

Élőcsíraszám meghatározása 2, 3, 5-trifenil-tetrazólium-klorid (TTC) redukciója alapján tankpezsgőgyártási folyamatnál

EDELÉNYI MIKLÓS

Kertészeti és Szőlészeti Főiskola, Borgazdasági Tanszék, Budapest

Érkezett: 1968. július 13.

A pezsgőtermelés mennyisége az utóbbi két évtizedben elsősorban a tankpezsgőgyártás térhódításával nagymértékben növekedett. A nagy (50–2000 hl-es) tartályokban végrehajtott CO₂ nyomás alatti erjesztés termelési biztonsága megköveteli a gyors és pontos mikrobiológiai ellenőrzést. A felmerülő technológiai és kutatási problémák megoldása – az anyaélesztő készítés és adagolás módszerének kidolgozása, az optimális erjedési görbe meghatározása, az erjedés menete és a készáru minősége közötti összefüggések felderítése megfelelő élőcsíraszám meghatározási módszert igényelnek. Az élőcsíraszám meghatározására legáltalánosabban használt eljárás a metilénkékes festés Bürkes-kamrára számlálással nagy munkaigénye és hibahátára miatt nem alkalmas a felvetett problémák megoldására. A malátás-agaros táptalajra történő lemezöntés pedig az előbb említett hátrányok mellett hosszadalmas is, a mintavételt követően 48–72 órával ad csak eredményt. A membránszűrési módszerrel (*Jakubowska*) (1) csak kis élőcsíraszámok meghatározása lehetséges, a turbidimetriás eljárással pedig az összes élőcsíraszám határozható meg nagy relatív hibaszázalékkal. Ugyancsak hosszadalmas és ezért üzemi vizsgálatra nem alkalmas az általánoságban használatos kémsöves hígítási módszer is.

Célkitűzésünknek megfelelő, gyors, pontos, kis munkaigényű, sorozatban elvégezhető, 10⁶–10⁸ db/ml élő élesztőszám meghatározására alkalmas módszer keresésénél mindenképpen figyelembe kellett venni a különböző redoxindikátorok színreakcióján alapuló eljárásokat. A mikrobiológiában a dehidrogenáz enzimaktivitás, illetve ezen keresztül az élőcsíraszám meghatározására legrégebben a metilénkéket (MK) használják. A *Thunberg*-technika az élő sejtek enzimeit által redukált MK mennyiségéből, a színintenzitás csökkenéséből következtet az élőcsíraszámra. A módszert azonban elsősorban élő baktériumok számának meghatározására használják, mert élesztőknél a holt sejtek MK-et adszorbeáló hatása zavarja az eljárást. *Borzani* és *Vairo* (2) és *Vairo* (3) módszere éppen a holt élesztősejtek MK adszorpcióját használja fel az összes és az élőcsíraszám meghatározására, elhanyagolva az élő sejtek MK-et leukometilénkékké redukáló hatását. A nevezett szerzők azonban pékélesztővel dolgoztak 4,6 pH értékű közegben; összehasonlító kísérletek tanulsága szerint (*Edelényi*) (4) a tankpezsgőgyártásnál alkalmazott *Bouye* pezsgőélesztő dehidrogenáz enzimrendszere kisebb, 3–5 közötti pH értéken is intenzíven működik és így nincs nagyságrendi különbség a holt élesztősejtek MK adszorpciója és az élő sejtek MK redukciója között, az élő csíraszám tehát holt sejtek jelenlétében nem határozható meg kellő pontossággal. Figyelembe véve a módszer egyéb hátrányait is (anaerob körülmények biztosítása stb.) a MK alkalmazásán alapuló eljárások nem voltak alkalmasak a kitűzött feladat megoldására.

