

Élelmiszerek B₁₂-vitamintartalmának meghatározása mikrobiológiai módszerrel I.

HEGEDŰS MIHÁLY

Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest

Érkezett: 1972. március 4.

A B₁₂-vitamin – melynek hiánya a folát (újabb nevén folacin (4)) metabolizmus gátlása révén a DNS szintézisben okoz zavart – igen hatékony biokatalizátor. Egészséges felnőtt ember napi szükséglete mindössze 2 µg (1). Élelmiszereinkben általában kis mennyiségben fordul elő; ez jelentős analitikai nehézségekhez vezet. Az élelmiszerekben jelenlevő kísérő anyagok zavaró hatása következtében a kémiai és fizikai módszerek – a radioizotópos technikától eltekintve – általában nem vezetnek megfelelő eredményre, ezért a B₁₂-vitamin mennyiségét biológiai módszerek segítségével, azaz a vitaminaktivitás mérésével kell meghatározni. Tekintve, hogy az állatkísérletes módszerek költségesek, időigényesek és rutinszerű vizsgálatokra nem alkalmasak, elsősorban a mikrobiológiai technika a járható út (2).

A B₁₂-vitamin aktivitás mikrobiológiai úton történő meghatározása esetén azonban figyelembe kell venni, hogy egy élelmiszer B₁₂-vitamin aktivitása különböző szerkezetű és aktivitású rokonvegyületek együtteséből adódhat, így a kapott eredmény egy vegyületsoport összaktivitását jelenti cianokobalamin ekvivalensben kifejezve.

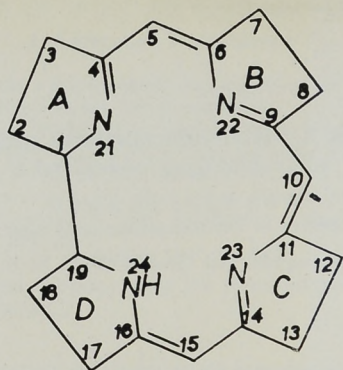
IUPAC – IUB (3), valamint a IUNS (4) nomenklátúra egyértelműen rögzíti, hogy a B₁₂-vitamin elnevezés vegyületsoportot jelöl és vonatkozik minden olyan corrinoid* típusú vegyületre, amely a cianokobalaminéhoz hasonló biológiai hatást mutat (1. és 2. ábra).

Viszonylag csekély azoknak a mikroorganizmusoknak a száma, amelyeknek esszenciális B₁₂-vitamin szükséglete van és így teszt-organizmusként felhasználhatók. Az élelmiszerek B₁₂-vitamintartalmára vonatkozó adatok legnagyobb részét *Lactobacillus leichmannii* baktérium segítségével nyerték, de használatos teszt-organizmus még az *Euglena gracilis*-alga és az *Ochromonas malhamensis* protozoon is. Az egyes tesztorganizmusok alkalmazhatóságának kritikai értékelését több közlemény ismerteti (2, 5).

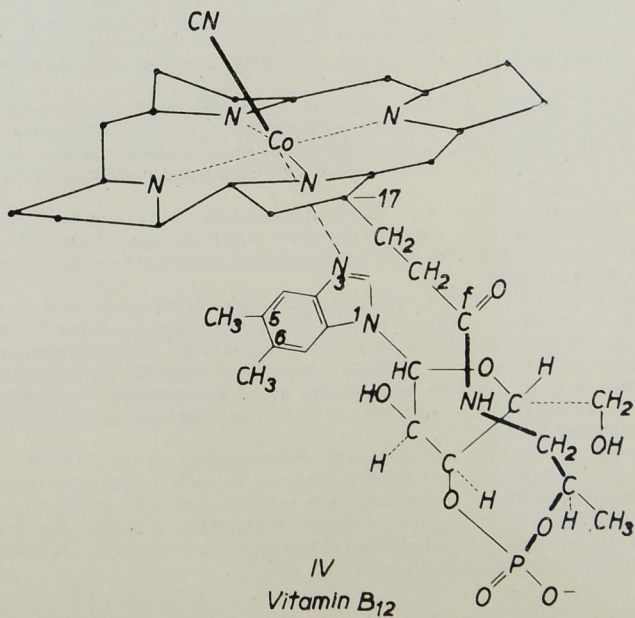
Élelmiszerek B₁₂-vitamin aktivitásának mikrobiológiai úton történő meghatározása esetén problémát jelent az igen alacsony és szűk mérési tartomány a teszt-organizmusok rendkívüli érzékenysége, a vitamin megfelelő extrakciója.

