 1978 wird als neue Einheit das Katal (kat) als Meßgröße für Enzymaktivitäten verwendet. 1 kat ist gleich der katalytischen Menge eines Enzyms, welche der Umwandlung von 1 Mol Substrat pro Sekunde entspricht. 1 U ist somit 16,67 nkat äquivalent.

Für routinemäßige Bestimmungen von Inhaltsstoffen ist es wünschenswert, den Zeitfaktor möglichst klein zu halten. Es wird deshalb immer mit einem Überschuß an Enzym gearbeitet.

Viele Enzyme beschleunigen neben der Umsetzung des Hauptsubstrates auch die Umwandlung anderer Substrate. Solche Enzyme zeigen eine sogenannte *Nebenaktivität*, welche auch durch Nachreinigen des Enzyms nicht entfernt werden kann. Enzympräparate, welche mit anderen Enzymen verunreinigt sind, enthalten *Fremdaktivitäten*. Sowohl Neben- als auch Fremdaktivitäten können eine Reaktion stören, sofern die dazu notwendigen Substrate im Bestimmungsansatz ebenfalls vorliegen, und verursachen sogenannte «Schleichreaktionen». Diese überlagerten Nebenreaktionen lassen sich bei enzymatischen Bestimmungen rechnerisch oder graphisch eliminieren (9, 14).



## Die enzymatische Reaktion

Die enzymatische Katalyse kann auf zwei Arten erfolgen:

- nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip, bei dem das Substrat in die durch das aktive Zentrum gebildete Tasche passen muß (starre Enzymkonformation);
- nach induzierter Anpassung der Konformation des Enzyms, wobei das Substrat vom Bindungszentrum erkannt und das Enzym durch Änderung der Konformation am aktiven Zentrum wirksam wird (flexible Enzymkonformation).

In beiden Fällen verläuft die Katalyse über einen Enzymsubstrat-Komplex (ES), wo die eigentliche Reaktion stattfindet.



Abbildung 2 zeigt schematisch den Verlauf einer enzymatischen Katalyse nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip.

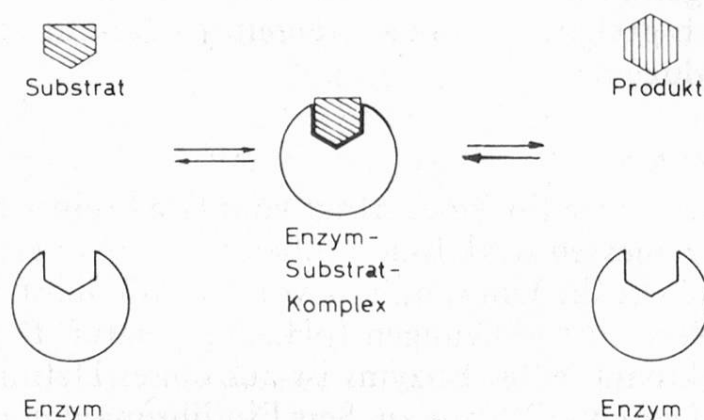


Abb. 2. Ablauf einer enzymatischen Reaktion nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip

Enzymatisch katalysierte Reaktionen verlaufen stöchiometrisch.  
Für die Reaktion



Substrat + Coenzym  $\rightleftharpoons$  Produkt + Coenzym'

gilt:

$$K = \frac{[C] \cdot [D]}{[A] \cdot [B]}$$

Soll die Konzentration des Ausgangsstoffes  $A$  bestimmt werden, so muß die Umsetzung quantitativ erfolgen. Dazu muß das Gleichgewicht in die gewünschte Richtung verschoben werden können. Die Lage des Gleichgewichtes kann ganz allgemein durch Änderung der Konzentration der Ausgangs- oder der Endprodukte beeinflusst werden. Die Erhöhung der Konzentration des Reaktions-

partners *B* (Coenzym) oder die Entfernung des Endproduktes *C* oder *D* durch eine Hilfsreaktion erlaubt die quantitative Umsetzung und damit die Erfassung des Ausgangsstoffes *A*.

### Der enzymatische Test

Grundsätzlich werden enzymatische Bestimmungen mit Hilfe eines optischen Tests durchgeführt, es wird also ein lichtabsorbierender Reaktionspartner eingesetzt, um die gewünschte Substanz zu bestimmen. Dazu stehen 2 Möglichkeiten zur Verfügung, der UV-Test und der Farbttest.

Beim *UV-Test* macht man sich die Eigenschaft der als Reaktionspartner eingesetzten Coenzyme NAD(P) bzw. NAD(P)H zunutze, welche sich, wie Abbildung 3 zeigt, bezüglich Lichtabsorption im nahen UV-Bereich in ihrer oxidierten bzw. reduzierten Form unterscheiden.

