

A tej piruvát és laktát tartalmának meghatározása „Contiflo” automatikus analizátorral

ÖRSI FERENC* – BARNÁ ÉVA**

Érkezett: 1980. június 21.

A tej értékes élelmiszer, amelynek minőségét a kémiai jellemzők mellett a mikrobiológiai állapota döntően befolyásolja. A tej mikrobiológiai szennyezettsége a technológiai tulajdonságokra és a tej élvezeti értékére egyaránt kedvezőtlenül hat. Éppen ezért a tej mikrobiológiai minőségének vizsgálata a tejavizsgáló laboratóriumok állandó feladatát képezi. A hagyományos mikrobiológiai vizsgálatok (lemezöntés, stb.) azonban rendkívül időigényesek és még a baktériumtevékenység következtében fellépő redukálóképesség kimutatásán alapuló eljárások is időigényesek, vagy éppen érzékenyséjük nem kielégítő.

Heeschen 1969-ben, (1), majd Tolle és munkatársai 1973-ban (2) a tej mikrobiológiai vizsgálata során felfigyelt arra, hogy a tejben előforduló mikroorganizmusokban a piruvát, mint központi metabolit, felhalmozódik és a sejten kívüli mennyiségéből a jelenlevő mikroorganizmusok számára lehet következtetni.

A piruvát központi szerepét jól szemlélteti az 1. ábrán bemutatott sejtmodell. A piruvát szerepét játszik minden tápanyag lebontásában és ugyanakkor elbomlása csak viszonylag lassabban megy végbe. Fontos megállapítás volt az is, hogy a pasztörözés, vagy sterilizálás körülményei között a piruvát nem bomlik el és a hőkezelést megelőző bakteriális szennyezettségre, vagy baktériumműködésre következtetéseket enged meg.

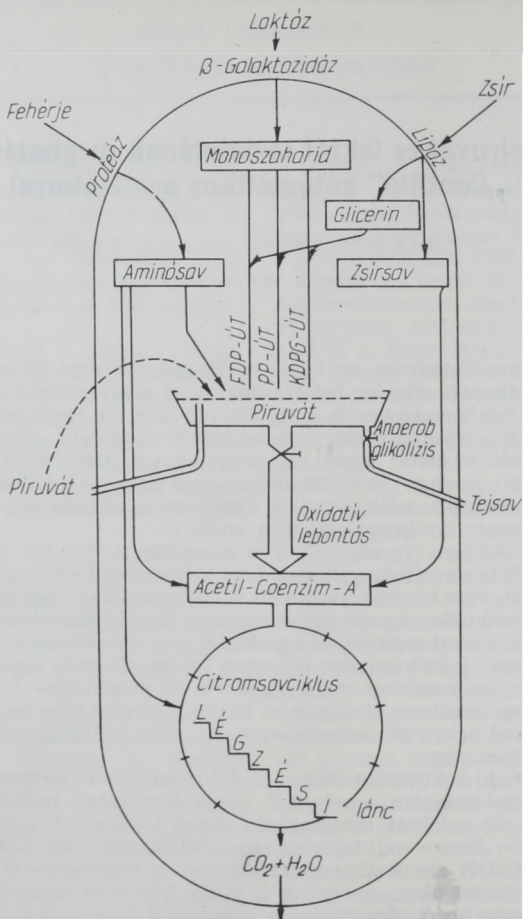
Tolle (2), majd öt követően többen (3. 4. 5) enzimátikus módszert dolgoztak ki a piruvát meghatározására, amely a 2. ábrán bemutatott reakció egyenleteken alapul. A piruvát a laktát dehidrogenáz enzim hatására NADH-val (redukált nikotinsavadenin dinukleotid) tejsavvá redukálódik, miközben NAD képződik. Az átalakulás a NADH abszorpció spektrumában és fluoreszcencia spektrumában mélyreható változást okoz, amelyet a 3. ábrán kívánunk szemléltetni. Látható, hogy a 340 nm-en mért abszorbeancia, valamint a fluoreszcencia csökken és az felhasználható az átalakulás mértékének mérésére.

Marshall és Harmon (8) 1978-ban végzett részletes ellenőrző vizsgálatai szerint a baktérium fajtától függően $10^2 - 10^5/\text{cm}^3$ mikroorganizmus 24 óra alatt 20 °C-on a piruvát mennyiségének szignifikáns növekedését okozza, míg a tej természetes mikroflórája esetén 2–2,5 milligramm/dm³ feletti piruváttartalom $10^6/\text{cm}^3$ mikroorganizmus jelenlétére mutat.

