

A mikrobiológiai vitaminmeghatározások a gyakorlatban*

TELEGDY KOVÁTS MAGDA

Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest

Érkezett: 1971. április 1.

Minden mikrobiológiai vitaminmeghatározás elve azonos. A mikroorganizmus – akár protozoon, gomba, élesztő vagy baktérium – mennyiségileg és minőségileg ismert, megfelelő összetételű táptalajon optimálisan fejlődik. Ha a táptalaj valamely alkotórésze – esetünkben a meghatározandó vitamin – a táptalajból hiányzik, ez a körülmény gátolja a mikroorganizmus fejlődését. Ha a továbbiakban ezt a hiányzó vitamint egyre növekvő mennyiségben azonos térfogatú táptalaj-mennyiségekhez adagoljuk, akkor meghatározott feltételek között a tesztorganizmus valamely életjelensége a hozzáadott vitaminnal arányosan változik. Az ilyen módon kapott standard értékek standard görbét, azaz kalibrációs görbét adnak. Ha a táptalajhoz a kérdéses vitamin helyett olyan vizsgálendő anyagot adunk, amely a meghatározandó vitamint bizonyos határok között tartalmazza, akkor a kapott változásból és a kalibrációs görbéből az ismeretlen vitamennyiséget kiszámíthatjuk. A mikrobiológiai vitaminmeghatározás vázlatát az 1. ábra mutatja.

Mérés szempontjából a meghatározásokat két nagy csoportba sorolhatjuk: vagy közvetlenül a mikroorganizmus növekedését mérjük (zavarosodást, sejtek súlyát határozzuk meg, vagy sejtszámlálást végzünk), vagy pedig valamelyik anyagcseretermék mennyiségét határozzuk meg.

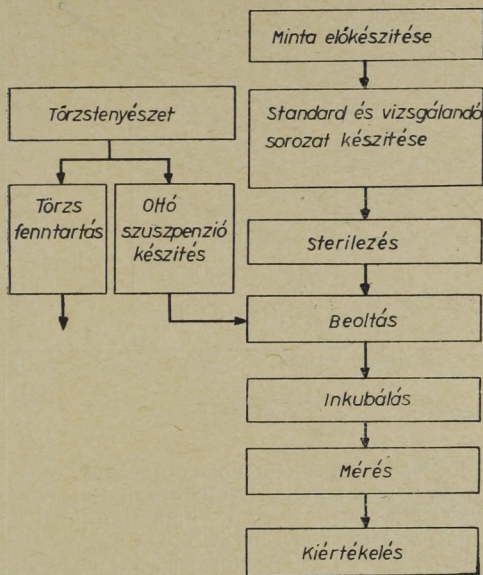
Mindkét típusban végezhetjük a mérést valamely előnyösen megválasztott időpontban a növekedés során, vagy pedig az adott vitaminkoncentrációnál elérhető teljes növekedés végén.

Itt most nem részletezem a mikrobiológiai meghatározások speciális körülményeit – a vegyszerek, a mosogatás és a steril munka vonatkozásában. Inkább néhány, gyakorlatunkban előfordult példán szeretném szemléltetni a mikrobiológiai vitaminmeghatározások egyes jellemző sajátosságait.

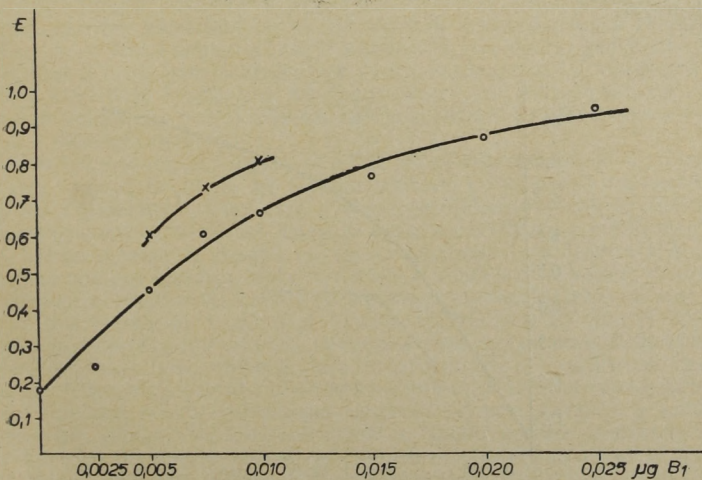
Élelmiszerekben, biológiai anyagokban a B-vitaminok rendszerint enzimalkotórészként fehérjékhez kapcsolódva találhatóak. Hogy a tesztorganizmus hozzáférjen, a vitamint le kell hasítani és az óriási feleslegben jelenlevő zavaró anyagoktól el kell különíteni. Arról, hogy a vizsgálatra előkészített anyag a vitaminon kívül nem tartalmaz-e növekedést, serkentő, vagy esetleg gátló tényezőket, a következő módon győződhetünk meg: ha a növekvő koncentrációkban vizsgált anyaggal kapott mérési eredményekből felrajzolt görbe követi a „standard görbe” menetét, akkor nincs zavaró hatás. Erre példaként bemutatom a B₁-vitaminnak lisztből történő meghatározásakor kapott görbét a standard görbével együtt (2. ábra). A kép talán még szemléletesebb, ha vízszintes tengelyen