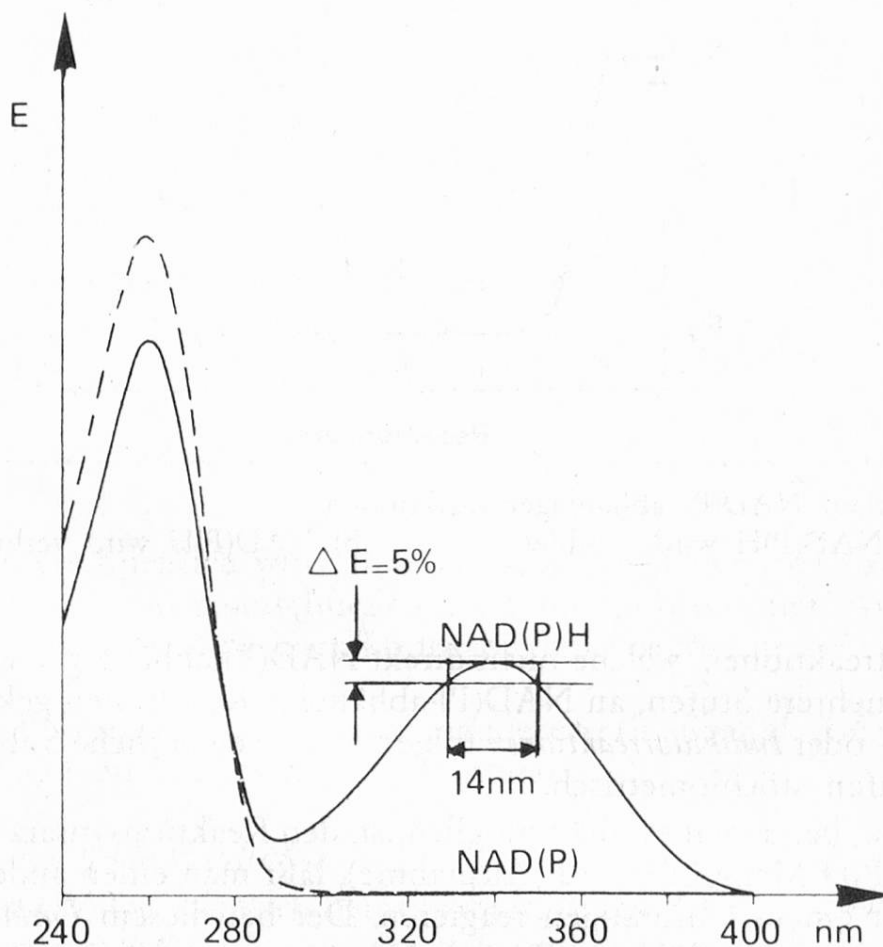


Abb. 3. Absorptionsspektrum von NAD(P) und NAD(P)H

Die auftretenden Extinktionsänderungen dienen dabei als Meßgröße. Umsetzungen, bei denen NAD(P)H gebildet wird, zeigen eine Zunahme der Extinktion (Abb. 4, Kurve a), Reaktionen, bei denen NAD(P)H verbraucht wird, zeichnen sich durch eine Abnahme der Extinktion aus (Abb. 4, Kurve b).