A tej hasznos és káros mikroorganizmusai között gyakoriak a tejsavtermelő mikroorganizmusok, amelyek a piruvátot a 2. ábrán bemutatott reakcióval tej-

* Budapesti Műszaki Egyetem Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

** Országos Élelmész- és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest.



1. ábra
Piruvát szerepe a sejt anyagcseréjében.

savvá alakítják. Mennyiségük és működésük a tej savfokának befolyásolása révén közvetlenül a tej tulajdonságaira hat. Mivel a piruváttartalmat csökkentik, a piruvát mérésén alapuló értékelési eljárást igen jól kiegészítheti a tejsav meghatározása, hiszen éppen az elbomlott piruvát mennyiségére ad információt. Éppen ezért többnyire a vizsgálatokat kétszatórnás kivételben szokták megvalósítani, ahol az egyik csatorna a piruvátot, a másik a tejsav mennyiségét méri.

A tejsav meghatározására ugyanaz az enzimes eljárás alkalmazható (7), mint a piruvát meghatározására, ha gondoskodunk az egyensúly eltolásával a piruvát eltávolításáról a rendszerből. Erre a gyakorlatban hidrazin reagens bizonyult

megfelelőnek, amely a piruváttal hidrazidot képez és ez az egyensúly eltolásához vezet.

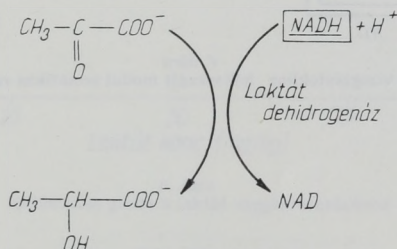
Figyelembe véve a kedvező külföldi tapasztalatokat és a hazai távlati terveket, amelyek a tej mikrobiológiai átvételi rendszerének kidolgozására irányulnak, célul tűztük ki a tej piruváttartalmának és tejsavtartalmának Technikon analízatorra kidolgozott módszerének adaptálását a hazai gyártmányú hasonló elven működő Contiflo automatikus elemzőre.

A felhasznált anyagok

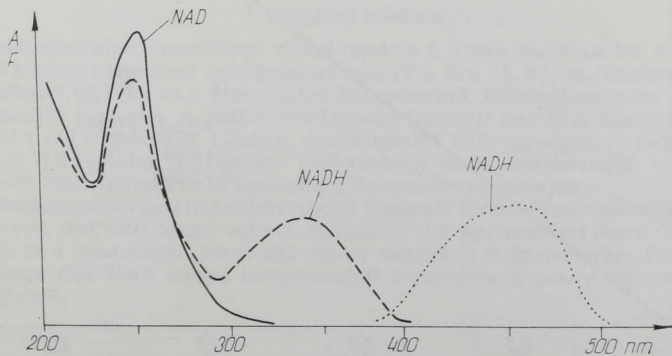
Vizsgálatainkhoz Reanal gyártmányú NAD és NADH, valamint L-laktát-dehidrogenáz enzimet használtunk fel.

A vizsgált tejmintákat és tápszereket kereskedelemből szereztük be.

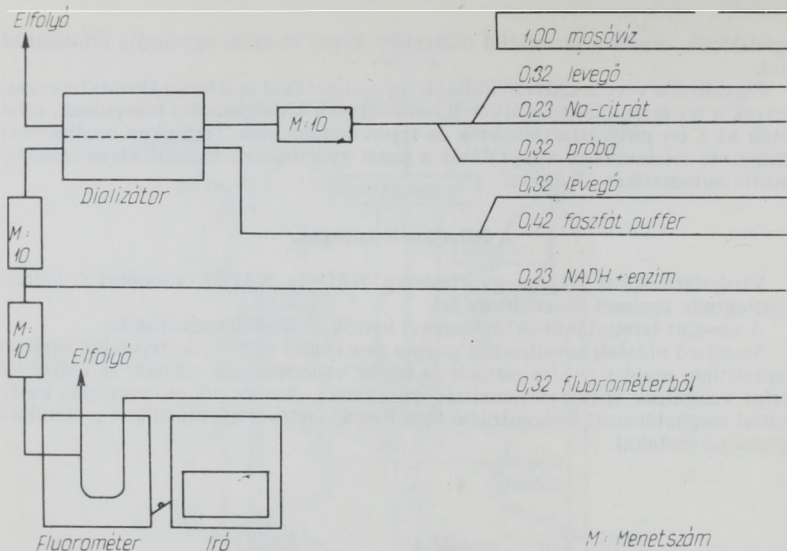
Standard oldatok készítéséhez purum piruvátból és 85%-os tejsavból hígítást készítettünk, majd a pontos piruvát és tejsav koncentrációt *Albrecht és Tatini* (9) szerint vizsgáltuk spektrofotometriás módszerrel. Az így 1%-os variációs koeficienssel meghatározott koncentráció figyelembevételével készítettük el a standard hígítási sorozatokat.