A TTC mikrobiológiai alkalmazásának elméleti alapjai

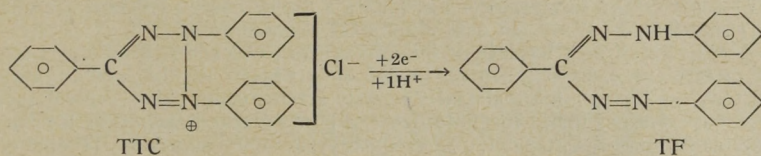
Bár a TTC-ot *Pechmann* és *Runge* már 1894-ben előállította, enzimológiai alkalmazására csak 1942-ben került sor (*Lakon*) (5). Az elmúlt 25 évben használata egyre nagyobb mértékben tért hódít, mivel alkalmazása számos előnnyel bír a hasonló célra felhasznált más redoxindikátorokkal szemben. Nevezetesen:

1. Az oxidált forma, a TTC szintelen, a redukált forma a trifenilformazán (TF) színes vízdoldhatatlan vegyület és így a redukálóképesség sokkal pontosabban határozható meg, mint a színes oxidált formából szintelen redukált formába átsapó indikátorok segítségével.

2. A TTC redukciója könnyen végrehajtható irreverzibilis reakció. A TF oxidációja csak erős oxidálószer hatására megy végbe.

3. A TTC toxicitása igen csekély és így „in vivo” folyamatoknál előnyösen alkalmazható.

A TTC redukciójának kémiai egyenlete a következő:



Különböző pH értékek mellett más átalakulási formák is lehetségesek, erősen savanyú közegben a redukció tovább megy és még 2 elektron felvételével benzhidrazin keletkezik. Enzimreakcióban a TTC redukciója csak flavinenzimek közreműködésével lehetséges. A reakciók pH optimuma enzimes redukciónál 7–8 pH között van. Igen részletesen tanulmányozott a fénynek mind a TTC-ra, mind a TF-ra, mind pedig a redukció lefolyására gyakorolt hatása (*Jámbor*) (6). A zavaró hatások miatt a reakciót enzimaktivitás, illetve élőcsíraszám mérésére csak szigorúan meghatározott körülmények között használhatjuk.

Élő élesztősejtszám meghatározására alkalmas eljárás kidolgozása természetesen még számos problémát vetett fel, mivel a TTC-ot eddigi alkalmazásai során különböző állati és növényi szövetek dehidrogenáz rendszerének tanulmányozásán kívül [*Jámbor* és *Dévay* (7), *Smith* (8)] a mikrobiológiában elsősorban baktériumok dehidrogenáz enzimjeinek vizsgálatára használták [*Wällhauser* (9), *Ford* és *Holdsworth* (10)]. Az élő baktériumszám meghatározására csál fél kvantitatív módszerek ismeretesek a tejparban [*Schönberg* (11), *Gargani* és *Marrhccini* (12)], valamint a szennyvizek vizsgálati eljárásai között [*Goetz* és *Tsuneishi* (13), *Bucksteeg* és *Thiele* (14)].

Kísérleti anyagok, eszközök

A meghatározást 10^6 – 10^8 db/ml élőcsírát (*Saccharomyces ellipsoideus*, Bouzy pezsgőélesztő) tartalmazó erjedő tankpezsgőre, illetve anyaélesztőre dolgoztuk ki, amelynek alkoholtartalma 10,5–12 tf%, cukortartalma 0–25 g/l invertcukor (anyaélesztőtől max. 50 g/l), összes savtartalma ~ 7 g/l, összes kénassavtartalma ~ 100 mg/l, pH értéke ~ 3,4 volt. A TTC-ből kéthetenként frissen készített, sötétben tartott, 1%-os deszt.-vizes oldatot használtunk. Az extinkciót SPEKTROMOM 201 tip. spektrofotométerrel 510 nm-en mértük.

