

Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung

Schaffhausen, den 14. Nov. 1975

Band 4

Redaktion.
Professor Dr. E. Zollikofer, Birkenhalde 5, CH-8802 Kilchberg
Wissenschaftliche Beilage der Schweizerischen Milchzeitung

Druck, Verlag und Expedition
Kühn & Co. CH-8201 Schaffhausen

Methodik zur enzymatischen Bestimmung von Lactose, Glucose, Galactose und Lactat im Käse

von Chr. Steffen, B. Nick und B. Blanc

(Aus der Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld-Bern, Direktor: Prof. Dr. B. Blanc)

1. Einleitung

In der homofermentativen Milchsäuregärung nehmen Lactose, Glucose, Galactose und Lactat Schlüsselstellungen ein. Die Lactose wird vorerst zu Glucose und Galactose hydrolysiert, um anschliessend über den FDP-Weg zu Lactat abgebaut zu werden.

Die enzymatische Bestimmung der Zucker Lactose, Glucose und Galactose fand in der milchwirtschaftlichen Analytik bisher nur begrenzt Anwendung. Die vorliegende Arbeit soll ein Beitrag zum enzymatischen Nachweis der wichtigsten Zucker im Käse sein.

Die Methodik der enzymatischen Lactatbestimmung im Käse [4] wurde teilweise modifiziert und im Routineeinsatz für den Nachweis der beiden Lactatisomere zur Kontrolle des Gärungsverlaufes erprobt.

2. Probenaufbereitung

Die Käseproben können in luftdicht verschlossenen «Minigrip-Lagerbeuteln» tiefgefroren (-25°C) drei Monate ohne Veränderung der Metabolitenkonzentration gelagert werden. Vor dem Einwiegen müssen die Proben auf Zimmertemperatur gebracht werden.

Extraktion: 2,5 g fein geriebener Käse werden in ein Präparateglas gegeben und in ca. 10 ml dest. Wasser (4°C) homogenisiert («Polytron», Stufe 10 während ca. 20 Sekunden). Präparateglas-Durchmesser und Homogenisierstab sind so aufeinander abzustimmen, dass nur ein geringer Zwischenraum verbleibt. Das Käsehomogenisat wird unter Nachspülen mit dest. Wasser in ein 50 ml Messkölbchen überführt und bis zur Marke aufgefüllt.

Enteiuweissung: In Doppelansätzen werden je 2 ml des Käsehomogenisats mit 2 ml 1 N, gekühlter Perchlorsäure gemischt und scharf zentrifugiert.

Neutralisation: Zur Neutralisation werden dem sauren Extrakt sofort 2 ml eiweissfreier Ueberstand entnommen und

in ein bereits mit 0,5 ml 2nKOH belegtes Zentrifugenglas gegeben. Die Probe ist gut zu mischen und nach 10 Minuten kühlen im Eisbad oder Kühlschrank zu zentrifugieren (Probeverdünnung 1:50). Bemerkung: Die zur Neutralisation verwendete KOH wird mit Methylorange versetzt (KOH-Titrisolampulle mit dest. Wasser inkl. 5 ml Methylorange 0,05% ad. 500 ml).

Perchlorsäure- und KOH-Pipettierungen können in Serienuntersuchungen mit automatischen Pipettoren ausgeführt werden. Nach Enteiuweissung und sofortiger Neutralisation sind Lactose, Galactose und Glucose bei 4°C über 24 Stunden stabil. D- und L-Lactat sind sowohl in saurem als auch in neutralem Extrakt über 24 Stunden haltbar.

3. Lactose, Galactose

In der enzymatischen Lactosebestimmung wird vor und nach enzymatischer Hydrolyse der Lactose mit β -Galactosidase die Glucose oder die Galactose analysiert. D-Glucose kann mit Hilfe der Hexokinase- oder der Glucoseoxydase-Methode nachgewiesen werden. D-Galactose wird mittels der Galactose-Dehydrogenase- oder der Galactose-Oxydase-Methode bestimmt.