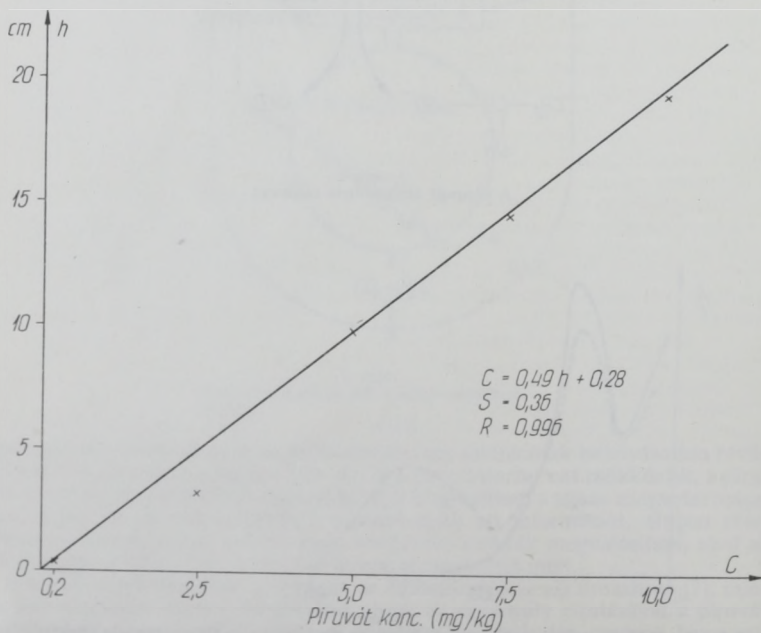
2. ábra
A piruvát átalakulása tejsavvá

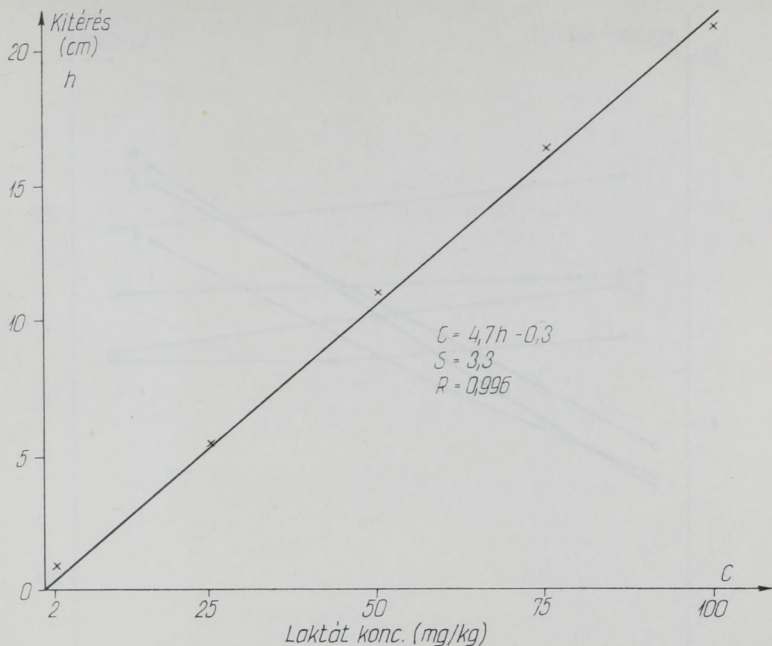


3. ábra
A NAD – NADH átalakulást kísérő változás az abszorpciós és fluoreszcencia spektrumban



