

A redukáz-enzimpróba alkalmazása édesvízi halhús és édesipari készítmények mikrobiológiai szennyezettségének vizsgálatára

B Í R Ó G É Z A

Állatorvos tudományi Egyetem Élelmiszerhigiéniai Tanszék, Budapest

Érkezett: 1966. június 2.

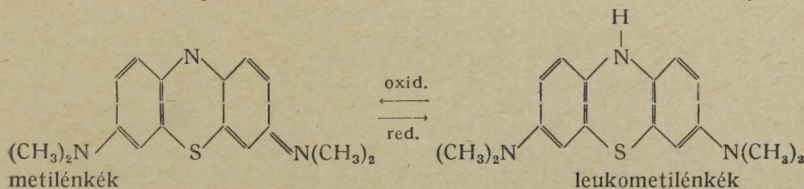
Tejipari gyakorlati kézikönyvből széles körben ismertek azok az enzimpróbák, amelyeket a tej mikrobiológiai szennyezettségének megállapítására alkalmaznak (1). A próbák a baktériumok redukáz enzimtevékenységén alapulnak és bár ismertek a különféle mikrobák eltérő enzimtevékenységei, a gyakorlati tapasztalatok alapján a redukáz enzimtevékenységből jól lehet következtetni a baktériumszámra. Természetes, hogy ezek a próbák nem érik el a tenyésztési eljárások pontosságát, de rövidebb idő alatt adnak eredményt és olyan laboratóriumban is elvégezhetőek, amelyek nincsenek berendezkedve baktériumtenyésztésre.

A tejiparban standardizált (2) metilénkék és rezaurin próbákat számos más területen, különféle élelmiszerekre is kidolgozták és alkalmazzák. A metilénkék próbát felhasználták darált marhahús (3), sőt rák és osztriga (4) vizsgálatára is. Friss és fagyasztott élelmiszerekre, köztük főzelékkélféltre is leírták a rezaurin próbát (5).

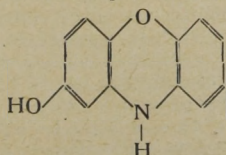
A rezaurin próba az, amelyet a legtöbb kísérleti munka is említ. Így kidolgozták liofilizált tojásporra (6), előfőzött és fagyasztott készítményekre (7), baromfi-hús vizsgálatára (8). Ezekon kívül az ún. TTC-próbát is megtaláljuk baromfi-hús vizsgálatánál (9).

A próbák lényege az, hogy a baktériumszámmal arányos redukáz enzim bizonyos festékeket redukálva, azokat elszínteleníti, másoknál színüket megváltoztatja, vagy színesekké redukálja.

A metilénkék próbánál a redukció szintelen metilénkéket eredményez.



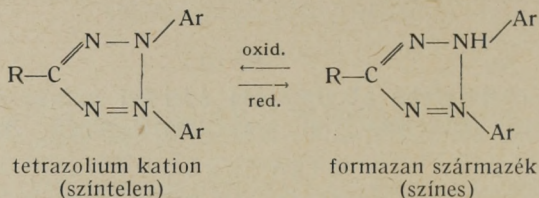
A rezaurin próbánál a pasztellkék színű 8-oxi-fenoxazon



8-oxi-fenoxazon

redukálódik rózsaszínű rezorufinná, majd szintelen dihidrorezorufinná.