* Elhangzott a MTA Élelmiszertudományi Bizottsága, A Magyar Élelmezésipari Tudományos Egyesület és a KÉKI közös rendezésében tartott Tudományos Kollokviumon 1971. február 26-án (Szerk.).

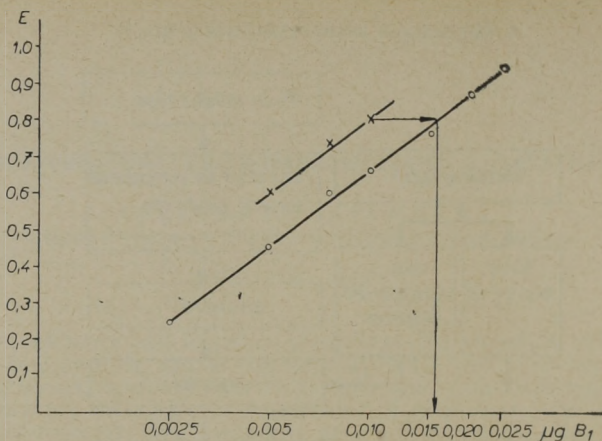
A MIKROBIOLÓGIAI VITAMINMEGHATÁROZÁS MENETE



1. ábra

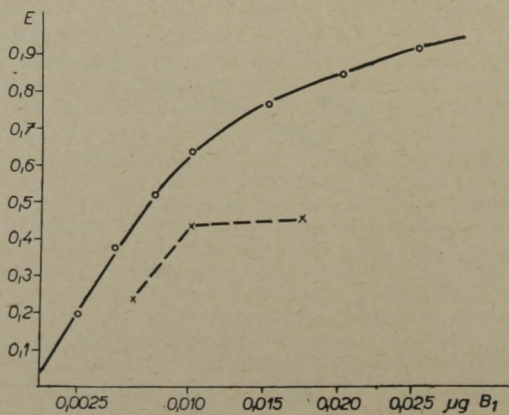


2. ábra

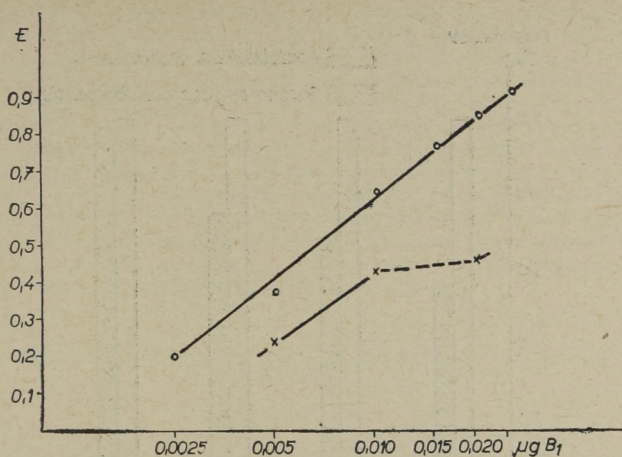


3. ábra

a vitaminkoncentrációt logaritmikus léptékben ábrázoljuk, és így nem görbéket kell összehasonlítani, hanem két egyenes párhuzamosságát nézzük (3. ábra). Érdekes jelenség, hogy teljes emberi vér B_1 -vitamintartalmát vizsgálva, ha az alvadégtáplálás heparin hozzáadásával történt, akkor nagyobb mennyiségű vér bemérésénél gátlás mutatkozik a *Lactobacillus fermenti* növekedésében. Heparin önmagában nem gátolta a *Lactobacillus fermenti* növekedését. Feltehetőleg a heparin és a vér egymáshatásából keletkezik a gátló hatást okozó anyag (4., 5. ábra). Ha az alvadégtáplálást citráttal végeztük, nem találkozunk ilyen problémával.