4. ábra
A vizsgálatokhoz felhasznált modul sematikus rajza





6. ábra
Kalibrációs görbe a laktát meghatározásához

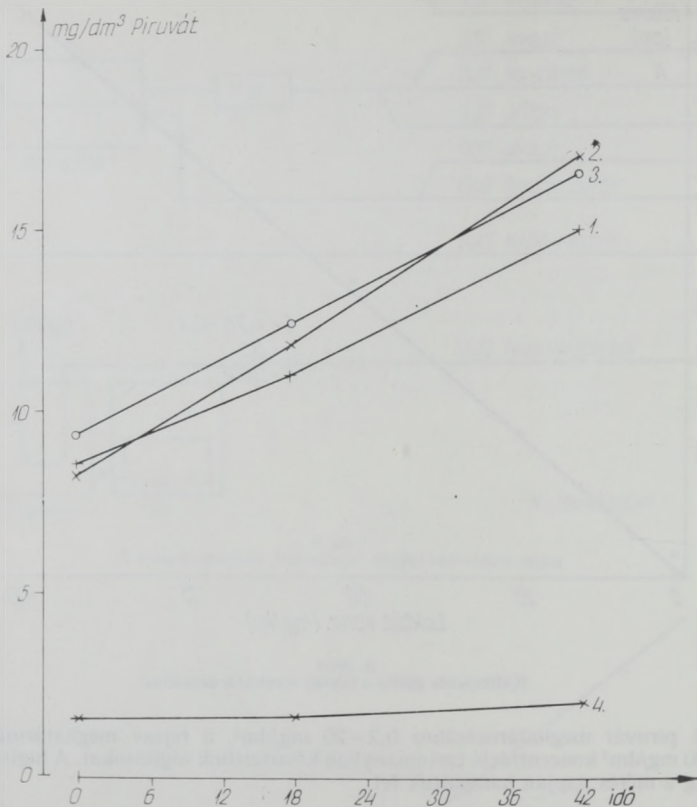
A piruvát meghatározásához 0,2–20 mg/dm³, a tejsav meghatározásához 2–200 mg/dm³ koncentráció tartományban készítettünk hígításokat. A hígításokat mindig a mérés napján használtuk fel.

A vizsgálati módszer

A vizsgálatokhoz összeállított modul rajzát a 4. ábrán mutatjuk be. A mintatartóból kiszívott tejmintát detergenstartalmú (3% Brij 35, 5%-os Natriumcitrátban) pufferrel hígítjuk és a kismólsúlyú komponensek különválasztására dializátoron vezetjük keresztül. A dializátorból távozó tisztított mintához hozzákeverjük a NADH-t (30 mg/dm³) és L-laktát dehidrogenázt (200 egység/dm³) tartalmazó 9,6 pH-jú 0,2 mol/dm³ TRIS-sósav pufferoldatot és az összekeverést, valamint reakcióidőt biztosító reaktoron keresztül a fluorométerbe vezetjük.

A fluorométer kvarc átfolyó küvetával felszerelt Evans Electroelenium LTD gyártmányú, 244/1050 típusú volt. A gerjesztést OX jelű szűrővel (max. 366 nm) végeztük és a fluoreszcens fényt 463 nm-en mértük. A fluorométerhez Radelkisz gyártmányú OH 814/1 típusú kompenzográf kapcsolódott, amely felrajzolta az analóg görbét.