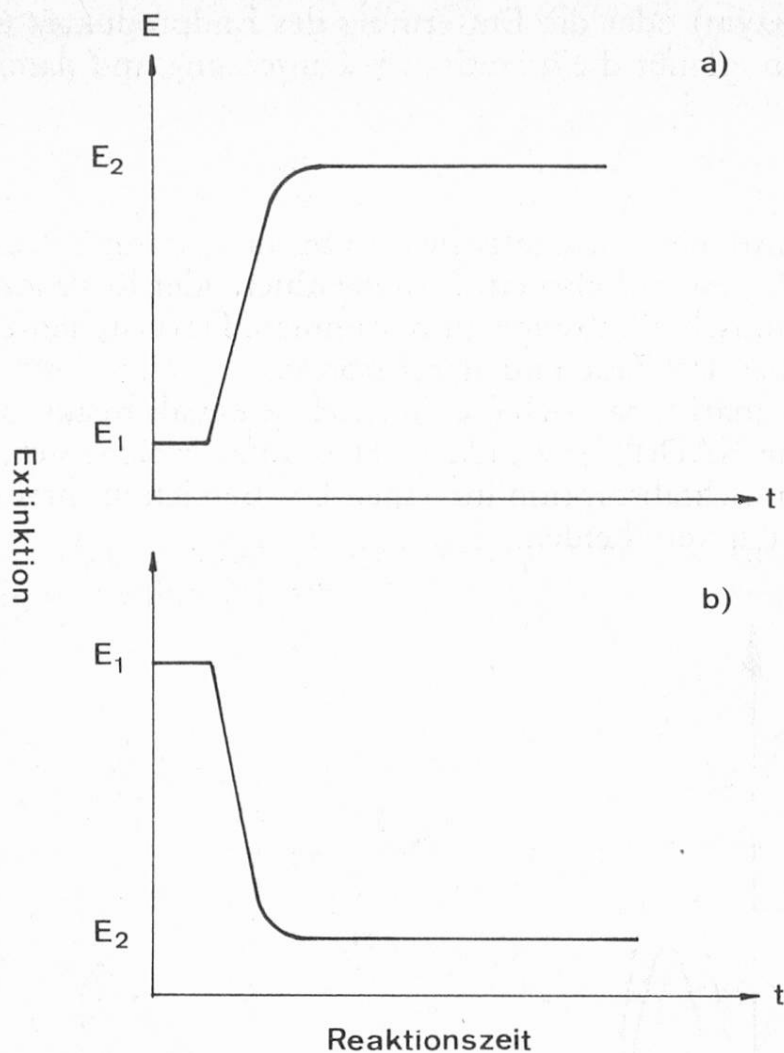


Abb. 4. Verlauf NAD(P) abhängiger Reaktionen  
 a) NAD(P)H wird gebildet                      b) NAD(P)H wird verbraucht

Substratreaktionen, welche nicht direkt NAD(P)-abhängig sind, können, zum Teil über mehrere Stufen, an NAD(P)-abhängige Reaktionen gekoppelt werden. Diese *Hilfs-* oder *Indikatorreaktionen* folgen auf die eigentliche Substratumsetzung und verlaufen stöchiometrisch.

In Fällen, bei denen es nicht möglich ist, den Reaktionsansatz so zu gestalten, daß NAD(P)H Meßgröße wird (Ausnahme), läßt man einen anderen Reaktionspartner mit einem Chromogen reagieren. Der bei diesem *Farbtest* entstehende Farbstoff wird im sichtbaren Bereich bei geeigneter Wellenlänge gemessen.

In Tabelle 2 sind einige Beispiele enzymatischer Bestimmungen aufgeführt.

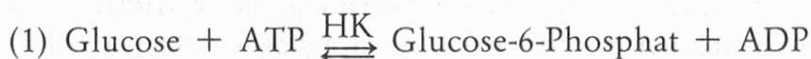
Bei der Bestimmung von L-Lactat folgt auf die spezifische Indikatorreaktion, bei der NADH gebildet wird (Abb. 4, Kurve a), eine Hilfsreaktion, die es erlaubt, die Lage des Gleichgewichtes der Reaktion 1 nach rechts zu verschieben; dadurch wird L-Lactat vollständig umgesetzt. Glucose wird zunächst mit einer Hilfsreaktion zu Glucose-6-Phosphat umgesetzt, bei der anschließenden spezifischen Indikatorreaktion wird NADPH gebildet (Abb. 4, Kurve a). Bei der Bestimmung

Tabelle 2. Beispiele enzymatischer Substratbestimmungen

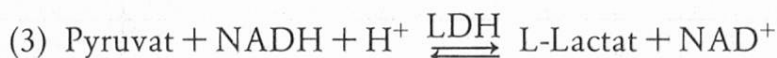
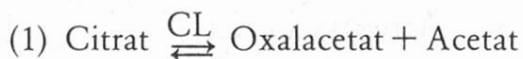
– Bestimmung von L-Lactat:



– Bestimmung von Glucose:



– Bestimmung von Citronensäure:



der Citronensäure schließlich wird diese zunächst mit einer spezifischen Hilfsreaktion gespalten, bei den anschließenden Indikatorreaktionen wird NADH verbraucht, es wird daher eine Extinktionsabnahme beobachtet (Abb. 4, Kurve b).

In allen drei Beispielen ist die Coenzymänderung (meßbar als  $\Delta E$ ) proportional zur Menge der zu bestimmenden Substanz.

#### Berechnung der Substratkonzentration

Sowohl beim UV-Test als auch beim Farbttest bildet das *Beer-Lambert'sche Gesetz* die Grundlage zur Berechnung der Substratkonzentration.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d, \text{ und damit } c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d}$$

wobei  $E$  = Extinktion

$c$  = Substratkonzentration

$\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient der Meßgröße

$d$  = Schichtdicke der Küvetten in cm

Bei der Anwendung dieses Gesetzes muß insbesondere darauf geachtet werden, daß es sich um ein Grenzesetz für niedere Konzentrationen handelt: die lineare Abhängigkeit zwischen  $E$  und  $c$  der Meßgröße ist nur für Konzentrationen bis ca. 10 mmol/l erfüllt. Diese Tatsache erweist sich bei enzymatischen Analysen oft als Nachteil, weil durch die notwendigen großen Verdünnungen eine nicht zu unterschätzende Fehlerquelle in die Analyse eingeschleust wird.