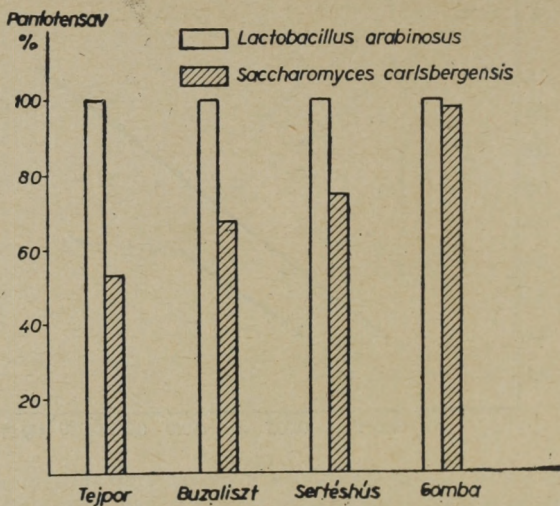
4. ábra



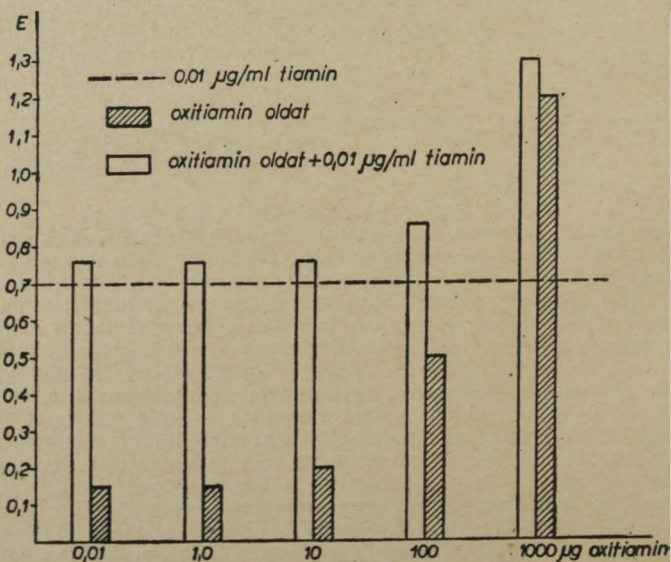
5. ábra

A meghatározáshoz a megfelelő extrakció természetesen alapvető fontosságú. A legegyszerűbb kivonási művelet során a vizsgálandó anyagot vízben vagy pufferoldatban melegítjük és a szűrletet használjuk fel vizsgálatra. Többnyire azonban savas vagy enzimes hidrolízist, vagy a kettő kombinációját alkalmazzuk. Ilyen szempontból B₆-vitamin meghatározásakor van a legkevesebb probléma. Ez ugyanis savakkal szemben igen ellenálló és In HCl-val végzett hidrolízissel célhoz jutunk. Az ellenkező véglet a pantoténsav, amely annyira érzékeny, hogy csak enzimes hidrolízist bír el. Ez azonban a kísérőanyagok problémáját élesebben veti fel, különösen nagy keményítőtartalmú anyagoknál. Egyik munkánkban a hazai gyermektápszerek pantoténsav-tartalmát vizsgáltuk és ez esetben a különböző lehetőségek közül viszonylag sok takadiasztázzal végzett enzimes hidrolízist és az ezt követő 120 °C-on történő pillanat-autoklavozást találtuk a legmegfelelőbbnek.