E közlemény olyan mikrobiológiai módszer kialakításáról számol be, amely élelmiszereink B₁₂-vitamin aktivitásának felmérését lehetővé teszi, és módot nyújt egyéb rutinszerű feladatok elvégzésére.

*A „Corrinoid“ megnevezés általánosan vonatkozik az összes „corrin” gyűrűt tartalmazó vegyületre (1. ábra).



1. ábra. Corrin gyűrű



2. ábra. Cianokobalamin

A meghatározás elve. A *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 baktérium B₁₂-vitamin szintézisére nem képes és megfelelően összeállított tápközegben annak B₁₂-vitamintartalmával 2–40 µg/ml (azaz pg/ml) koncentráció tartományban arányosan növekedik (6, 7, 8, 9). A tápközeget a teszt-tápotdat, valamint a minta extraktja alkotja. A teszt-tápotdat B₁₂-vitamint nem tartalmazhat, ez utóbbit kizárólag a vizsgált minta kivonatával juttatjuk a tápközegbe. A B₁₂-vitamintartalommal arányos zavarosodást turbidimetriásan mérjük. Referencia értékeket tiszta vitaminpreparátum felhasználásával, standardsorozat készítésével nyerünk.

Teszt-organizmus. A *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 törzset DIFCO B₁₂ Culture Agar USP Medium-on szűrt kultúrában tartjuk fenn, hetenként legalább kétszer átoltva (inkubálási idő 37 C°-on 16–24 óra). Hűtőszekrényben +4 C°-on tároljuk. Ha a törzs nem elég aktív, napi egyszeri, vagy kétszeri átoltással addig passzáljuk, míg átoltás után 4–6 órával az inokulumban definiált turbiditás mutatkozik.

A minta előkészítése. A B₁₂-vitamin élelmiszerekben általában fehérjékhez kötött formában fordul elő. A vitamin extrakcióját a minta proteázos hidrolízisét követően cianid tartalmú pufferral végezzük hő (autokláv) segítségével. A minta hidroxokobalamin-tartalma ekkor cianokobalaminná alakul át, amely kevésbé bomlékony (10, 11). A *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 mindkét vitamin formára egyformán aktív, a cianidos átalakítás a teszt-organizmus érzékenységet nem befolyásolja (12). A KCN-nek csupán stabilizáló szerepe van, aktiváló hatással nem kell számolni (13).

Az extrakció folyamán lejátszódó oxidációs károsodások ellen SH-típusú antioxidánsok alkalmazásával lehet védekezni; ezek egyben biztosítják a tápközeg redoxpotenciáljának állandóságát is (14).

Tekintve, hogy a *Lactobacillus leichmannii* a B₁₂-vitamin mellett reagál a deoxiribonukleotidokra is (15), az extrakt alikvot részében el kell roncsolni a lúgos pH-n bomlékony B₁₂-vitamint és a DNS-re utaló maradék aktivitással az eredményeket korrigálni kell. Az extrakció folyamán azonban a legtöbb élelmiszer DNS tartalma annyira felhígul, hogy a meghatározást már nem zavarja.

Extrakció: 2 g homogenizált mintához 20 ml 500 mg %-os papain oldatot adunk, majd 1 csepp 1%-os KCN oldattal aktiváljuk. A mintát 2 órán keresztül 55 C°-on inkubáljuk, majd hozzáadunk 20 ml 0,1%-os – 4,6 pH-jú, 20 mg% KCN-t tartalmazó – nátriumacetát puffert és 1 ml 0,2%-os tiodiglikolt. 10 perc 1 atm nyomáson történő autoklavozás után a pH-t, ha szükséges, visszaállítjuk 4,6-ra, az oldatot desztillált vízzel 100 ml-re feltöltjük, majd szűrjük, vagy centrifugáljuk. A szűrletet kétféleképpen dolgozzuk fel:

a) 20 ml szűrlet pH-ját 6,0-ra állítjuk 1 n NaOH-dal és desztillált vízzel 40 ml-re feltöltjük. A kapott oldat az ún. tömény teszt-oldat;

b) 20 ml szűrlethez annyi 1 n NaOH-t adunk, hogy az oldat pH-ja 11, vagy ennél nagyobb legyen. 1 órán keresztül forrásban levő vízfürdőn tartjuk, majd pH-ját 1 n HCl-el visszaállítjuk 6,0-ra és desztillált vízzel 40 ml-re feltöltjük. A kapott oldat az úgynevezett tömény, lúggal kezelt teszt-oldat.