A TTC-próbánál a 2,3,5-trifenil- 2,1,3,4,-tetrazóliumkloridban a színtelen tetrazólium kation színes (vörös) formazan származékká redukálódik,



Előzetes összehasonlító kísérleteink során mind a halhús mind az édesipari készítmények vizsgálatánál a rezaurin próbát találtuk a legalkalmasabbnak. A rezaurin próba érzékenysége, valamint többféle színátmenete lehetővé tette, hogy a próbát a rózsaszín-szín elérésekor már elbíráljuk, így a próba idejét lerövidítettük. A rezaurin színváltozása a pasztellkékből a halványlila, lilás rózsaszín, rózsaszín, majd halvány rózsaszínen át a színtelenbe történik. A kísérletek során a rózsaszín-szín eléréséhez szükséges idő mindig arányban volt a teljes elszíntelenedés idejével, ezért a próba elbírálásához a rózsaszín-szín elérését is alkalmasnak tartjuk és a vizsgálati eredményeinkben ezt az időtartamot a teljes elszíntelenedési idő mellett feltüntettük.

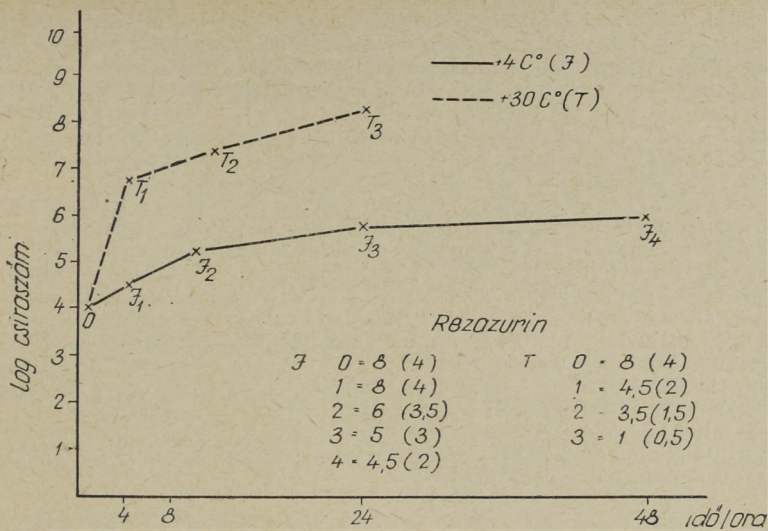
A rezaurin reagens elkészítése céljából 5 mg kristályos rezaurint oldunk fel 100 ml desztillált vízben, ez sötét üvegben 2 napig tartható el szobahőmérsékleten. A reagens elkészítésére a tejiparban használt „Rezaurin” tablettá is alkalmas.

Halhús vizsgálata

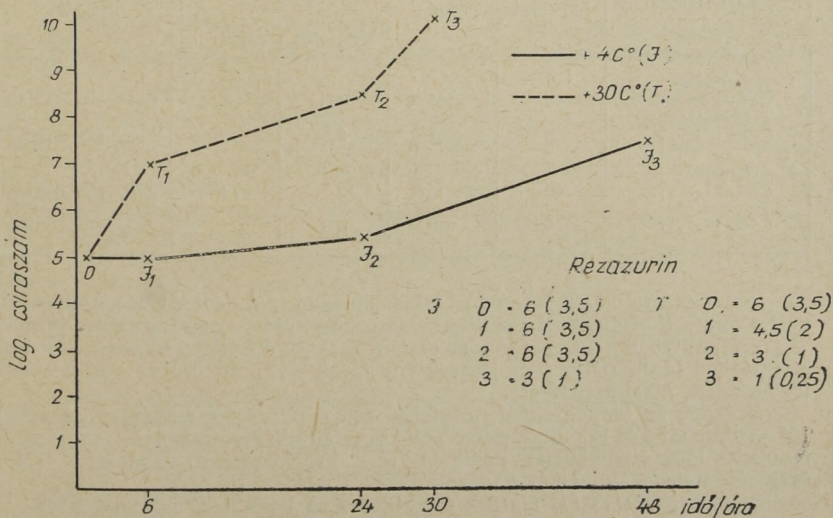
A közfogyasztásra kerülő nem élő, jegelt, fagyasztott vagy gyorsfagyasztott halak vizsgálata sokszor okoz problémát, amikor a vizsgáló a fagyott állapotból felengedett, gyorsan romló halak postmortális elváltozásait csupán érzékszervi vizsgálattal értékeli. A már érzékszervileg kifogásolt halak bakteriológiai vizsgálatára alig kerül sor.