5. ábra
Kalibrációs görbe a piruvát meghatározásához

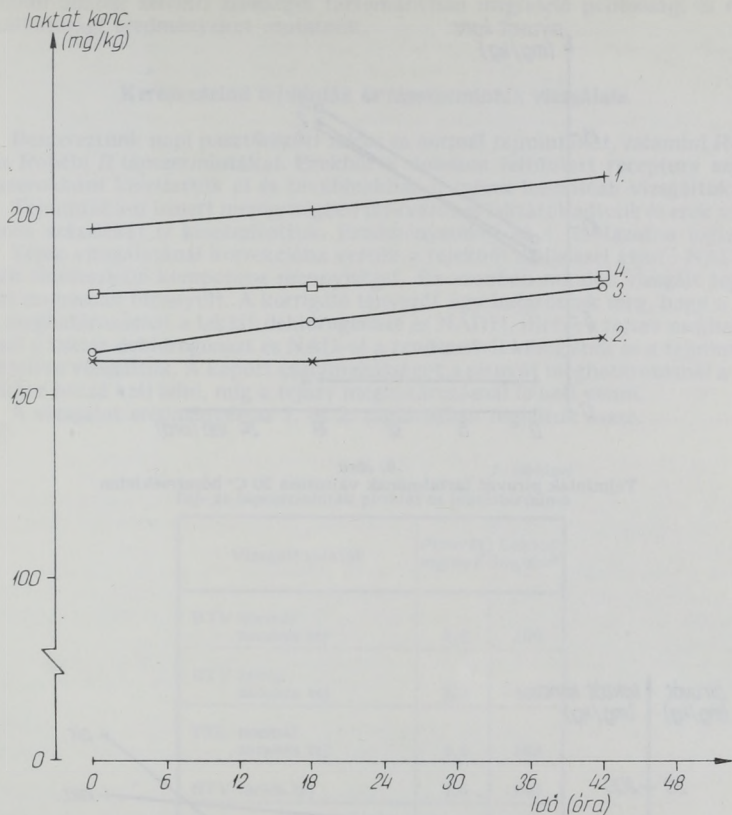


7. ábra
Tejminták piruvát tartalmának változása 4 C° hőmérsékleten

A tejsav meghatározásához ugyanezen elrendezésű modult használtuk. Az eltérés az enzimet tartalmazó pufferoldatban volt. Itt 0,4 mol/dm³ koncentrációjú hidrazint és 1 mol/dm³ glicint tartalmazó 0,5 pH-jú pufferoldatot és 6 g/dm³ NAD-ot (oxidált nikotinsav adenin dinukleotidot) használtunk 2000 egység/dm³ koncentrációjú L-laktát dehidrogenáz mellett. Mivel a vizsgálatokhoz csak L-laktát dehidrogenázt alkalmaztunk a modul csak az L laktátot határozza meg. D és L-laktátdehidrogenáz együttes felhasználása esetén mindkettő meghatározásra kerül.

Eredmények

Vizsgáltuk a kifejlesztett modulok érzékenységet, megbízhatóságát, majd különböző kereskedelmi tejmintákat. Vizsgáltuk a pasztőrtej és tartótej piruvát és laktát tartalmának alakulását különböző tárolási körülmények között.

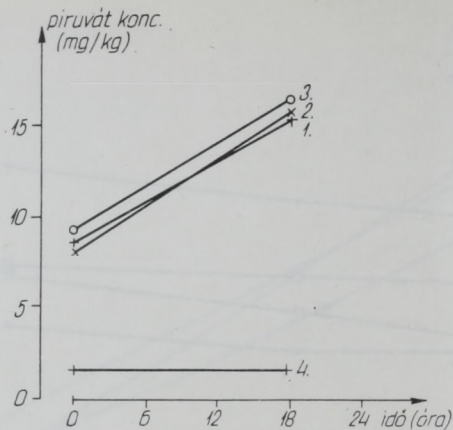


8. ábra
Tejminták laktát tartalmának változása 4 C° hőmérsékleten

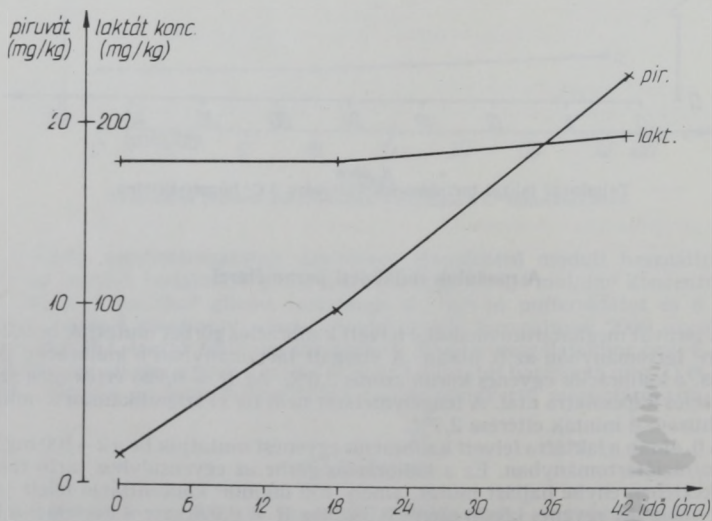
A modulok működési paramétereit

A piruvát meghatározó modullal felvett kalibrációs görbét mutatjuk be 0,2 – 10 mg/dm³ tartományban az 5. ábrán. A vizsgált tartományban a kalibrációs görbe lineáris, a kalibrációs egyenes körüli szórás 3,6%. Az R = 0,996 érték igen szoros korrelációs kapcsolatra utal. A tengelymetszet nem tér el szignifikánsan a nullától. A párhuzamos minták eltérése 2,7%.