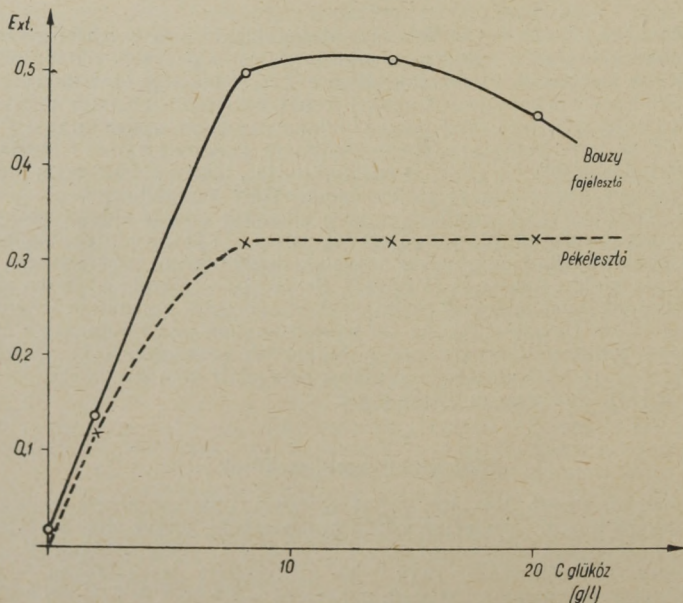
Előkísérletek

A meghatározási módszer kidolgozásához az alábbi főbb kérdéseket kellett megoldani:

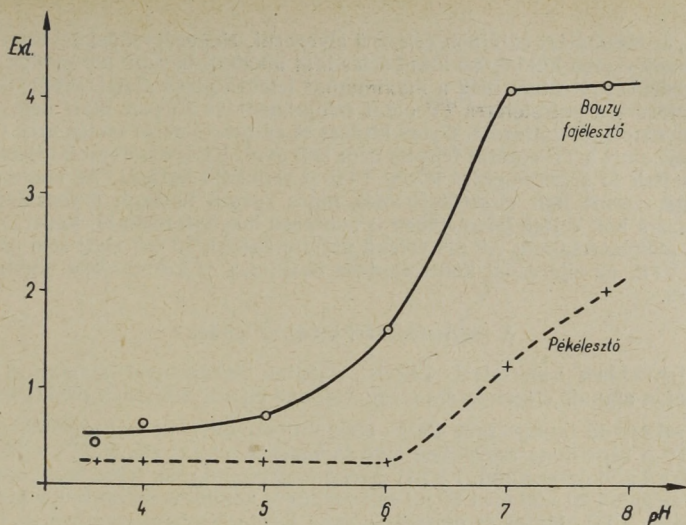
- A keletkezett TF kioldása az élesztősejtekből,
- Az inkubációs közeg pH értékének és glükóztartalmának megállapítása,
- Az inkubációs idő és megvilágítás hatása a meghatározásra,
- Holt élesztősejtek hatása.

Lényeges problémát jelentett a keletkezett TF kioldása a sejtekből, mivel a baktériumok esetében használt egyszerű módszerek élesztősejteknel nem voltak alkalmazhatók. Élesztősejtek esetében legmegfelelőbb a reakció leállítására és a sejtek feltárására 96%-os ecetsav adagolása, majd a TF petroléteres kirázása volt. A glükózkoncentráció hatását a keletkezett TF mennyiségére az 1. ábra mutatja. Sorozatméréseknél az inkubációs közeg glükóztartalmát 20 g/l értékre állítottuk be, hogy a glükóztartalom az inkubálás alatt is a maximumot jelentő platón maradjon. Az inkubációs közeg pH optimuma pékéslesztő és Bouzy pezsgőélesztő esetében eltérő (2. ábra). Erjedő tankpezsgő vizsgálatánál a meghatározás érzékenyebbé tétele, a nagyobb mértékű TF képzés elősegítése érdekében 7–8 pH értékű foszfátpuffer használata a legelőnyösebb (ezeknél a kísérleteknél sötétben, 27 °C-on, 24 órás inkubálást alkalmaztunk).