Beim UV-Test erfolgt die Berechnung der Substratkonzentration über den molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  von NAD(P)H, der für die Wellenlängen 340 nm (Messungen mit Spektralphotometern) und 334 nm bzw. 365 nm (Messungen mit Spektrallinien-Filterphotometern) sehr genau bekannt ist.

Beim Farbttest hingegen muß eine Bezugssubstanz (Standard) beigezogen werden, weil das  $\epsilon$  der bei der Reaktion gebildeten Farbkomplexe nicht bekannt ist und/oder diese außerdem Intensitätsschwankungen unterworfen sind.

### *Durchführung der enzymatischen Bestimmung*

Tabelle 3 zeigt ein allgemeines Arbeitsschema für die Durchführung enzymatischer Substratbestimmungen.

*Tabelle 3.* Allgemeines Arbeitsschema

In Küvetten pipettieren	Leerwert (ml)	Probe (ml)
Puffer, Salze	1,00	1,00
Coenzym(e)	0,10	0,10
Wasser	2,00	1,90
Probelösung	—	0,10
Hilfsenzym(e)	0,01	0,01
Mischen, Extinktionen $E_1$ messen, Reaktion starten durch Zugabe von		
Startenzym	0,01	0,01
Nach Ablauf der Reaktion Extinktionen $E_2$ messen		

Grundsätzlich ist zu bemerken, daß Enzymatik einen geringen apparativen Aufwand erfordert. Saubere Reagenzien (Enzyme, Coenzyme, Puffersalze), eine Handvoll Pipetten, mit denen auch kleine Volumina sehr genau dosiert werden können, und Photometer, welche im Bereich von 0–2  $E$  genau arbeiten, genügen, um gute Analysen durchzuführen. Selbstverständlich muß die Laborausüstung geeicht und von Zeit zu Zeit überprüft werden. Es sprengt den Rahmen dieser

Einführung, auf Einzelheiten einzugehen, ein Hinweis auf das LMB (Kapitel 61, Abschnitt 3) und auf eine Veröffentlichung von *Walter* (15) seien an dieser Stelle gestattet.

### *Anwendung der Enzymatik in der Lebensmittelanalyse*

Es gibt verschiedene Gründe, enzymatische Methoden bei der Untersuchung von Lebensmitteln einzusetzen. In der Lebensmittelindustrie eignen sich diese Methoden, um Rohstoff-, Prozeß- oder Produktkontrollen einerseits, Lager- und Stabilitätsprüfungen andererseits durchzuführen. Die hohe Spezifität der enzymatischen Reaktionen macht diese Analysenart besonders dann wertvoll, wenn Inhaltsstoffe von Lebensmitteln selektiv quantitativ bestimmt werden sollen. Die Methoden werden deshalb auch in Forschung und Entwicklung sowie bei der amtlichen Kontrolle eingesetzt. Neben der ausgesprochenen Spezifität zeichnen sich enzymatische Bestimmungsmethoden aus durch einen geringen Probenbedarf, gute Reproduzierbarkeit, hohe Empfindlichkeit und geringen Zeitbedarf (9). In einer kürzlich erschienenen Arbeit beschreiben *Gombocz et al.* (16) den Einsatz von Analysenautomaten zur Bestimmung verschiedenster Inhaltsstoffe, was zu einer wesentlichen Verbesserung der Genauigkeit der Methoden führte.

Als Probenmaterial eignen sich im Prinzip alle Lebensmittel (flüssig bis fest), wobei zur Zeit Untersuchungen von Fruchtsäften, Milch und Milchprodukten, Wein und Zuckerwaren als hauptsächliche Anwendungsgebiete genannt werden können. Der Probenvorbereitung muß größte Beachtung geschenkt werden. Weil photometrisch gearbeitet wird, müssen Farbstoffe, Trubstoffe usw. aus der Probe entfernt werden, die zu bestimmende Substanz muß als wässriger Extrakt in klarer und möglichst farbloser Lösung vorliegen. Eine ausführliche Beschreibung der bei der Probenvorbereitung zu beachtenden Punkte findet sich in einer Arbeit von *Kobler* (14) sowie im LMB (Kapitel 61, Abschnitt 3.4.), es darf deshalb hier auf eine eingehendere Besprechung dieses Punktes verzichtet werden.