A 6. ábrán a laktátra felvett kalibrációs egyenest mutatjuk be a 2 – 100 mg/dm³ koncentrációtartományban. Ez a kalibrációs görbe az egyensúlyhoz tartó reakció következtében enyhe hajlást mutat, amely 100 mg/dm³ koncentráció felett jelentőség válik. Az egyenes körüli szórás 3,3%. Az R = 0,996 szoros korrelációs kapcsolatra utal. A tengelymetszet nem tér el szignifikánsan a nullától. A párhuzamos minták eltérése 2,8%. A standard sorozattal felvett kalibrációs görbék alapján az



9. ábra
Tejminták piruvát tartalmának változása 20 C° hőmérsékleten



10. ábra
Tartós tej összetevőinek változása 40 C° hőmérsékleten

irodalmi adatok szerinti szükséges tartományban megfelelő pontossági és reprodukálhatósági eredményeket mutatnak.

Kereskedelmi tejminták és tápszerminták vizsgálata

Beszereztünk napi pasztörözött zsíros és normál tejmintákat, valamint Robébi A és Robébi B tápszermintákat. Ezekből a dobozon feltüntetett receptura szerinti tápszeroldatot készítettük el és továbbiakban a tejhez hasonlóan vizsgáltuk.

Tejmintákhoz ismert mennyiségben piruvátot és laktátot adtunk és ezek visszanyerési százalékát is kiszámítottuk. Eredményeinket az 1. táblázatba foglaltuk.

Tejek vizsgálatánál korrekcióba vettük a tejkéből dialízissel átjutó NADH és egyéb fluoreszkáló komponens mennyiségét. Ez azonban minden vizsgált tejmintánál azonosnak bizonyult. A korrigáló tényezőt úgy határoztuk meg, hogy a piruvát meghatározásnál a laktát dehidrogenázt és NADH, illetve a tejsav meghatározásnál a laktát dehidrogenázt és NAD-ot a rendszerből kihagytuk és a tejmintákat ismételt vizsgáltuk. A kapott csúcsmagasságot a piruvát meghatározásnál a mért értékhez hozzá kell adni, míg a tejsav meghatározásnál le kell vonni.

A vizsgálat eredményét az 1. és 2. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat

Tej- és tápszerminták piruvát és laktáttartalma

Vizsgált minták	Piruvát mg/dm ³	Laktát mg/dm ³
BTV normál zacskós tej	8,6	196
BTV zsíros zacskós tej	8,3	160
TSZ normál zacskós tej	9,4	162
BTV tartós tej	1,6	180
Robébi A tápszer	1,9	40
Robébi B tápszer	1,7	34

A pasztörözött tejekben a piruvát és laktát mennyisége feltűnően nagy érték. Irodalmi adatok 2–2,5 mg/dm³ piruváttartalom felett a tejet már igen nagy csiraszámúnak és csökkent élvezeti értékűnek találták. Ugyancsak nagy a tejsavtartalom is. Megfelelő értékeket a tartóstej és a tápszeres esetében mértünk.

Természetesen az eredmények nem reprezentálják a hazai tejek mikrobiológiai állapotát, hiszen egy adott nyári napon beszerzett tejmintákat vizsgáltunk.

A piruvát és laktát visszanyerését megfelelőnek, közel 100%-nak találtuk.

Tejminták tárolás alatt bekövetkező változásainak vizsgálata

Az előzőekben már vizsgált tejmintákat 4 C°-on hűtőszekrényben, valamint 20 és 40 C°-on termosztátban tároltuk és piruvát, valamint laktát tartalmukat 18

A visszanyerhetőségre végzett kísérlet eredményei

Minta	Piruvát mg/dm ³	Laktát mg/dm ³	Vissza- nyerési %
Normál tej	8,4	51	
Normál tej + 12 mg/dm ³ piruvát	21,0	49	105
Normál tej + 8 mg/dm ³ piruvát	17,1	50	109
Normál tej + 4 mg/dm ³ piruvát	12,7	53	108
Normál tej + 100 mg/dm ³ laktát	8,7	147	96
Normál tej + 50 mg/dm ³ laktát	8,5	100	98
Normál tej + 30 mg/dm ³ laktát	8,2	82	103

és 42 óra után meghatároztuk. 40 C° hőmérsékleten a pasztörözött tejminták 5 óra után megalvadtak, így ezeket nem mérhettük. A tartóstej kezelést *kinyitás után* végeztük.

Az eredményeket a 7, 8, 9, 10. ábrákon mutatjuk be.