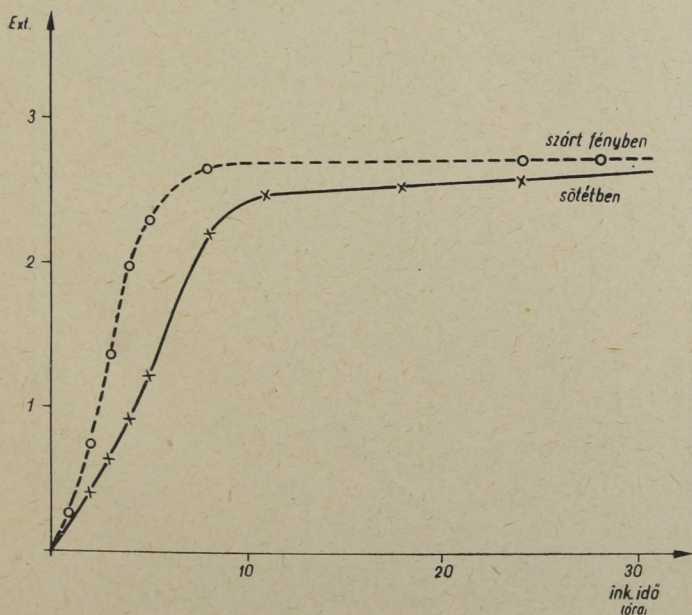
A fény katalitikus hatásának tanulmányozása érdekében kísérletet végeztünk sötétben és szórt fényben különböző ideig végzett inkubálással (3. ábra). Szórt fényben történő inkubálással a reakció érzékenyebbé tehető, mivel azonban a fényerősséget nehéz meghatározott, állandó értéken tartani és kis fényintenzitás változások is nagy eltérést eredményezhetnek a képződött TF mennyi-



1. ábra. Glükózkoncentráció hatása pékésztő és Bouzy pezsgőélesztő trifenilformazán képzésére (élőcsíraszám $\sim 10^8$ db/ml, pH 3,6)



2. ábra. pH hatása pékélesztő és Bouzy peizsgőlesztő trifenilformazán képzésére (élőcsíraszám $\sim 10^8$ db/ml, glükózkoncentráció 20 g/l)



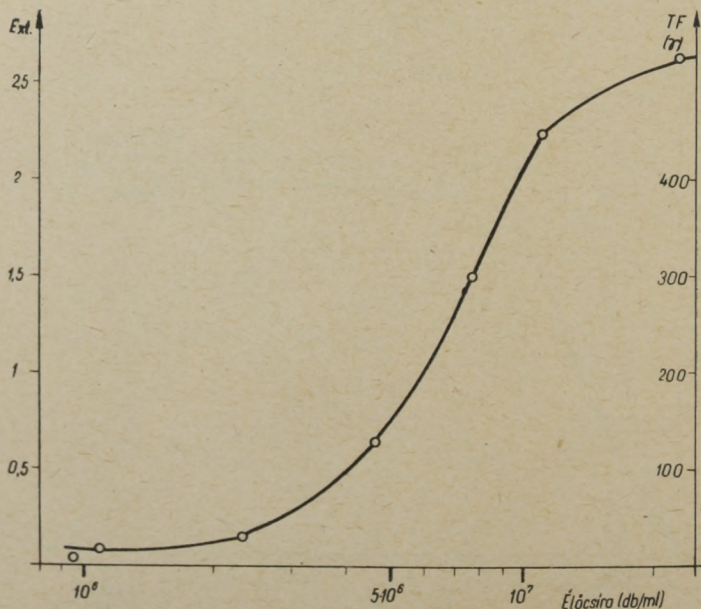
3. ábra. Inkubációs idő és megvilágítás hatása Bouzy peizsgőlesztő trifenilformazán képzésére (élőcsíraszám $\sim 5 \cdot 10^7$ db/ml, pH 7,8)

ségében, az inkubálást sötétben célszerű elvégezni. Nagyságrendekkel eltérő élőcsíraszámok esetén különböző inkubációs időt alkalmazhatunk oly módon, hogy az inkubációs időtartam még a maximumot jelentő plató alatti érték legyen. Fény hatására a petroléteres TF oldat színintenzitása 30 perc alatt nem, 3 óra alatt lényegtelenül változott. Gyors kirázás és extinkciómérés esetén ezen műveletek ideje alatt a TF oldatot fénytől nem kell óvni. Kísérletsorozattal tisztáztuk a holt sejtek és a csíramentes közeg TTC-ot redukáló hatását. Az eredmények tanulsága szerint holt élesztősejteknek nincs zavaró hatásuk a reakcióra, az élőcsíraszám holt sejtek jelenlétében is pontosan meghatározható. Mivel élőcsíramentes, glükóztartalmú, 7,8 pH értékű pufferoldatban 96 óra alatt sem redukálódik a TTC, az eljárásnál kontrollminta beállítása és korrekcióba vétele nem szükséges.