Es ist klar, daß nur solche Substanzen bestimmbar sind, welche enzymatisch umgesetzt werden können und für welche ein spezifisches Enzym in genügend reiner Qualität im Handel erhältlich ist. Für eine Reihe von Inhaltsstoffen (Tabelle 4) stehen dem Lebensmittelanalytiker Arbeitsanleitungen zur Verfügung, welche routinemäßige Bestimmungen ermöglichen (8).

Ins LMB wurden bisher nur Methoden aufgenommen, welche innerhalb der Subkommission «Enzymatische Bestimmungen» durch Ringversuche an verschiedenen Lebensmitteln überprüft, abgesichert und falls notwendig angepaßt wurden (Substrate in der Tabelle 4 mit einem \* bezeichnet). Weitere Bestimmungsmethoden werden überprüft und zu einem späteren Zeitpunkt für das LMB freigegeben. Für eine Vielzahl von Substraten hat *Bergmeyer* (10) Anleitungen veröffentlicht, die aber den Nachteil haben, daß die für die Bestimmung notwendigen Enzyme selbst isoliert und gereinigt werden müssen. Dies ist mit einem großen Arbeitsaufwand verbunden, eine routinemäßige Anwendung dieser Methoden ist nicht möglich.

Tabelle 4. Arbeitsanleitungen für enzymatische Bestimmungen von Lebensmittelinhaltsstoffen (9)

Zucker	Alkohole
Fructose * Galaktose * Glucose * Lactose * Maltose Mannose Raffinose Saccharose Stärke	Ethanol * Cholesterin Dihydroxyaceton Glycerin Sorbit Xylit
Organische Säuren	Verschiedenes
Ameisensäure Äpfelsäure Ascorbinsäure Asparaginsäure Bernsteinsäure Brenztraubensäure Citronensäure * Essigsäure Gluconsäure Glutaminsäure * Isocitronensäure * L-, D-Milchsäure * Oxalsäure	Acetaldehyd Ammoniak Asparagin Creatin * Creatinin * Guanodin-5'-Phosphat Harnstoff Lecithin Pyrophosphat Triglyceride

Neben den enzymatischen Methoden stehen dem Analytiker verschiedene andere Möglichkeiten offen, um Inhaltsstoffe von Lebensmitteln quantitativ zu bestimmen. Chemische und in jüngerer Zeit vermehrt instrumentelle Methoden wie Dünnschicht-, Gas- und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (DC, GC und HPLC) stehen in «Konkurrenz» zur hier vorgestellten Enzymatik. Ein Vergleich der verschiedenen Analysenverfahren drängt sich auf, im folgenden soll deshalb anhand von 2 Beispielen auf die Problematik der Methodenwahl kurz hingewiesen werden.

#### Zuckerbestimmungen

Für die Bestimmung von Zuckern in Lebensmitteln werden verschiedene Verfahren vorgeschlagen. Die klassischen Methoden nach *Fehling* (17), *Luff-Schoorl* (18) und *Potterat-Eschmann* (19) beruhen auf reduktometrischen Messungen und liefern, wie *Zürcher* und *Hadorn* (20, 21) eindrücklich zeigten, in vielen

Fällen falsche Werte, bedingt durch die fehlende Spezifität. Trotzdem finden sich diese Methoden auch heute noch in amtlichen Methodensammlungen und werden häufig angewendet. Vergleichende Untersuchungen zwischen den instrumentellen (DC, GC und HPLC) und enzymatischen Methoden wurden von *Ugrinovits* (22) veröffentlicht. Tabelle 5, welche dieser Arbeit entnommen ist, zeigt die für die Durchführung der verschiedenen Methoden benötigten Arbeitsschritte.

Tabelle 5. Analysengang verschiedener Methoden (22)

	GC	DC	HPLC	Enzymatik
Isolieren	+	+	+	+
Trocknen	+			
Derivat	++			
Trennen	+	+++	+	
Anfärben		+		
Messen	+	+	+	+
Eichen	+	+	+	
Berechnen	+	+	+	+

+ entspricht einem Arbeitsschritt

Es fällt auf, daß die Enzymatik mit Abstand den geringsten Arbeitsaufwand erfordert. Es wäre nun aber falsch, den Schluß zu ziehen, Enzymatik sei allgemein für Zuckerbestimmungen die Methode der Wahl. Während bei den instrumentellen Analysen in einem Durchgang gleichzeitig mehrere Zucker bestimmt werden können, erlaubt die Enzymatik in der Regel «nur» die Bestimmung eines Zuckers pro Analyse. Die Quantifizierung von oligomeren Zuckern (Beispiel Stärkesirup) oder von Zuckern, für welche keine Enzyme zur Verfügung stehen, ist mit Hilfe der Enzymatik nicht möglich. Die dem Analytiker vorgelegte Problemstellung entscheidet also, mit welcher Methode gearbeitet werden muß. Es soll an dieser Stelle ganz klar hervorgehoben werden, daß Zuckeranalytik mit Hilfe von Enzymen nicht universell durchführbar ist, bei der Bestimmung von einzelnen Zuckern hingegen (z. B. Glucose/Fructose in Wein) die Enzymatik einfach und rasch zum Ziele führen kann.