A 7. ábrán a tejminták piruváttartalmának változását mutatjuk be. A pasztörözött tejek piruváttartalma 0,2 mg/dm³-el nő óránként, míg a tartóstej piruváttartalma csak 0,01 mg/dm³ értékkel nőtt 4 C° hőmérsékleten.

A 8. ábrán a laktáttartalmat ábrázoltuk a 4 C°-on tárolt tejekben. Itt a pasztörtejek 0,13–0,43, a tartóstej minta 0,10 mg/dm³ laktáttartalom növekedést mutatott óránként.

A 9. ábrán a 20 C°-on tárolt tejek piruváttartalmát mutatjuk be. A pasztörözött tejek piruváttartalma óránként 0,5 mg/dm³-el nőtt, míg a tartóstej ezen mintája nem változott.

A laktáttartalomban 20 C°-on a pasztörtejeknél ugrásszerű változás lépett fel és 24 óra után megalvadtak, így mérésük nem volt lehetséges. 18 óra elteltével is már 600 mg/dm³ fölé nőtt a tejsavtartalom. Ugyanakkor a tartóstej laktáttartalma gyakorlatilag nem változott.

A 10. ábrán a tartóstej piruvát és laktáttartalmának változását mutatjuk be 40 C°-on. Ezen a hőmérsékleten már a tartóstejben is meggyorsul a piruváttermelés. Óránként 0,5 mg/dm³ a növekedés és a tejsavtartalom is növekszik, de csak lassan 0,4 mg/dm³ értékkel óránként.

Összefoglaló értékelés

Az eredmények jól mutatják, hogy a kidolgozott eljárások alkalmasak a tejen végbemenő mikrobiológiai változások követésére, a tej higiénés állapotának megítélésére. Feltétlenül szükséges a módszer bevezetése előtt széleskörű kutatómunkával annak feltárása, hogy a nemzetközileg megállapított határértékek mennyiben alkalmazhatók a hazai tejekre. Fontos feladat annak megvizsgálása, hogy magyar tejekben található mikroflóra összetétele és mennyisége hogyan befolyásolja a tejen található metabolitok mennyiségét és a tej érzékszervi tulajdonságait.

- (1) Heeschen W.: *Milchwissenschaft* 24, 721, 1969.
- (2) Tolle A.-et al.: *Milchwissenschaft* 27, 343, 1972.
- (3) Wernery H.-et. al.: *Deutsche Molkerei-Zeitung* 34, 1222, 1974.
- (4) Stahlhut-Klipp H.: *Deutsche Molkerei Zeitung*, 622, 1975.
- (5) Zaadhof K. J.-et. al.: *Deutsche Molkerei Zeitung* 228, 1975.
- (6) Springmeyer W.-et. al.: *Deutsche Molkerei Zeitung* 1118, 1976.
- (7) Suhren G.-et. al.: *Milchwissenschaft*, 32, 709, 1977.
- (8) Marshall, R. T. — Harmon, C. C.: *J. Food Protection* 41, 168, 1978.
- (9) Berg Meyer H. U.: *Methoden der Enzymatischen Analyse Chemie Kjadó Weinheim*, 1970.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПИРУВАТА И ЛАКТАТА В МОЛОКЕ АВТОМАТИЧЕСКИМ АНАЛИЗАТОРОМ «Контифло»

Ф. Ёрши и Е. Барна

Авторы ферментный способ определения пирувата и лактата разработанного на автоматический анализатор производства Техникон адаптировали флуориметрической детекцией на автоматический анализатор «Контифло». Разработанный модуль определяет пируват в диапазоне концентрации 0–10 мг/дм³ 3,6% рассеянием, а L-лактат в диапазоне концентрации 0–100 мг/дм³ 3,3%-ным рассеивом.

Исследовали содержание пирувата и L-лактата в пастеризованном и стерилизованном молоке, а также в некоторых молочных концентратах отечественного производства, а также и изменения этих характеристик в течении хранения при температуре 4, 20, 40 °С.

BESTIMMUNG DES PYRUVAT- UND LAKTATGEHALTES VON MILCH MIT DEM AUTOMATISCHEN ANALYSIERGERÄT „CONTIFLO“

F. Örsi und É. Barna

Das für das automatische Analysiergerät Technikon entwickelte enzymatische Pyruvat- und Laktatbestimmungsverfahren wurde von den Autoren an einem automatischen Analysiersystem adaptiert, unter Anwendung eines Nachweises durch Fluorometrie. Der entwickelte Modul ist fähig, das Pyruvat im Konzentrationsbereich von 0–10 mg/dm³ mit einer 3,6%igen Streuung, während das L-Laktat im Konzentrationsbereich von 0–100 mg/dm³ mit einer 3,3% igen Streuung zu bestimmen.