A tömény teszt-oldatból a minta várható B₁₂-vitamintartalma alapján hígításokat végzünk úgy, hogy a teszt-oldat koncentrációja 0,1 m µg B₁₂-vitamin/ml érték körül legyen. A lúggal kezelt teszt-oldatból hasonló hígításokat végzünk.

B₁₂-vitamin standard-oldat. Több ampulla 300 µg/ml-es cianokobalamin injekció összekeverésével nyert törzsoldatból desztillált vízzel – (0,1 ml – 100 ml-re, majd 0,1 ml – 250 ml-re lépésekben) – 0,12 m µg/ml koncentrációjú

standard oldatot hígítunk. A 300 µg/ml koncentrációjú törzsoldat hűtőszekrényben fél évig eláll, a standard-oldat mindig frissen készítendő.

A minta extrahálásánál alkalmazott cianidos acetátpuffer nem bizonyult növekedést gátló, vagy elősegítő hatásúnak, így a standard oldatból el lehetett hagyni.

Teszt-tápoldat (16). Egy üveg dehidratált Dano-B₁₂ Assay Medium tartalmát (= 73,3 g) 1000 ml vízben oldjuk. Az oldatot 1–2 percig forraljuk, majd hűtjük. A pH-t 6,0-ra állítjuk. A tápoldat szűrőpapíron történő szűrése magas vakértékekhez vezethet.

Inoculum. Megfelelően aktív, 4 napnál nem idősebb agar tenyészetből folyékony tápközegbe oltunk, amelyet a következőképpen készítünk:

Teszt-tápoldat ml	B ₁₂ -vitamin standard oldat (0,12 m µg/ml) ml	Desztillált víz ml
5	1	4
5	1	4
5	—	5
5	—	5

Beoltás előtt a csöveket 15 percig Koch-fazékban sterilizzük. Az egyik „vak”-ot nem oltjuk be. Ez a sterilizés ellenőrzésére szolgál, míg a beoltott „vak” cső a tápoldat használhatóságát mutatja. Inkubálás 16–24 óra 37 C°-on. Centrifugáljuk, háromszor mossuk fiziológiás NaCl oldattal, majd a végső szuszpenziót (10 ml) 100-szorosára hígítjuk. Az alig opaleszkáló szuszpenzió egy cseppjével oltunk be. Inoculum nyeréséhez Difco B₁₂ Inoculum Broth USP is használható.

A meghatározás sémája. A teszt-tápoldatot, a standardoldatot, a teszt-oldatot, valamint a lúggal kezelt teszt-oldatot a következő séma szerint mérjük az egyes kémcsövekbe (a bemérések párhuzamosan készítenők):

(„A bemérések sémája” c. táblázat).