Kísérleteinkben édesvízi halakat és pedig tükörpontyokat használtunk fel, amelyeket közvetlenül a kísérletek előtt öltünk meg. A halakat +4 C°-os jég-szekrényben és +30 C°-os termosztátban tároltuk. A +4 C°-on a pszichrofil baktériumok-, a +30 C°-on a mezofil és pszichrotoleráns mikrobák elszaporodását kívántuk elérni. A mintákat a hal bőrének lefejtése után a középvonal felett az oldalizomból vettük minden esetben új metszési felületről. A mintákból elvégeztük a rezaurin próbát, valamint ezzel párhuzamosan lemezöntéses-tenyésztéses eljárással összecsíraszámot határoztunk meg. Egy kísérletsorozatban 5 db halat használtunk fel, a számszerű eredményeket a kapott adatok aritmetikai átlagként közöljük.

A rezaurin próba végrehajtásánál 1 g halhúst összeaprítottunk, azt kémcsőben levő steril 9 ml fiziológias konyhasóoldatba tettük és ehhez adtunk 2 ml rezaurin reagenst. A kémcsövet 30 C°-on tartottuk megfigyelés alatt és feljegyeztük a rózsaszín-szín elérését, valamint az elszíntelenedésig eltelt időt. Két kísérletsorozat eredményeit az 1. és 2. ábrákon mutatjuk be. Az 1. ábrán látható, hogy induláskor 10⁴-en körüli csíraszámnál a rezaurin próba 4 órás rózsaszín, valamint 8 órás elszíntelenedési időt jelzett, 48 órás jég-szekrény tárolás esetén 10⁷ összecsíraszámnak 2 órás rózsaszín- és 4,5 órás elszíntelenedési idő felelt meg. Ezeket az értékeket már 4 órás termosztát tárolás után észleltük, majd 8 óra



1. ábra. +4 - és +30 C°-on tárolt édesvízi pontyokból vett minták összcsiraszámának és rezazurin reduktíós idejének adatai



2. ábra. +4 - és +30 C°-on édesvízi pontyokból vett minták összcsiraszámának és rezazurin reduktíós idejének adatai

múlva 10^7 , 24 óra múlva 10^8 összcsíraszám értékeket kaptunk. A megnövekedett összcsíraszám arányosan rövidebb rezaurin redukciós idők jelentkeztek. 24 órás termosztát tároláskor a rezaurin próba 0,5 órás rózsaszín- és 1 órás elszíntelenedési időt mutatott. A 2. ábrán a jégsekreányban tárolt minta összcsíraszám a kezdeti 10^5 csíraszámról 48. órára 10^7 -re, a termosztátban tárolt mintáé 30. órára 10^{10} -re növekedett. A rezaurin próba eredménye jégsekreány-tárolásnál 1 órás rózsaszín- és 3 órás elszíntelenedési időt, termosztát tárolásnál 0,25 órás rózsaszín- és 1 órás elszíntelenedési időt mutatott.

Mind az összcsíraszám, mind a rezaurin próba értékelésénél természetesen az érzékszervi elváltozásokat alapvetően vettük figyelembe. Lényegében az értékelés nézőpontjából ezekre alapoztuk az elvégzett laboratóriumi vizsgálatainkat. Az érzékszervi vizsgálatok során figyelemmel kísértük a hullamerevség alakulását, a bőr és pikkelyek nyálkásodását, a kopolyúk színének változását, az izomzat állományának és színének változásait, valamint a szemek állapotát. Az érzékszervi elváltozásokból igyekeztünk megállapítani a különböző hőmérsékleten tárolt halminták esetében azt a határt, ahol már a vizsgáló fogyasztásra alkalmatlannak kell hogy minősítse a halakat és meghatározni azt a rezaurin redukciós időt, amely megfelel ennek az állapotnak.