Der Gehalt von pasteurisierten und sterilisierten Milch-Mustern und gewissen inländischen Nahrungsmitteln an Pyruvat und L-Laktat, ferner der Änderungen dieses Gehaltes dieser Kennzeichen während einer Lagerung bei 4, bzw. 20 und 40 °C wurde untersucht.

DETERMINATION OF THE PYRUVATE AND LACTATE CONTENT OF MILK BY THE AUTOMATIC ANALYZER „CONTIFLO”

F. Örsi and É. Barna

The enzymatic determination of pyruvate and lactate developed for the automatic analyzer of Technikon type was adapted for the automatic analyzer system "Contiflo", on applying detection by fluorometry. The developed module is capable of determining pyruvate in the concentration range from 0 to 10 mg/dm³ with a scattering of 3.6% and L-lactate in the concentration range from 0 to 100 mg/dm³ with a scattering of 3.3%. Also the pyruvate and L-lactate contents of pasteurized and sterilized milks and domestic food preparations, furthermore the changes of these contents during storage at 4 °C, 20 °C and 40 °C.

HAZAI LAPSZEMLE

Összeállította: Kacs Kovics Miklós

Rosenthal R.: Bevezetés a közeli infravörös tartományban végzett mennyiségi elemzésbe. Élelmészeti Ipar. 33, 371, 1979.

Cseh J.-né, Tokai G., Tóth M.: Foszfátészter-tartalmú növényvédőszer meghatározása automatikus analizátorral. Élelmészeti Ipar. 33, 383, 1979.

Kissné Prokai K., Zahári P.-né, Zahári P.: Az instabilitás néhány oka. Borgazdaság. 27, 148, 1979.

Kapcs A., Ásvány Á.: A polimer színezékek és a szabad kénsav hatása a vörös borok színére. Borgazdaság. 27, 152, 1979.

Tóth M.: Autoanalyzer néhány alkalmazási lehetősége a söripari analitikában. V. rész. A. Diasztatikus enzimkapacitás és proteázaktivitás meghatározás. Söripar. 26, 127, 1979. B. Proteolitikus aktivitásmérés automatizálása. 26, 130, 1979. C. Diasztatikus kapacitás és proteáz-aktivitás kétszoros meghatározása analizátor rendszerrel. 26, 133, 1979.

Keskeny Gy.: Az elasztigráf vizsgálati körének bővítése. Sütőipar. 26, 175, 1979.

Szollár L., Jáky M., Pucskó J.: A trigliceridek sztereospecifikus szerkezetének közelítése pankreasz-lipáz hidrolízis adataiból. Olaj – Szappan – Kosztetika. 28, 1979.

Bognár V.-né, Lukinits Á.: Kínai kel fajták beltartalmi értékeinek és gyorsfagyasztóságának vizsgálata. Hűtőipar. 26, 74, 1979.

Perédi J., Szungyi M., Kelecsényi R.: Margarinok és étzsírok konzisztenciáját meghatározó tényezők és ezek vizsgálati módszerei. Olaj – Szappan – Kosztetika, 28, 102, 1979.

Kriszta E., Stopyra E.: Gyorsfagyasztott töltelékes sülttészta eltarthatóságának vizsgálata. Hűtőipar. 26, 83, 1979.

Ritter T.-né: Kosztetikumokkal szembeni elvárások, minőségi követelmények. Olaj – Szappan – Kosztetika. 28, 112, 1979.

Mohay J., Veress M., Szász Gy.: Nehézfémzennyezés meghatározás atomabszorpciós spektrofotometriás módszerrel, II. Gyógyszerkönyvi alapanyagok vizsgálata közvetlen oldás után. Magyar Kémiai Folyóirat, 85, 465, 1979.

Borosné Böszörményi N.: Kénsavas alapelektrolit alkalmazása élelmiszerekben réz, ólom, kadmium és cink egymás melletti polarográfiai meghatározására. Magyar Kémiai Folyóirat, 85, 542, 1979.

Horvai Gy., Tóth K., Pungor E.: Ion szelektív elektródok kalibrálása átfolyó cellás rendszerben. Magyar Kémiai Folyóirat, 85, 382, 1979.