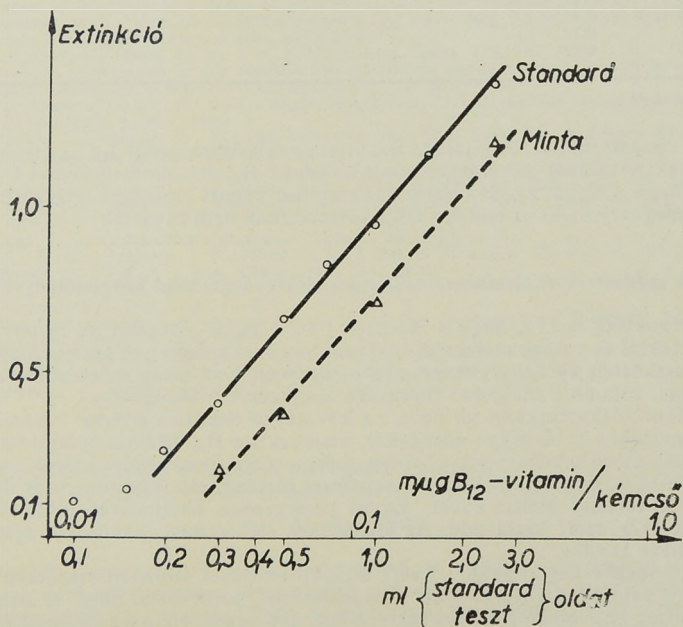
A bemérések sémája

Kémcső jele	Teszt tápoldat ml	B ₁₂ -vitamin standard oldat		Víz ml	Teszt oldat ml	Lúggal kezelt tesztoldat (ml)
		ml	m µg B ₁₂ /cső			
1	2,5	0,1	0,012	2,4	—	—
2	2,5	0,2	0,024	2,3	—	—
3	2,5	0,3	0,036	2,2	—	—
4	2,5	0,5	0,060	2,0	—	—
5	2,5	1,0	0,120	1,5	—	—
6	2,5	1,5	0,180	1,0	—	—
7	2,5	2,0	0,240	0,5	—	—
8	2,5	2,5	0,300	0,0	—	—
9 (vak)	2,5	0,0	0,000	2,5	—	—
10	2,5	—	—	2,2	0,3	—
11	2,5	—	—	2,0	0,5	—
12	2,5	—	—	1,5	1,0	—
13	2,5	—	—	0,0	2,5	—
14	2,5	—	—	2,2	—	0,3
15	2,5	—	—	2,0	—	0,5
16	2,5	—	—	1,5	—	1,0
17	2,5	—	—	0,0	—	2,5

Az összeállított kémcsöveket Koch-fazékban 15 percig sterilezzük, gyorsan lehűtjük, majd az inokulum 2 cseppjével beoltjuk. Ügyelni kell, hogy a kémcsövek hőmérséklete beoltás előtt azonos legyen, mert az organizmus rövid generációs ideje miatt kis hőfok eltérések is jelentős szaporodási különbségekhez vezetnek. Inkubálás 37 és 40 ° között bármely hőmérsékleten történhet, időtartama 16–24 óra. Ha a standard-sorozat kémcsöveiben jól látható turbiditási gradáció fejlődött ki, a növekedést lehűtéssel megállítjuk, majd a kémcsövekben kapott zavarosodást fotometráljuk. Ez történhet Pulfrich-fotométeren világoszöld szűrővel (520–540 m μ) kétszeresére hígított tápoldattal szemben, vagy vörös szűrővel (650–660 m μ) desztillált vízzel szemben.

Kiértékelés

A standard-sorozat extinkciót a logaritmikus léptékű koncentráció függvényében felrajzoljuk (3. ábra), majd a teszt-oldatot tartalmazó kémcsövekben mért extinkció értékekből a standard-görbén történő interpolálással a B₁₂-vitamin mennyiségét meghatározzuk. A hígítások figyelembe vételével ezt a B₁₂-vitamin mennyiségét 100 g élelmiszerre vonatkoztatjuk.



3. ábra.

A *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 teszt-organizmus szaporodása a tápközeg B₁₂-vitamin-tartalmának függvényében

Ismertetlen stimuláló, vagy inhibitorikus faktor jelenlétéről meggyőződhetünk, ha a standardhoz hasonlóan a teszt-oldat extinkcióit is felrajzoljuk. A két görbe párhuzamos lefutása a mérés specifikusságát jelzi. Megjegyzendő, hogy minden meghatározási sorozathoz új standard-sorozatot kell készíteni, azonos időben, azonos feltételek mellett.

Az egyes hígításoknál nyert értékek százalékos szórása 10–15%-nál nem lehet nagyobb. A módszer bruttó százalékos szórása 15–20%. A mintákhoz hozzáadott standard visszanyerési százaléka 80–110%.

Példa az eredmények kiszámolására

Sertéshús minta B_{12} -vitamintartalmának meghatározása; bemérés 2 g; a tömény teszt-oldat hígítása kétszeres.