Tárolási kísérleteinkben megállapítottuk azokat az időpontokat, amelyeknél a halhúsminták érzékszervi vizsgálattal kifogásoltakká váltak és így fogyasztásra alkalmatlannak minősültek.

1. táblázat

1. táblázat. Az érzékszervi vizsgálattal fogyasztásra alkalmatlan édesvízi pontyok izomzatának összcsíraszám és rezaurin értékei.

Kísérletsorozat	Tárolási idő (óra)	Összcsíraszám/g	Rezaurin red. idő (óra)		Érzékszervi vizsgálat
			színtelen	rózsaszín	
1. Jégsekreány (+4 C°)..... Termosztát (+30 C°).....	48	10^6	4,5	2	Fogy. alkalmatlan
	8	2×10^7	3,5	1,5	Fogy. alkalmatlan
2. Jégsekreány (+4 C°)..... Termosztát (+30 C°).....	48	2×10^7	3	1	Fogy. alkalmatlan
	6	10^7	4,5	2	Fogy. alkalmatlan

Fogyasztásra alkalmatlanná és mikrobiológiai szempontból kifogásolhatóvá vált a minta a bemutatott első kísérletsorozatunkban – termosztátban 8 órás, – jégsekreányban a 48 órás tárolás esetén. A másik kísérletsorozatnál a – termosztátban tárolásnál 6. –, a jégsekreány tárolásnál a 48. órában vált a minta fogyasztásra alkalmatlanná.

Ezeknek az időpontoknak megfelelő tenyésztési összcsíraszámolás során 10^6 – 10^7 , tehát 1 és 10 milliós csíraszámokat találtunk grammonként. A rezaurin redukciós idők vizsgálatakor pedig 1 – és 2 órás rózsaszín-, valamint 3 és 4,5 órás elszíntelenedési időket kaptunk.

Straka és Stokes (7) marha- és csirkehúsról vonatkozó adataik szerint a rezaurin redukciós ideje, amit ők a teljes elszíntelenedésig számítottak 100 000-tól 1 000 000 csíraszámig 3–5 óra, 1 000 000 csíraszám felett pedig kevesebb mint 3 óra időtartam. Ezeknek az általánosított adatoknak a vizsgálatainkban

nyert adatok lényegében megfelelnek. A vizsgálatainkban nyert csíraszámok következetesen a magasabb határértékek körül mozognak azért, mert a halhús vizsgálatához szükséges kísérleti beállításunk az eddigi vizsgálatoktól kis mértékben eltért.

A rezaurin próba és más reduktáz enzim kimutatására alkalmazott próbák esetében ugyanis a rekáció lezajlásához bizonyos inkubációs időre van szükség.

A reagens redukálását egyrészt a vizsgálati anyaggal a reakció közegébe vitt kész- és a baktériumokból közvetlenül felszabadult reduktáz enzim végzi, másrészt, ha ez az enzimmennyiség kevés, a meginduló csíraszaporodás logaritmikus fázisában termelődő reduktáz enzim végzi el a redukciót és ilyen esetben a redukciós idő természetesen hosszabb. A meginduló csíraszaporodás viszont elsősorban a tápközegtől függ.

Tej esetében a rezaurin próbát természetesen tejjel végzik, mivel az egyben kitűnő tápközeg is. Egyéb, főleg szilárdabb élelmiszereknél peptonvizet alkalmaznak a próba végrehajtásához. A mi kísérleteinkben a fiziológias konyhasóoldatba helyezett 1 g halhús biztosította a tápközegét. Ez a legegyszerűbb kísérleti beállítás, a próba végrehajtásához megfelel, de természetesen a más kísérleti beállításokhoz képest az eredményeket módosítja. A halhússal végzett kísérleteinkből megállapíthatjuk, hogy a rezaurin próba az általunk bemutatott kísérleti beállításban alkalmas a halhús vizsgálatának kiegészítésére. A kapott eredmények alapján a rezaurin próba rózsaszínig terjedő 2 órás vagy ezen belüli redukciós ideje megerősíti az érzékszervi vizsgálattal *fogyasztásra alkalmatlannak* minősített elbírálást.