### *Citronensäurebestimmung*

Zur Bestimmung von Citronensäure in Fruchtsäften stehen neben der *Rebelein-* (23) eine HPLC- und eine enzymatische Methode zur Verfügung. Versuche im eigenen Labor, welche mit analytisch nicht besonders geübten Studenten durchgeführt wurden, sollten aufzeigen, welche der 3 Methoden bei möglichst kleinem Arbeitsaufwand die besten Resultate ergibt.



Tabelle 6. Bestimmung von Citronensäure in Orangensaft

	Rebelein-Methode	HPLC	Enzymatik
Anzahl Bestimmungen	16	16	16
Resultate g/l	11,2	10,6	10,5
Variationskoeffizient	3,5	2,4	1,1
Arbeitsaufwand (Enzymatik = 1)	7	1,5	1

Aus Tabelle 6 wird deutlich, daß die chemische den beiden anderen Methoden unterlegen ist. Die erzielten Werte sind zu hoch, der Variationskoeffizient und der zeitliche Aufwand sind zu groß. HPLC und Enzymatik liefern gut vergleichbare Resultate, es muß aber auch hier bemerkt werden, daß mit der chromatographischen Trennmethode neben der Citronensäure auch andere organische Säuren im gleichen Arbeitsgang bestimmt werden können. Die erzielten Resultate verdeutlichen aber gleichzeitig, daß Enzymatik auch von ungeübten Arbeitskräften einfach zu handhaben ist, was sich im sehr niedrigen Variationskoeffizienten ausdrückt.

Die beiden Beispiele sollten aufzeigen, daß sich enzymatische Analysen hervorragend für die spezifische Bestimmung von Inhaltsstoffen eignen, daß ihnen aber bei der Analyse von Gemischen doch gewisse Grenzen gesetzt sind.

Die Bedeutung der enzymatischen Lebensmittelanalytik zeigt sich in deren Aufnahme in amtliche Methodensammlungen. Wie Tabelle 7 zeigt, sind in vielen europäischen Ländern einzelne Bestimmungen amtlich akzeptiert.

Tabelle 7. Enzymatik als amtliche Methode

Land	akzeptiert		
	voll	teilweise	noch nicht
Belgien		x	
BR Deutschland		x	
Dänemark			x
England		x	
Finnland			x
Frankreich		x	
Italien		x	
Japan			x
Niederlande		x	
Schweden		x	
Spanien			x
USA			x
Schweiz	x		

Gemäß Auskunft Fa. Boehringer Mannheim GmbH

So gibt es beispielsweise «Normes françaises» für Glucose, Fructose, Saccharose sowie Citronen- und Isocitronensäure. In der Schweiz sind die Methoden grundsätzlich voll akzeptiert, Arbeitsanleitungen werden aber erst nach Überprüfung in Ringversuchen für das LMB freigegeben. Auch verschiedene internationale Analysenkommissionen empfehlen enzymatische Methoden, so z. B. die IFU (Internationale Fruchtsaftunion), die eine enzymatische Bestimmung von Äpfelsäure, Ethanol und Milchsäure vorschlägt, oder die OIV (Internationales Weinamt, Paris), welche für die Milchsäurebestimmung die enzymatische Methode empfiehlt.