Für die Analytik im Käse wurde die Lactose- mit der Galactose-Bestimmung gekoppelt, wobei letztere mit der NAD-abhängigen Galactose-Dehydrogenase zu Galactonoalton umgesetzt wird. Die Messgrösse ist NADH. [3]

Reagenzien:

- Phosphatpuffer 0,2 M, pH 7,5 (+ 4mM MgSO_4)
- NAD 10 mg/ml
- β -Galactosidase 5 mg/ml
- β -Galactose-Dehydrogenase 5 mg/ml
- Lactose (-monohydrat)-Standard 21,06 mg % (= 20 mg % Lactose)
- Galactose (wasserfrei)-Standard 10 mg %

Bestimmungsansatz:

Neutrale Extrakte mit einem Galactosegehalt zwischen 0,02 und 1,0 mM (< 20 mg %) bzw. einem Lactosegehalt von < 1,0 mM (< 40 mg %) können direkt analysiert werden. Bei höheren Konzentrationen ist eine entsprechende Verdünnung erforderlich.

Für jede Messreihe muss ein Leerwert und ein Standard mitgeführt werden.

Die Enzyme und die NAD-Lösung sind in einem Kühlblock zu belassen, während der Phosphatpuffer auf Zimmertemperatur gebracht wird.

direkt in Küvetten pipettieren	Analyse	Leerwert	Standard
Puffer	ml 0,75	0,85	0,75
NAD	ml 0,05	0,05	0,05
Probe	ml 0,1	—	—
Standard	ml —	—	0,1

Mischen, Extinktion E_1 messen

Galactose-Dehydrogenase	ml	0,005	0,005	0,005
-------------------------	----	-------	-------	-------

Mischen, Stillstand der Reaktion abwarten (10—15 Minuten)
Extinktion E_2 messen

β -Galactosidase	ml	0,005	0,005	0,005
------------------------	----	-------	-------	-------

Mischen, Stillstand der Reaktion abwarten (20—30 Minuten)
Extinktion E_3 messen

Messbedingungen:

Wellenlänge 366 nm; Semimikroküvetten Glas 1 cm;
Messung bei Zimmertemperatur gegen Luft

Berechnung:

Grundlagen der Berechnung:

$$\begin{aligned}\epsilon_{\text{NADH}} &= 3,4 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol} \\ \text{MGAL} &= 180,16 \\ \text{MGLACT} &= 342,3 \\ \text{Fv} &= \text{Verdünnungsfaktor der Probe} \\ c &= \text{Konzentration } (\mu\text{Mol/g}) \\ \text{EV} &= \text{Endvolumen im Test} \\ \text{AV} &= \text{Probevolumen} \\ c &= \frac{\Delta E \times \text{EV} \times \text{Fv}}{\epsilon \times d \times \text{AV}}\end{aligned}$$

Berechnung der Galactosekonzentration:

$$\begin{aligned}\Delta E_{\text{GAL}} &= [(E_2 - E_1) \text{ PROBE}] - [(E_2 - E_1) \text{ LEERWERT}] \\ \mu\text{Mol Galactose/g Käse} &= \Delta E_{\text{GAL}} \times 2,662 \times \text{Fv} \\ \text{mg \% Galactose} &= \Delta E_{\text{GAL}} \times 48 \times \text{Fv}\end{aligned}$$

Berechnung der Lactosekonzentration:

$$\begin{aligned}\Delta E_{\text{LACT}} &= [(E_3 - E_2) \text{ PROBE}] - [(E_3 - E_2) \text{ LEERWERT}] \\ \mu\text{Mol Lactose/g Käse} &= \Delta E_{\text{LACT}} \times 2,677 \times \text{Fv} \\ \text{mg \% Lactose} &= \Delta E_{\text{LACT}} \times 91,6 \times \text{Fv}\end{aligned}$$

Genauigkeit der Methode:

Anhand von bestimmten Lactosezusätzen zu Käseproben («Standard-Käse») wurde für verschiedene Personen und an verschiedenen Tagen die Präzision der Methode ermittelt. Es konnte ein Variationskoeffizient von 2,4% errechnet werden. Aus Zusatzversuchen liess sich ein Korrelationskoeffizient $r > 0,99$ errechnen.

4. Glucose

Für die Bestimmung in Käse wurde die Glucose mit Hilfe der Glucoseoxydase-Peroxydase-Methode ausgeführt [5].

Reagenzien:

— Glucosereagenz

Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,0 enthaltend:
Glucose-Oxydase (180 $\mu\text{g/ml}$)
Peroxydase (20 $\mu\text{g/ml}$)
2,2'-Azino-di-[3-äthyl-benzthiazolin-sulfonsäure-(6)]-Ammoniumsalz (1 mg/ml)
(Biochemica Testkombination «Blutzucker»
GOD-Perid-Methode Boehringer)

— Glucose-Standardlösung 9,1 mg %

Bestimmungsansatz:

Die im Test einzusetzende, entleerte Probelösung soll nicht mehr als 20 mg % Glucose enthalten. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 mg % bzw. 0,005 $\mu\text{Mol/ml}$

	Analyse	Leerwert	Standard
Probe	0,1	—	—
Dest. Wasser	—	0,1	—
Standard 9,1 mg %	—	—	0,1
Glucose-Reagenz	5,0	5,0	5,0

Mischen. Bei Raumtemperatur stehen lassen und nach 30 Minuten in der Reihenfolge des Ansatzes messen.