Kémcső jele	Extinkciók átlaga	Interpolált értékek m $\mu\text{g } B_{12}/\text{cső}$	Hígítási faktorok	$\mu\text{g } B_{12}$
				100 g minta
11	0,20	0,022	1/0,3.2.200.50	1,47
12	0,37	0,032	1/0,5.2.200.50	1,28
13	0,72	0,068	1/1,0.2.200.50	1,36
14	1,20	0,190	1/2,5.2.200.50	1,52
15	0,09	—	—	—
16	0,10	—	—	—
17	0,13	—	—	—
18	0,13	—	—	—

Átlag: 1,41

A vizsgált minta 100 g-jának B_{12} -vitaminaktivitása, tehát 1,4 μg cianokobalamin aktivitásával ekvivalens, azaz a minta B_{12} -vitamintartalma 1,4 $\mu\text{g}\%$. Mint ahogy a lúggal kezelt teszt-oldat esetében kapott extinkció értékek mutatják, a meghatározást ez esetben DNS származékok nem zavarták.

A módszer kivitelezéséhez szükséges elővigyázatossági követelmények

Szem előtt tartva, hogy a módszer 1–2 $\mu\text{g } B_{12}$ -vitamin/ml mennyiséget már detektál és a nagy molekulájú vitaminból ilyen mennyiség számos vegyszerhez és eszközökhöz kötődhet, sikeres analízishez nagy gondosság, az eszközök alapos tisztítása, valamint analitikai tisztaságú vegyszerek szükségesek.

Laboratóriumunkban jól bevált a következő tisztítási eljárás: a kémcsöveket, pipettákat és az olyan edényeket, amelyekben B_{12} -vitamin törzsoldat volt, 2–6 órán át krómkénsavban állni hagyjuk, a többi üvegeszközt krómkénsavval csak öblítjük. Ezt 15–20-szoros csapvízzel történő, majd háromszoros desztillált vízzel történő öblítés követ. Egyes detergensek használatát inhibitorikusan találták (17), ezért kerülendő. Az analízishez előkészített eszközöket ajánlatos elkülönítve tárolni.

A kémcsöveket kupakkal lezárt állapotban hővel szárazon sterilizzük. Ha nem áll autoklávozható kupak rendelkezésre, papírvatta dugó is megfelel, azonban ez már hibaforrásként szerepelhet. Ioncserélt víz nem használható fel, mert az ioncserélő ágyakban B_{12} -vitamint termelő organizmusok telepedhetnek meg. Célszerű fémmentes desztillált vizet felhasználni. Gumidugók, algaszódo desztillált víz tároló edények, az analízist végző személy keze mind a legnagyobb

dés forrása lehet, amely magas vak-értékekhez vezet. Magas vak-értékeket eredményezhet a teszt-tápotdat és a tesztorganizmus B₁₂-vitamin szennyezettsége is. A rendszertelenül előforduló kiugróan magas, vagy túl alacsony növekedési értékek a helytelen mosogásra utalnak. A meghatározások reprodukálása során az eredmények között tapasztalható nagyobb eltérések adódhatnak a minta bakteriális szennyeződéséből is. Ha ismételt analízisnél minden minta eredménye felfelé mozog, ez a standard oldat bomlását jelezheti.

A mikrobiológiai analitikai munka, valamint az eredmények kiértékelése során felmerülő általános problémákról korábbi közlemények (2, 18, 19, 20) adtak részletes áttekintést, hangsúlyozva, hogy a sikeres mikrobiológiai meghatározáshoz a kémiai és bakteriológiai munkában való jártasság mellett elengedhetetlenül fontos a jelentéktelennek tűnő, de valójában igen lényeges apró részletek figyelembe vétele.

Hasznos tanácsaiért köszönetemet fejezem ki dr. Paál Zoltánnának.