### **Bestimmung von «enzymstummen» Inhaltsstoffen mit Enzym-Immuno-Reaktionen**

Die aus der Biochemie und der klinischen Chemie hervorgegangene Methode des Enzym-Immuno-Assays (EIA) eröffnet der enzymatischen Lebensmittelanalytik neue Dimensionen, lassen sich doch nach diesem Prinzip auch Substanzen, für welche keine Enzyme vorkommen, enzymatisch bestimmen (24). Diese Arbeitstechnik beruht auf Antikörper-Antigen-Reaktionen und soll anhand eines Beispiels, der Bestimmung von Limonin, erläutert werden. *Mansell* und *Weiler* (25) stellten vor kurzem eine EIA-Methode für die Bestimmung dieses Bitterstoffes von Citrusfrüchten vor, mit deren Hilfe diese Substanz in Nanogramm-Mengen quantitativ erfaßt werden kann. Dabei werden einerseits durch Injektion von an Rinderserumalbumin gebundenem Limonin in Kaninchen Antikörper erzeugt, welche dann aus der Immunglobulin-G-Fraktion des Serums isoliert werden. Diese Antikörper werden chemisch an eine Kunststoffküvette gebunden. Andererseits wird das zu bestimmende Limonin so an Meerrettichperoxidase gebunden, daß die katalytische Aktivität des Enzyms erhalten bleibt. Eine bekannte Menge dieses markierten Antigens (Tracer-Antigen) wird im Testansatz mit dem zu untersuchenden Citrusaft, welcher das Antigen Limonin enthält, in mit Antikörpern belegten Küvetten reagieren gelassen. Nach kurzer Inkubationszeit, während welcher Tracer-Antigen und Limonin um die Antikörper-Bindungsstellen konkurrieren, wird die Lösung dekantiert und die Küvette gut mit Puffer gewaschen. Mit Hilfe einer Farbreaktion (4-Amino-Antipyrin) wird schließlich die Aktivität des an Antikörper gebundenen Tracer-Antigens (Peroxidase) gemessen. Die Menge an Antikörper gebundenes Enzym ist umgekehrt proportional der Menge Limonin im Saft, und so kann der Aktivitätstest direkt zur quantitativen Berechnung des Limonins herangezogen werden.

Zur Zeit stehen ungefähr 50 verschiedene Antikörper-Antigen-Systeme zur spezifischen Bestimmung von pflanzlichen Inhaltsstoffen zur Verfügung (26). Leider sind aber solche Analysen noch nicht routinemäßig einsetzbar, weil die für den Test benötigten Antikörper und Tracer-Antigene selbst hergestellt werden müssen. Es ist aber vorauszusehen, daß in den kommenden Jahren an Küvetten gebundene Antikörper und auch Tracer-Antigene im Handel erhältlich sein werden und damit der enzymatischen Analyse ein bisher nicht erschlossenes Gebiet eröffnet wird.

## Schluß

In der vorliegenden Übersicht wurde versucht, einerseits die Grundlagen der enzymatischen Analyse, andererseits deren Möglichkeiten und Grenzen aufzuzeigen. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Enzymatik mit Sicherheit eine Bereicherung des analytischen Instrumentariums des Lebensmittelchemikers darstellt. Für den Einsatz der Enzymatik sprechen vor allem die hohe Spezifität der Methode, die hohe Empfindlichkeit und gute Reproduzierbarkeit sowie auch der geringe Arbeitsaufwand (sowohl apparativ als auch zeitlich). Limitierend fällt ins Gewicht, daß mit Hilfe von Enzymen routinemäßig nur Substanzen bestimmt werden können, für welche die Enzyme käuflich sind. Die Weiterentwicklung der EIA-Technik wird der Enzymatik neue Möglichkeiten eröffnen und ein sehr breites Spektrum von Substanzen bestimmbar machen. Ob aber enzymatische Analytik eingesetzt werden soll oder nicht, hängt letztlich vom Analytiker ab, der die Wahl der Analysenmethode in jedem Falle seiner Problemstellung anpassen muß.

## Dank

Den Herren Dr. *G. Henniger*, Tutzing (BRD), und *H. R. Steffen*, Rotkreuz, danke ich für die Überlassung einer umfangreichen Dokumentation.

## Zusammenfassung

Enzymatische Lebensmittelanalytik umfaßt die drei Teilgebiete Bestimmung von Enzymaktivitäten, Bestimmung von Inhaltsstoffen mit Hilfe reiner Enzyme und Enzym-Immuno-Reaktionen, welche die Bestimmung «enzymstummer» Inhaltsstoffe erlauben. Die vorliegende Übersicht gibt einen Einblick in diese 3 Analysenmethoden. Besonderes Gewicht wird auf die Grundlagen der Enzymologie einerseits und die Bestimmung von Inhaltsstoffen mit Hilfe reiner Enzyme andererseits gelegt. Möglichkeiten, Grenzen und Bedeutung der enzymatischen Lebensmittelanalytik werden umrissen.

## Résumé

Les méthodes enzymatiques utilisées en sciences alimentaires comprennent les 3 catégories suivantes: détermination de l'activité enzymatique, dosage de substances à l'aide d'enzymes purs et enfin dosage immuno-enzymatique de substances ne pouvant pas réagir directement avec un enzyme. La présente revue décrit brièvement ces 3 aspects de l'analyse enzymatique appliqués aux denrées alimentaires. Une attention particulière a été accordée aux possibilités, limites et importance du dosage des différents composants d'un aliment à l'aide d'enzymes purs.

## Summary

Enzymatic methods employed in food analysis can be divided into 3 different groups: determination of enzyme activities, determination of food components with the aid of pure enzymes and enzyme-immuno-assays for substances which cannot be determined directly by enzyme assays. The present review describes briefly the different aspects of enzymatic food analysis. Special emphasis is given to the present state of the possibilities, the limitations and the importance of determinations of food components by pure enzymes.