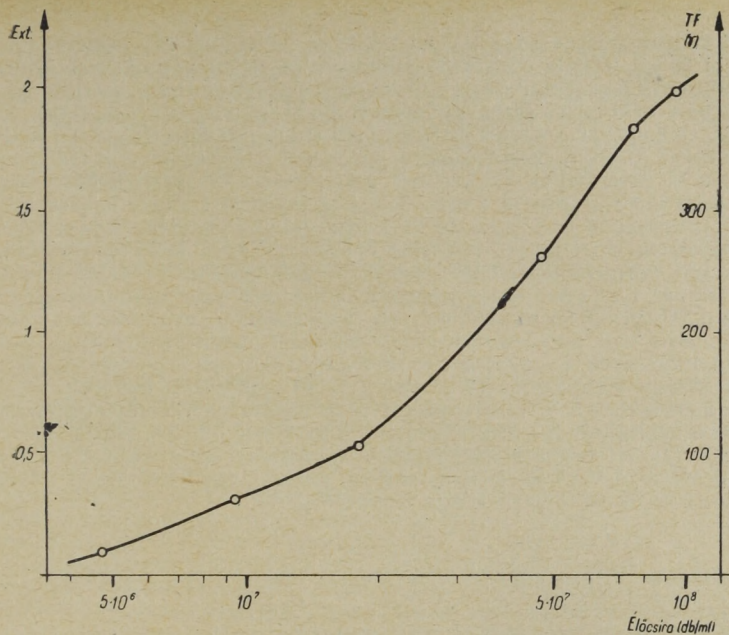
A meghatározási módszer leírása

A fentiekben ismertetett kísérletsorozatok eredményei alapján a TTC redukációján alapuló élőcsíraszám meghatározási eljárás kivitele a következő:

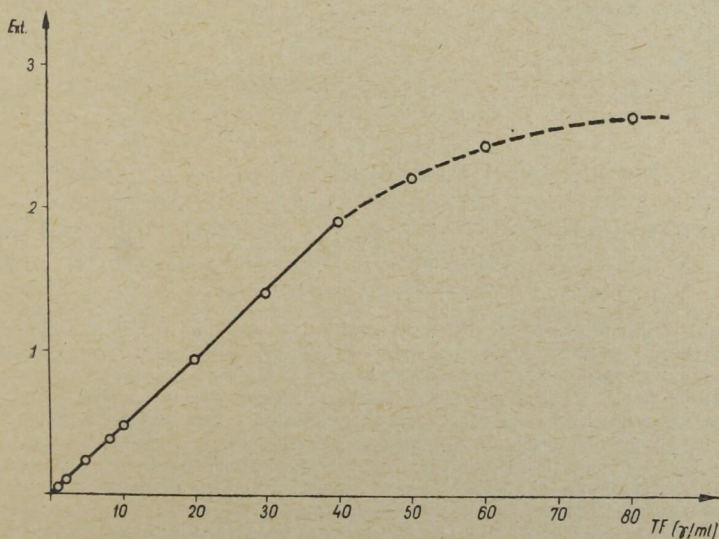
50 ml erjedő tankpezsgőt 4500–5000 fordulat/perc mellett 10 percig centrifugálunk. A centrifuga csövekben levő folyadék tisztáját elöntjük, az üledéket 50 ml 20 g/l glükóztartalmú, 7,8 pH értékű foszfátpufferban felvesszük, egalizáljuk. Az elegyből 20–20 ml-t 50 ml-es üvegdugós lombikba mérünk, hozzáadunk 1 ml 1%-os TTC oldatot és összerázás után termosztátban, sötétben 27 °C-on, kisebb (10^6 – 10^7 db/ml) élőcsíraszám esetén 24 óráig, nagyobb (10^7 – 10^8 db/ml) élőcsíraszám esetén 4 óráig inkubáljuk. Az inkubációs idő leteltével a reakciót



4. ábra. Kalibrációs görbe 24 órás inkubálási idővel 10^6 – 10^7 db/ml közötti élőcsíraszám (Bouzy pezsgőélesztő) meghatározásához



5. ábra. Kalibrációs görbe 4 órás inkubálási idővel $5 \cdot 10^6 - 10^8$ db/ml közötti élőcsíraszám (Bouzy pezsgőlesztő) meghatározásához



6. ábra. Trifenilformazán kalibrációs görbéje ($\lambda = 510$ nm)

20 ml 96%-os ecetsav adagolásával leállítjuk, az elegyet rázóétlősérbe töltjük, további 20 ml 96%-os ecetsavval átöblítjük és 10 ml petroléterrel kirázzuk. A petroléteres kalázis extinkcióját 510 nm-en spektrofotométerrel mérjük. Az élőcsíraszámot kalibrációs görbe segítségével állapítjuk meg (4. és 5. ábra).