Az idő előrehaladásával egyre nő a különböző vitaminadatok – tápanyag-táblázatok száma. Azonban, ha összehasonlítjuk a különböző számértékeket, bizony azt tapasztaljuk, hogy ezek gyakran jelentősen eltérnek egymástól. Ez persze nem jelenti egyúttal azt, hogy az egyik megbízható, a másik megbízhatatlan, hanem egyrészt a vizsgált anyag, az élelmiszer heterogenitásából következik, másrészt azt mutatja, hogy egy bizonyos módszerrel kapott eredményt, csak ugyanazon módszerrel kapott eredménnyel szabad összehasonlítani. Általában a mikrobiológiai módszerrel kapott vitaminadatok mindig kisebbek a kémiai módszerrel kapottakénál, ugyanis a mikroorganizmusok specifikusak, a teljes, hatékony vitaminmolekulára reagálnak – míg a kémiai módszer esetleg egy jellemző csoportot tartalmazó molekulatöredéket is vitaminként mér. Sajnos, különböző mikroorganizmusok ugyanon vitamin esetében is különböző eredményeket adnak. Összehasonlítottuk a *Saccharomyces carlsbergensis*-sel, illetve *Lactobacillus arabinosus*-sal meghatározott négy különböző típusú élelmiszer (tejpor, búzaliszt, sertéshús, gomba) esetében – átlagban 10 mintával – kapott eredményeket. Azt találtuk, hogy a *Lactobacillus*-sal kapott eredmények mindig nagyobbak voltak, mint a *Saccharomyces*-sal kapottak. A különbség a szárazanyag-tartalommal fordított arányban csökkent (6. ábra).



6. ábra



7. ábra

Végül szeretném még a mikrobiológiai vitaminmeghatározásoknak egy sajátos felhasználási területét bemutatni. Mint ismeretes, antivitamin hatást fejthetnek ki egy vitamin szerkezetétől csak kismértékben eltérő vegyületek is. A tiamin legismertebb antivitaminja, a drasztikus hatású piritiamin mellett az ún. oxitiamint is ide sorolhatjuk – ebben a vegyületben a 4-es helyzetű NH_2 csoport OH csoporttal van helyettesítve és magasabbrendű állatokban B_1 -vitamin hiánytüneteket okoz. Ha e vegyületet B_1 -vitamin helyett *Lactobacillus fermenti* táptalajához a B_1 -vitamin szokásos mennyiségével azonos koncentrációban adagoltak, úgy ez hatástalannak mutatkozott, míg 100 000-szeres koncentrációban alkalmazva a mikroorganizmus erős növekedést mutatott, vagyis képes volt az oxitiamint vitaminként felhasználni (7. ábra). Ez a példa mutatja, hogy ezen az úton tovább haladva ezek a módszerek a mikroorganizmusok anyagcseréjének finomabb vizsgálatára is felhasználhatók.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ В ПРАКТИКЕ

М. Телегди-Ковач

После эскиза принципа микробиологического определения витамина, автор на практических примерах представляет широкую область применения этого метода.

На примере определения содержания витамина B_1 муки и крови автор наглядно иллюстрирует оценку возможностей ошибок. На основании определения содержания пантотеновой кислоты продукта детского питания очерчивает проблемы экстракции.

Двумя разными микробиологическими методами определил содержание пантотеновой кислоты продуктов питания разного характера и сравнил их с полученными данными.

В конце показывает на возможности испытания химиката антивитаминового действия.

MIKROBIOLOGISCHE VITAMINBESTIMMUNG IN DER PRAXIS

М. Telegdy Kováts

Nach Beschreibung des Prinzips der mikrobiologischen Vitaminbestimmungen zeigt die Verfasserin an – der Praxis entnommenen – Proben den ausgedehnten Anwendungsbereich der Methode.

Anhand der Bestimmung von Vitamin B_1 in Mehl und Blut als Beispiel, bespricht sie die Fehlermöglichkeiten der Auswertung und anhand der Bestimmung des Pantotensäuregehaltes der Kindernährmittel die Probleme der Extraktion.

Sie bestimmte weiterhin den Pantotensäuregehalt verschiedener Lebensmittel mit zwei verschiedenen mikrobiologischen Methoden und vergleicht die Resultate miteinander.

Schliesslich weist sie auf die Untersuchungsmöglichkeit einer Verbindung mit Antivitaminwirkung hin.

MICROBIOLOGICAL VITAMIN DETERMINATION IN THE PRACTICE

M. Telegdy Kováts

Subsequent to presenting the principle of microbiological vitamin determinations, the wide field of application of this method is shown by examples taken from the practice.

The possibilities of errors in the evaluation are shown by examples of the determination of vitamin B₁ in flour and in blood, while the problems emerging in the extraction procedure are discussed in connection with the determination of pantothenic acid in nutrient preparations for children.

The contents of pantothenic acid were determined in foods of various types by two different microbiological methods, and the obtained data are compared with each other.

Lastly, potential methods for the investigation of a compound with an antivitamin effect are pointed out.