Édesipari termékek vizsgálata

Az édesipari termékek vizsgálatánál maga az élelmiszer nem szolgál olyan tápközeg, mint a tej, a baktériumtevékenység megindulását más módon kell biztosítani.

Straka és Stokes (7) hús és egyéb élelmiszereknél is peptonvizet alkalmazott az inkubálásra. A peptonvíz az édesipari készítményeknél is alkalmas a mikroba-tevékenység megindítására. Desztillált vízzel készült 1% peptont és 0,5% konyhasót tartalmazó tápoldat ez, amelyet a felhasználás előtt sterilizálni és pH 7-re kell beállítani.

A készítményből, vagy nyersanyagból darálva, vagy finoman felaprítva 1 g-ot teszünk kémcsőbe, majd hozzáadunk 15 ml peptonvizet. Néhányszor összerázzuk, szükség esetén kissé felmelegítjük, majd szűrőpapíron kémcsőbe szűrjük. Tapasztalatunk szerint a peptonvíz ilyen módon a vizsgált anyag mikroflórájának nagy részét tartalmazza. A vizsgált anyagot azért kell eltávolítani, mert elfedi a kialakuló színváltozásokat. A peptonvizes szűrlethez 1 ml rezaurin oldatot mérünk és a mezofil mikroflórának megfelelően 30 C°-on inkubáljuk.

A kísérlet beállítása előtt a készítményekből és nyersanyagokból tenyésztéses eljárással megállapítottuk az összcsíraszámot (2% glukózos agaron, lemezöntéssel), hogy a redukciós időt az összcsíraszám értékeivel tudjuk összehasonlítani.

Korábbi vizsgálataink alapján megismertük az egyes terméktípusokban előforduló átlagos összcsíraszámokat. Ezeknek megfelelő mintákat kiválogatva néhány terméknel megállapítottuk az összcsíraszámnak megfelelő rezaurin redukciós időket.

A 2. táblázat néhány termék és nyersanyag összcsíraszámát és a rezaurin redukciójának idejét mutatja.

Édesipari termékek összesírászáma és ennek megfelelő rezazurin redukciós idők

Minta	Összesíra- szám/g	Rezazurin redukciós idő (óra)	
		rózsaszín	színtelen
1. Korfu	7 000	9	11
2. Úrhajós	6 000	9	11
3. Sport	6 000	8	10
4. Ezüst desszert	10 000	6	7
5. Földimogyoró	2 000	7	8,5
6. Kakaóbab	20 000	5	6
7. Mandula	60 000	5	6
8. Szójabab	80 000	5	6
9. Kakaópor	500 000	2,5	3

Tekintettel arra, hogy eddigi mikrobiológiai vizsgálataink alapján – mikrobiológiai szennyezettség tekintetében – kifogástalan minőségű termék összesírászáma csak 100 000 g alatt lehet, a rezazurin próba redukciós ideje 5 óránál (rózsaszín) kevesebb nem lehet, illetve ezen időn belül történt redukció esetén a vizsgált termék, vagy nyersanyag mikrobiológiai szennyezettség szempontjából kifogás alá esik.

A rezazurin színváltozása a redukált alak mennyiségétől függ, illetve az oxidált- és redukált alak arányából alakul ki. A peptonvízben a baktériumok redukáz enzimtevékenységére bizonyos redoxrendszer jön létre.