Az eredmények abszolút értékelésének érdekében felvettük a TF kalibrációs görbéjét (6. ábra). Összehasonlítva különböző élőcsíraszámok és időtartamok esetében az élesztősejtek TF képzését a keletkezett TF mennyiségét γ -ban az inkubációs idő 1 órájára és a vizsgálandó szuszpenzió 1 ml-ére vonatkoztatva, az élőcsíraszámmal emelkedő, de különböző inkubációs idők, azonos élőcsíraszámok esetén közel egyező értékeket kapunk. $\sim 10^6$ db/ml élőcsíraszámnál a keletkezett TF mennyisége 0,03 γ /óra·ml vizsgálandó oldat, $\sim 10^7$ db/ml élőcsíraszámnál 1,32 γ /óra·ml vizsgálandó oldat, míg $\sim 10^8$ db/ml nagyságrend esetén 5,30 γ /óra·ml vizsgálandó oldat. A vizsgálandó anyag ml-einek számát, az inkubációs időt, a kioldásra használt petroléter mennyiségét vizsgálatainktól eltérő körülmények, élőcsíraszám értékek esetén úgy kell megállapítani, hogy a fotometrálsra kerülő oldat TF tartalma 1–40 γ /ml között legyen.

5 mérésorozatban, sorozatonként 8–8 párhuzamos mérés alapján hibaszámítást végeztünk. A százalékos relatív hiba $\sim 0,82 - 2,72\%$ között változott. Más élőcsíraszám meghatározási eljárásokkal összevetve, a módszer tehát igen nagy pontosságú. Az eljárást felhasználtuk üzemi tankpezsgőgyártási folyamatok élőcsíraszám változásának nyomonkövetésére.

IRODALOM

- (1) *Jakubowska, J.*: Bull. de l'O. I. V. 36., 389, 812, 1963.
- (2) *Borzani, W., Vairo, M. L. R.*: J. Bacteriol. 76., 251, 1958.
- (3) *Vairo, M. L. R.*: Biotechn. and Bioengineering, 4., 247, 1962.
- (4) *Edelényi, M.*: Borgazdaság 16., 3. (1968. Sajtó alatt).
- (5) *Lakon, C.*: Ber. dtsh. Bot. Ges. 60., 434, 1942.
- (6) *Jámbor, B.*: Tetrazoliumsälze in der Biologie, Jena, 1960.
- (7) *Jámbor B., Dévay M.*: MTA Biológia Csoportjának Közleményei III. köt. 3–4. 1959.
- (8) *Smith, F. E.*: Science 113., 751, 1951.
- (9) *Wälthäuser, K. H.*: Naturwissenschaften 38 , 237, 1951.
- (10) *Ford, J. E., Holdsworth, E. S.*: Biochem. J. 22., 53, 1953.
- (11) *Schönberg, F.*: Lebensmitteltierarzt 2., 52, 1951.
- (12) *Gargani, G., Marraccini, M.*: Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 29., 1976, 1953.
- (13) *Goetz, A., Tsuneishi, H.*: J. Amer. Water Works Assoc. 43., 943, 1951.
- (14) *Bucksteeg, W., Thiele, H.*: Wasser und Abwasser 100, 36, 1959.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ЖИВЫХ МИКРОБ ВО ВРЕМЯ ПРОИЗВОДСТВА ШАМПАНСКОГО ВИНА ПО ТАНКОВОМУ СПОСОБУ, НА ОСНОВАНИИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ 2,3,5 ТРИФЕНИЛ-ТЕТРАСОЛИУМ-ХЛОРИДА (ТТС)