IRODALOM

- (1) Report of a FAO/WHO Expert Group on Requirements of Ascorbic Acid, Vitamin D, Vitamin B₁₂, Folate and Iron. Genf, 1969.
- (2) *Telegdy Kováts M., Hegedüs M.*: Élelmezési Ipar, 24, 358, 1970.
- (3) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Nomenclature of Corrinoids. J. Biol. Chem., 247, 2992, 1966.
- (4) IUNS Committee on Nomenclature. Tentative Rules for Generic Descriptors and Trivial Names for Vitamins and Related Compounds. Ann. Nutr. Aliment., Vol. 25, No. 1, 1971.
- (5) *Guttman, H. N.*: Vitamin B₁₂ and Congeners. In: Kavanagh, F.: Analytical Microbiology. Acad. Press, New York, London, 1963, p. 527.
- (6) *Capps, B. F., Hobbs, N. L., Fox, S. H.*: J. Biol. Chem. 178, 517, 1949.
- (7) Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, 9.-th Ed., Assoc. Offic. Agr. Chemists, Washington, D. C. p. 665, 1960.
- (8) The Pharmacopeia of the United States of America, 17.-th revision, Mack Publ., Easton, Pennsylvania, p. 864, 1965.
- (9) *György, P., Pearson, W. N.*: The Vitamins. Vol. VII. 2.-nd Ed., Academic Press, New York, London, p. 301, 1967.
- (10) The Estimation of Vitamin B₁₂. Analytical Methods Committee: Analyst, 87, 134, 1956.
- (11) *Loy, H. W., Haggerty, J. F., Kline, O. L.*: J. Assoc. Offic. Agr. Chem., 35, 169, 1952.
- (12) *Pierce, J. V., Page, A. C., Stokstad, L. R., Jukes, T. H.*: J. Amer. Chem. Soc., 72, 2615, 1950.
- (13) *Lens, J., et al*: Biochem. biophysic. Acta, 8, 56, 1952.
- (14) *Loy, H. W., Haggerty, J. F., Kline, O. L.*: J. Assoc. Offic. Agr. Chem., 35, 161, 1952.
- (15) *Skeggs, H. R., et al*: J. Biol. Chem., 184, 211, 1950.
- (16) Detailed Routine Method for Microbiological Determination of Serum B₁₂, Ferrosan International, Denmark, 1970.
- (17) *Freed, M.*: Methods of Vitamin Assay, 3.-th Ed., Interscience Publishers, New York London, Sydney, p. 266, 1966.
- (18) *Telegdy Kováts M.*: Műszaki Doktori Értekezés, OÉTI, Bp., 1966.
- (19) *Berndorferné, Kraszner É.*: Élelmezési Ipar, 24, 106, 1970.
- (20) *Hegedüs M., Telegdy Kováts M.*: Élelmezési Ipar, 25, 13, 1971.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА В₁₂ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ I.

М. Хэгедюш

Автор знакомляет микробиологический метод подходящий для специфического определения содержания витамина В₁₂ в пищевых продуктах и биологических веществах. Тест — организм: бактерий *Lactobacillus leichmani* i ATCC 7830. Автор подробно знакомляет технику определения и подчеркивает совершенные ошибки, а также требования осторожности соблюдаемых при применении метода.

BESTIMMUNG DES VITAMINGEHALTES B-12 VON LEBENSMITTELN
MIT MIKROBIOLOGISCHEN METHODEN I.

M. Hegedüs

In der Arbeit wird eine für die spezifische Bestimmung des Vitamingehaltes B-12 geeignete mikrobiologische Methode beschrieben. Test-Organismus: *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830. Der Verfasser beschreibt die Technik des Verfahrens ausführlich und macht auf die möglichen Fehler bei der Durchführung aufmerksam, sowie auf die Berücksichtigung der notwendigen Vorsichtsmaßnahmen.

DETERMINATION OF THE CONTENTS OF VITAMIN B₁₂ IN FOODS BY
MICROBIOLOGICAL METHOD. I.

M. Hegedüs

A microbiological method suitable for the determination of the content of vitamin B₁₂ in foods and biological substances is described, using *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 as test organism. The technique of the determination is presented in detail, and attention is called to the errors which may be committed, further to the precaution requirements needed on carrying out the suggested technique.

LE DOSAGE DE LA TENEUR EN VITAMINE B₁₂ DES DENRÉES PAR
VOIE MICROBIOLOGIQUE. I.

M. Hegedüs

La publication traite d'une méthode microbiologique qui se prête au dosage spécifique de la teneur en vitamine B₁₂ des denrées et matières biologiques. La bactérie *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 sert d'organisme de test. L'auteur décrit en détail la technique du dosage y met en relief les fautes qu'on peut y commettre ainsi que les exigences de précaution qui son à suivre en effectuant le dosage.