Ez a változás mérhetően a redoxpotenciál változásában jut kifejezésre. Következésképpen a kialakult szín a rendszer redoxpotenciáljától függ, azaz bizonyos színnek, bizonyos redoxpotenciál érték felel meg.

Ismeretes, hogy az oldat pH-ja is befolyásolja a redoxpotenciált. Kísérletünkben ez a kezdeti 7,0 pH-ról szintén a baktériumtevékenység következtében emelkedhet a lúgos irány felé.

Kísérleti beállításban a pH 7,0-es peptonvízbe nagymennyiségű baktériumot vittünk, amelyből 10-es mértékben hígítva hígítási sort készítettünk és ehhez rezazurin oldatot adtunk. 15–30 perces termosztátban tartás után a hígítási sornak megfelelően színváltozást tapasztaltunk. Megmértük a különböző színű peptonvizek redoxpotenciálját és a szín sorozatnak megfelelően a mV-érték arányos emelkedését kaptuk. (3. táblázat.)

3. táblázat

A rezazurin redukciós próbánál kialakuló színnek megfelelő redoxpotenciál értékek.

Szín		mV
Kontrol	Pasztellkék	-6
1.	Lilás rózsaszín	+58
2.	Rózsaszín	+160
3.	Havány rózsaszín	+276
4.	Igen halvány rózsaszín	+310
5.	Színtelen	+328

Összegezve a kísérleti eredményeket az édesipari termékek mikrobiológiai szennyezettsége tekintetében kifogástalan és kifogásolható állapot a rezazurin redukciós próbával kimutatható, amelyet a próbánál színváltozás és a redoxpotenciál érték változása jellemez.

- (1) *Ketting, F.*: Laboratóriumi gyakorlatok. Műsz. Könyvkiadó, Bp. 1959.
- (2) American Public Health Assotiation. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 10th ed., 1955. pp. 32.
- (3) *Rogers, E., Cs. Mc Cleskey*: Food Technology. 15, 210, 1961.
- (4) *Novak, A. F., Fieger, E. A., Bailey, M. E.*: Food Technology. 10., 66, 1956.
- (5) *Proctor, B. E., Greenlie, D. G.*: Food Research. 4, 441, 1939.
- (6) *Hirschmann, D. J., Lightbody, H. D.*: Food Research. 12, 372, 1947.
- (7) *Straka, R. P., Stokes, J. L.*: Food Research. 22, 412, 1957.
- (8) *Wells, F. E.*: Food Technology. 13, 584, 1959.
- (9) *Mallmann, W. L., Dawson, L. E., Sultzer, B. N., Wright, M. S.*: Food Technology. 12, 122, 1958.

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОБЫ ФЕРМЕНТА РЕДУКТАЗЫ ДЛЯ ИСПЫТАНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРИМЕСЕЙ МЯСА ПРЕСНОВОДНЫХ РЫБ И КОНДИТЕРСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Г. Бура

При испытании пресноводных рыб с целью обоснования органолептической оценки потребляемости и для определения микробиологических примесей продуктов кондитерской промышленности эффективно применяется проба резазурина. При испытаниях рыбного мяса в физиологической раствору поваренной соли, а при испытаниях продуктов кондитерской промышленности в пептоновую воду взвешивают 1 г. испытуемого материала и с реагентом резазурина производят пробу в термостате при температуре 30°C. При резазуриновой пробе достижение розового цвета соответствует для оценки пробы.

Время необходимое для восстановления рыбного мяса 1–2 часа, а у кондитерских изделий около 5 часов показывает соответствующее микробиологическое состояние.