М. Эделени,

Для микробиального контроля процесса производства шампанского вина в танке представляет собой простой, скромный и точный метод применения 2,3,5-трифенил-тетрасолиум-хлорида (ТТС), при помощи которого на основании ферментной активности дегидрогеназы можно делать вывод о количестве живых дрожжевых микроорганизмов. В случае бродящего в танке шампанского вина содержащего $10^6 - 10^8$ шт/мл живых микроорганизмов (дрожжи шампанского „БУЗИ“) определение состоит из следующих этапов: центрифугировка, растворение осадка в буферном растворе с содержанием глюкозы, выдержка при температуре 27°C в тёмном помещении в среде содержащем 0,05% ТТС, из инкубации в течении определенного времени, из прекращения реакции при помощи 96%-ной уксусной кислоты, из

выстряхивания с петроэфиром получаемого трифенилформазана и наконец из измерения экстинкции при 510 нм. Количество живых микроб устанавливается при помощи эталонной кривой. Точность метода с микробальной точки зрения является очень хорошей, относительная погрешность изменяется от $\pm 0,82$ до $\pm 2,72\%$. Автор пользовался методом исследования измерения количества живых микроб в процессе приготовления шампанского вина по танковому способу.

BESTIMMUNG DER KEIMZAHL IM LAUFE DER FABRIKATION VON TANKSCHAUMWEIN AUF GRUND DER REDUKTION DES 2,3,5-TRIPHENYL-TETRAZOLIUM-CHLORIDS (TTC)

M. Edelényi

Zur mikrobiologischen Kontrolle des Fabrikationsprozesses von Tankschaumwein liefert das auf Anwendung des 2,3,5-Triphenyl-Tetrazolium-Chlorids (TTC) beruhende Verfahren eine einfache, rasche und genaue Methode, vermittlel welcher man auf Grund der Dehydrogenase-Enzymaktivität die Zahl der lebenden Hefen beurteilen kann. Bei dem $10^6 - 10^8$ /ml lebende Keime (Bouzy Schaumweihen) enthaltenden gärenden Tankschaumwein besteht die Bestimmung aus Zentrifugierung, Aufnahme der Abscheidung in glucosehaltiger Pufferlösung, Inkubation in einem 0,05% TTC enthaltenden Medium, bei 27°C im Finsternen eine bestimmte Zeit lang, Abstellung der Reaktion mit 96%-iger Essigsäure, Ausschüttelung des entstandenen Triphenylformazans mit Petroläther, sowie Messung der Extinktion bei 510 nm. Die Anzahl der lebenden Keime wird mit Hilfe einer Kalibrationskurve bestimmt. Die Genauigkeit der Methode ist in mikrobiologischer Hinsicht sehr gross, der prozentuelle relative Fehler betrug $\pm 0,82 - 2,72\%$. Der Verfasser verfolgte mit dieser Methode die Änderung der Anzahl lebender Keime während der Betriebsfabrikation von Tankschaumwein.

DETERMINATION OF THE NUMBER OF VIABLE GERMS IN THE TANK METHOD OF CHAMPAGNE PRODUCTION, BASED ON THE REDUCTION OF 2,3,5-TRIPHENYL TETRAZOLIUM CHLORIDE

M. Edelényi

A simple, rapid and accurate process has been evolved for the microbiological control of the tank method of champagne production based on the use of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC). By this method, conclusions as regards the number of viable yeast germs can be drawn from the dehydrogenase enzyme activity. In the case of a tank-produced champagne containing 10^6 to 10^8 viable germs per ml (of Bouzy champagne yeast), the determination procedure consists in centrifugation, separation of the sediment and its uptake with a glucose-containing buffer solution, incubation in a medium containing 0.05% TTC for given periods at 27°C in the darkness, freezing the reaction with 96% acetic acid, followed by the petroleum-ether extraction of the formed triphenyl formazan and subsequent measurement of the extinction value at 510 nm. The number of viable germs is established with the use of a working curve. In microbiological aspects, the method is rather accurate, the percentage of relative error ranged from ± 0.82 and 2.72% . The evolved procedure has been employed by the author for following the changes in the number of viable germs during the tank method of champagne production.