Messbedingungen:

Wellenlänge 420 nm; Absaugküvette Glas 1 cm;
Messung bei Zimmertemperatur gegen Luft.

Berechnung:

Grundlagen der Berechnung:

$$\begin{aligned}E_A &= \text{Extinktion Analyse} \\ E_L &= \text{Extinktion Leerwert} \\ E_{ST} &= \text{Extinktion Standard} \\ c_{ST} &= 9,1 \text{ mg \% } 0,505 \text{ mM} \\ \text{Fv} &= \text{Verdünnungsfaktor der Probe}\end{aligned}$$

Berechnung der Glucosekonzentration:

$$\begin{aligned}\mu\text{Mol Glucose/g Käse} &= \Delta E_A \times \frac{0,505}{\Delta E_{ST}} \times \text{Fv} \\ \text{mg \% Glucose} &= \Delta E_A \times \frac{9,1}{\Delta E_{ST}} \times \text{Fv}\end{aligned}$$

Genauigkeit der Methode:

— Variationskoeffizient («Standard-Käse») = 2,0%
— Korrelation Zusatzversuche $r > 0,99$

5. L(+) - und D(—) - Lactat

Die Lactatisomere wurden mit der NAD-abhängigen L(+) - bzw. D(—) - Lactatdehydrogenase bestimmt [1, 2, 4]. Mit den bei der Firma Boehringer, Mannheim, erhältlichen Enzympräparaten wird ausschliesslich L-, bzw. D-Lactat erfasst und im alkalischen Milieu quantitativ umgesetzt. Das gebildete Pyruvat wird durch Hydrazin der Reaktion entzogen.

Die beiden Lactatbestimmungsmethoden liessen sich soweit vereinfachen, dass sie als schnelle und sichere Routinemethoden eingesetzt werden konnten.

Reagenzien:

Tris-Puffer 0,5 M pH 9,0 (+ 0,2 M Hydraziniumsulfat, 5 mM EDTA, 0,1% Albumin)

NAD 30 mg/ml

L(+)-Lactat-Dehydrogenase 5 mg/ml

D(—)-Lactat-Dehydrogenase 5 mg/ml

L-Lactat-Standard 1 mM (1 μ Mol/ml)

D-Lactat-Standard 1 mM (1 μ Mol/ml)

L-Lactat-, bzw. D-Lactatreagenz für Serienbestimmungen:
Kurz vor Gebrauch herstellen (Verbrauch pro Ansatz: 1,5 ml)

		Anzahl Bestimmungen				
		10	20	30	40	50
Tris-Puffer	ml	14,0	28,0	42,0	56,0	70,0
NAD 30 mg/ml	ml	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
L(+)-, bzw. D(—)-LDH 5 mg/ml	ml	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5

Bestimmungsansatz:

Klare Probelösungen (neutrale Extrakte) mit einem L-, bzw. D-Lactat-Gehalt zwischen 0,05 und 2,0 μ Mol/ml können direkt eingesetzt werden. (Dies entspricht bei neutralen Extrakten 1:50 einem Gehalt zwischen 2,5 und 100 μ Mol/g Käse oder ca 0,02 bis 1%).

Bei extrem niedrigen D-Lactat-Mengen wurden die Käseproben doppelt konzentriert aufgearbeitet.

In jeder Analysenserie wurden zwei Reagenzienleerwerte und eine Standardprobe analysiert.

Die Proben wurden mittels einer Mikroliterpipette (mit auswechselbarer Spitze) in kleine Präparategläser (80×10/11 mm) vorgegeben.