## Literatur

1. *Sommer, H.*: Nachweis und Kennzeichnung von Enzymwirkungen. In: Schormüller, J., Handbuch der Lebensmittelchemie Bd. II/2. Teil, S. 232–320, Springer Verlag, Berlin 1967.
2. *Bergmeyer H. U.*: Grundlagen der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim 1977.
3. *Warburg, O., Christian, W. und Griese, A.*: Wasserstoffübertragendes Co-Ferment, seine Zusammensetzung und Wirkungsweise. *Biochem. Z.* **282**, 157–205 (1935).
4. *Schormüller, J.*: Die Bedeutung der enzymatischen Analyse in der Lebensmittelchemie. In: Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Aufl. Bd. I, S. 75–86 (Bergmeyer H. U. ed.). Verlag Chemie, Weinheim 1974.
5. *Mayer, K. und Busch, I.*: Über eine enzymatische Äpfelsäurebestimmung in Wein und Traubensaft. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **54**, 60–65 (1963).
6. *Tanner, H. und Brunner, E. M.*: Zur Bestimmung des in alkoholfreien Getränken und in Aromadistillaten enthaltenen Äthylalkohols. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **55**, 480–487 (1964).
7. *Mayer, K. und Pause, G.*: Eine enzymatische Citronensäure-Bestimmung. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **56**, 454–458 (1965).
8. Boehringer (Mannheim): Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalytik. Mannheim 1980.
9. *Henniger, G.*: Enzymatische Lebensmittelanalytik, *ZFL* **30**, 137–144, 182–185 (1979).
10. *Bergmeyer, H. U.*: Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Aufl. Bände I und II. Verlag Chemie, Weinheim 1974.
11. Schweiz. Lebensmittelbuch, Kapitel 61 B, Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1981.
12. *Amadó, R.*: Grundlagen der Enzymatik – der enzymatische Test. *Alimenta* **19**, 151–154 (1980).
13. *Stryer, L.*: Biochemistry. Freeman, W. H. & Comp., San Francisco 1975.
14. *Kohler, P.*: Probenvorbereitung – Überprüfung des Testansatzes. *Alimenta* **20**, 3–6 (1981).
15. *Walter, E.*: Die Prüfung der Laborausstattung für enzymatische Bestimmungen. *Alimenta* **19**, 159–164 (1980).
16. *Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. und Petuely, F.*: Über die erzielbare Genauigkeit von enzymatischen Analysenverfahren bei Lebensmitteln; Einsatz eines Zentrifugalanalysators als Analysenautomat. *Deut. Lebensm. Rundschau* **77**, 1–26 (1981).
17. Zuckerbestimmung nach Fehling, siehe Schweiz. Lebensmittelbuch, 5. Aufl. 1. Band, S. 565–567. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1964.

18. Internationale Fruchtsaft-Union (IFU): Analysen. Nr. 4, Bestimmung der Zucker nach Luff-Schoorl. Juris Verlag, Zürich 1962.
19. *Potterat, M. et Eschmann, H.*: Application des complexes au dosage des sucres. *Trav. chim. aliment. hyg.* **45**, 312–331 (1954).
20. *Zürcher, K. und Hadorn, H.*: Vergleichende Zuckerbestimmungen mit gaschromatographischen, enzymatischen und reduktometrischen Methoden, *Deut. Lebensm. Rundschau* **72**, 197–202 (1976).
21. *Zürcher, K. und Hadorn, H.*: Vergleichende Zuckerbestimmungen an Kraftnährmitteln und Frühstücksgetränken. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **67**, 379–388 (1976).
22. *Ugrinovits, M.*: Möglichkeiten und Grenzen der enzymatischen Lebensmittelanalyse. *Alimenta* **19**, 155–159 (1980).
23. *Rebelein, H.*: Vereinfachtes Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung der Citronensäure in Wein und Traubensaft. *Deut. Lebensm. Rundschau* **63**, 337–340 (1967).
24. *Van Weemen, B. K. und Schuur, A. H. W. M.*: Prinzip des Enzym-Immunoassay. In: *Grundlagen der enzymatischen Analyse* S. 96–101. (Bergmeyer, H. U. Ed.). Verlag Chemie, Weinheim 1977.
25. *Mansell, R. L. and Weiler, E. W.*: Immunological tests for the evaluation of citrus quality. *ACS Symp. Ser.* **143**, 341–359 (1980).
26. *Mansell, R. L.*: persönliche Mitteilung (1981).

Dr. R. Amadò  
 Institut für Lebensmittelwissenschaft  
 Eidgenössische Technische Hochschule  
 ETH-Zentrum  
 CH-8092 Zürich