VERWENDUNG DES REDUKTASE-ENZYMTESTES ZUR PRÜFUNG DER MIKROBIOLOGISCHEN VERUNREINIGUNG DES FLEISCHES VON SÜSSWASSERFISCHEN, SOWIE VON SÜSSWARENINDUSTRIELLEN PRODUKTEN

G. Biró

Bei der Untersuchung von Süßwasserfischen ist zur Unterstützung der organoleptischen Prüfergebnisse auf Konsumsfähigkeit, sowie zur Beurteilung der mikrobiologischen Verunreinigung von Süßwaren die Resazurinprobe gut anwendbar. Bei dem Fischfleisch wird die Probe durch Einwaage von 1 g des zu prüfenden Material in physiologische Kochsalzlösung, bei Süßwaren der selben Menge in Peptonwasser durchgeführt und nach Zugabe des Resazurin-Reagenten in einem Thermostat von 30 C gehalten. Erreichung der Rosafarbe des Resazurins ist die Grundlage der Beurteilung der Probe. Beim Fischfleisch weist eine Reduktionszeit binnen 1–2 Stunden, bei Süßwaren eine solche binnen 5 Stunden auf einen nicht entsprechenden mikrobiologischen Zustand hin.

APPLICATION OF THE REDUCTASE ENZYME TEST FOR THE INVESTIGATION OF THE MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION OF FRESHWATER FISH AND OF CONFECTIONERY PRODUCTS

G. Biró

The resazurine test proved to be suitable for use in the investigation of freshwater fish, for checking the results of the organoleptic examination of consumability, and, respectively, for the evaluation of the microbiological contamination of confectionery products. In the case of freshwater fish, 1 g of the test sample is measured in a physiological solution of sodium chloride, while in the case of confectionery products 1 g of sample is measured in peptone water. After addition of the resazurine reagent, the test is carried out in a 30° thermostat. The evaluation of the resazurine test is based on the length of time elapsing until a pink tint appears. In the case of fish, colour formation within 1–2 hours, while in the case of confectionery products that within 5 hours point to an inadequate microbiological state.

EMPLOI DE L'ESSAI À L'ENZYME RÉDUCTASE POUR EXAMINER LA CONTAMINATION MICROBIOLOGIQUE DE LA CHAIRE DE POISSON D'EAU DOUCE ET DES PRÉPARATIONS DE CONFISERIE

G. Biró

L'on peut se servir avec de bons résultats de l'essai à la résazurine pour appuyer la qualification sensorielle de la consommabilité des poissons d'eau douce et pour juger de la contamination microbiologique des produits de confiserie. L'essai se fait au thermostat à 30 °C avec 1 g de la matière à examiner et le réactif, dans de la solution saline physiologique pour la chair de poisson et dans de l'eau ajoutée de peptone pour les produits de confiserie. Dans ces essais le temps à obtenir une coloration rose suffit pour qualifier l'échantillon.

Pour la chair de poisson un temps de réaction au-dedans de 1 à 2 heures, et pour les produits de confiserie un temps de réaction au-dedans de 5 heures signifient un état microbiologique non convenable.

DARROCH J. G. és GORTNER W. A.:

A kiskereskedelmi forgalomból származó dobozokban tartósított ananásztermékek C-vitamintartalma

(Vitamin C in canned pineapple products at the retail level.)

J. agric. Food Chem., 13, 27–29, 1965.

Vizsgálatra 266 ananászlékonzervminta és 276 ananászkonzervminta került, amelyeket 1962/1963 telén az USA 40 államának kiskereskedelmi forgalmából vettek. Szerzők megállá-

pították, hogy a tárolási hőmérséklet nagy befolyást gyakorol a C-vitamintartalomra, míg a termékek korának befolyása csak csekély. A hűvösebb vidékekről származó dobozolt ananászléminták átlagos C-vitamintartalma 93 mg/l volt, a dobozolt ananászmintáké pedig 89 mg/l, míg a melegebb vidékeken a C-vitaminértékek 66, illetve 30 mg/l-re csökkentek. A vizsgálatokból arra következtetnek, hogy ananászlékonzervekben 78 mg/l, ananászkonzervekben pedig 64 mg/l C-vitamintartalom megkövetelhető.

Kieselbach Gy. (Budapest)