L-Lactat-Ansatz:	Analyse	Leerwert	Standard
Probe (neutraler Extrakt)	ml 0,05	—	—
Dest. Wasser	ml —	0,05	—
L-Lactat-Standard (1 μ Mol/ml)	ml —	—	0,05
L(+)-Lactat-Reagenz	ml 1,50	1,50	1,50

Inkubation: 60 Minuten bei Zimmertemperatur (25° C)

D-Lactat-Ansatz:	Analyse	Leerwert	Standard
Probe (neutraler Extrakt)	ml 0,05	—	—
Dest. Wasser	ml —	0,05	—
D-Lactat-Standard (1 μ Mol/ml)	ml —	—	0,05
D(—)-Lactat-Reagenz	ml 1,50	1,50	1,50

Inkubation: 60 Minuten bei Zimmertemperatur (25° C)

Der D-Lactat-Ansatz muss luftdicht verschlossen inkubiert werden! (Eine Parafilmfolie wird über die ganze Serie geklebt und bei den einzelnen Röhrchen angepresst)

Messbedingungen:

Wellenlänge 366 nm, Glasküvette 1 cm (Absaugküvette), Messung bei Zimmertemperatur gegen Luft bzw. Leerwert.

Berechnung:

Grundlagen der Berechnung:

$$\epsilon_{\text{NADH 366 nm}} = 3,4 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$$

$$\text{EV} = \text{Endvolumen Test}$$

$$\text{AV} = \text{Probevolumen}$$

$$\text{Fv} = \text{Verdünnungsfaktor der Probe}$$

$$\text{C} = \text{Lactatkonzentration } (\mu\text{Mol/g})$$

$$\text{MGLACIAI} = 90,1$$

$$\text{C}_{\text{L-, bzw. D-Lactat}} = \frac{\Delta E \times \text{EV} \times \text{Fv}}{E \times d \times \text{AV}}$$

Berechnung der Lactatkonzentration:

$$\mu\text{Mol L-, bzw. D-Lactat/g Käse} = \Delta E \times 9,118 \times \text{Fv}$$

$$\% \text{ L-, bzw. D-Lactat} = \Delta E \times 0,0822 \times \text{Fv}$$

$$\text{Lactat (Gesamt-Lactat)} = \text{L-Lactat} + \text{D-Lactat}$$

Genauigkeit der Methode:

— Variationskoeffizient («Standard-Käse») L-Lactat = 2,7%

— Variationskoeffizient («Standard-Käse») D-Lactat = 2,9%

6. Zusammenfassung

Die Aufbereitung von Käseproben für den enzymatischen Nachweis von Lactose, Glucose, Galactose, L- und D-Milchsäure wird beschrieben. Lactose und Galactose werden in demselben Ansatz mit β -Galactosidase und Galactosedehydrogenase bestimmt.

Der Glucosenachweis erfolgt mit Hilfe von Glucoseoxydase und Peroxydase.

Die Lactatisomere werden serienmässig mit der NAD-abhängigen L- bzw. D-Lactatdehydrogenase bestimmt.

Summary

The preparation of cheese samples for enzymatic determination of lactose, glucose, galactose and L(+)- and D(—) lactic acid is described. Lactose and galactose were determined at the same time with β -galactosidase and galactosedehydrogenase.

Determination of glucose was carried out by using glucoseoxydase and peroxydase.

The lactate isomers are serially determined with the NAD-dependent L(+)- respectively D(—) lactatedehydrogenase.

Résumé

La préparation des prélèvements pour la détermination enzymatique de lactose, glucose, galactose, L(+) et D(—) acide lactique est décrite. Lactose et galactose ont été déterminés dans le même processus avec β -galactosidase et galactosedéhydrogenase. La détermination du glucose a été accomplie à l'aide de glucoseoxydase et de peroxydase.

Les isomères de lactate sont déterminées en série avec les NAD-dépendants L(+)- respectivement D(—)-lactatdehydrogenase.

7. Literatur

- 1 Gawehn, K. und Bergmeyer, H. U.: D(—)-Lactat, in Bergmeyer, H. U.: «Methoden der enzymatischen Analyse», 2. Bd. 1450 (1970)
- 2 Hohorst, H. J.: L(+)-Lactat, Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase und NAD, in Bergmeyer, H. U.: «Methoden der enzymatischen Analyse», 2. Bd., 1425 (1970)
- 3 Kurz, G. und Wallenfels, K.: Lactose und andere β -D-Galactoside, in Bergmeyer, H. U.: «Methoden der enzymatischen Analyse», 2. Bd. 1147 (1970)
- 4 Steffen, C.: Methoden zur Bestimmung der Gesamtmilchsäure und der Lactatkonfiguration in Käse und Milch, Schweiz. Milchztg 97, 1073 (1971)
- 5 Werner, W., Rey, H. G. und Wielinger, H.: Ueber die Eigenschaften eines neuen Chromogens für die Blutzuckerbestimmung nach GOD/POD-Methode, Z. Anal. Chem. 252, 224 (1970)