

Spektrofotometrické sledovanie tvorby diacetylu pri kultiváciach mikroorganizmov *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

JANKA KOREŇOVÁ—MARTA JENDRICHOVSKÁ

Súhrn. Navrhli sme metódu spektrofotometrického stanovenia diacetylu v mikrobiologických kultivačných pôdach a v mlieku. Metóda zahŕňa destiláciu vodnou parou, reakciu s kreatínom v alkalickom prostredí v prítomnosti 1-naftolu a meranie absorbancie pri 525 nm. Metódu sme odskúšali pri sledovaní produkcie diacetylu kultúrou *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

Diacetyl (2,3-butándión) je prchavá látka, ktorá dodáva fermentovaným mliečnym výrobkom (smotana, jogurty, syry) charakteristickú maslovú a orieškovo-mliečnu arómu. Diacetyl produkujú niektoré mliečne baktérie, napr. *Lactococcus lactis*, *L. cremoris* a ďalšie [1]. Cieľom nášho pracoviska je izolovať mliečne baktérie s vyššou produkciou diacetylu, ktoré by sa uplatnili pri fermentácii mliečnych výrobkov. Prvým krokom bol výber vhodnej analytickej metódy na stanovenie diacetylu, ktorá by slúžila na porovnanie jeho produkcie pri približne sedemdesiatich kultúrach v zbierke mikroorganizmov VÚP. Zaviedli sme metódu spektrofotometrického stanovenia diacetylu, ktorá je vhodná pre použitie v komplexných kultivačných médiách a vo fermentovanom mlieku. Metóda je modifikáciou spektrofotometrického stanovenia diacetylu v živočíšnych tkanivách [2], ktorá sa v porovnaní s podobnými metódami stanovenia diacetylu [3] a kreatínu [4] ukázala ako najspoľahlivejšia. Jej princípom je oddestilovanie diacetylu z kvapalného prostredia vodnou parou, a následná reakcia destilátu s kreatínom v alkalickom prostredí, ktorou vzniká ružovo sfarbená zlúčenina. Intenzita sfarbenia je zvýšená a stabilizovaná prídavkom 1-naftolu. Metódu sme odskúšali na sledovaní produkcie diacetylu kultúrou *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

Ing. Janka Koreňová, Ing. Marta Jendrichovská, VÚP Bratislava, pracovisko MOD-RA, Štefánikova 45, 900 01 Modra.

Materiál a metódy

Chemikálie a roztoky. Chemikálie použité na prípravu roztokov boli čistoty p. a. a pochádzali z Lachemy Brno, diacetyl pochádza z podniku Astrid Praha. Roztoky — 3,5 % 1-naftol, 3 % NaOH, 1 % kreatín a 20 až 100 mg.l⁻¹ diacetyl — boli pripravené v destilovanej vode.

Použili sme čerstvé kravské mlieko, sterilizované autoklávovaním.

Mikroorganizmus a kultivačná pôda. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* kmeň 16 (produkujúci diacetyl) a kmeň 31 (neprodukujúci diacetyl) zo zbierky mikroorganizmov VÚP, pracovisko Modra, sme kultivovali staticky pri 30 °C v citrónanovej pôde [5].

Prístroje. Diacetyl sme z kvapalného prostredia oddestilovali vodnou parou v destilačnej jednotke prístroja Kjeltex 1002 (Tecator, Švédsko).

Absorbanciu sme namerali spektrofotometrom Spekol 11 (Carl Zeiss, Jena, Nemecko).

Výsledky

Postup stanovenia. 20 ml vzorky (napr. roztok diacetyl, odstredenú kultivačnú médium alebo mlieko) sme napipetovali do destilačnej skúmavky prístroja Kjeltex, destilovali 4 min do odmernej banky a doplnili destilovanou vodou do 200 ml. 3,5 % 1-naftol sme zmiešali s 3 % NaOH v pomere 1 : 1. 1,5 ml tohto alkalického roztoku 1-naftolu a 3,5 ml 1 % kreatínu sme pridali k 5 ml destilátu. Po 30 min pri laboratórnej teplote sme vzorku premiešali a zmerali jej absorbanciu pri 525 nm oproti destilovanej vode.

Zostrojenie kalibračnej čiary. Pripravili sme roztoky diacetyl v destilovanej vode koncentrácie 20 až 100 mg.l⁻¹. Roztoky sme spracovali uvedeným postupom. Na základe nameraných absorbancií sme metódou lineárnej regresie zostrojili kalibračnú čiaru. Kalibračná čiara bola v uvedenom intervale koncentrácií lineárna s parametrami $a = 6,23 \cdot 10^{-3}$, $b = 0,105$, $r = 0,9975$; $s_r = 2,0$ až 5,1 %, $A_{525} = a \cdot c \text{ [mg.l}^{-1}] + b$ (r je korelačný koeficient, s_r smerodajná odchýlka). Koncentráciu diacetyl teda možno vypočítať pomocou vzorca

$$c \text{ [mg.l}^{-1}] = \frac{A_{525} - 0,105}{6,23 \cdot 10^{-3}}.$$

Stanovenie v kultivačnej pôde. Do citrónanovej pôdy sme pridali diacetyl do koncentrácie 20 až 100 mg.l⁻¹ a naočkovali sme kultúru *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 31, ktorá neprodukuje diacetyl. Po narastení kultúry do začiatku stacionárnej fázy sme mikroorganizmus odcentrifugovali. Supernatanty sme spracovali uvedeným postupom a pomocou vzorca sme vypočítali koncentráciu diace-

tylu. Pri koncentráciách 20 až 50 mg.l⁻¹ sme stanovili 97 až 103 % skutočne pridaného množstva diacetylu. Pri koncentráciách 50 až 100 mg.l⁻¹ sme stanovili 91 až 97 % skutočne pridaného množstva diacetylu.

Stanovenie v mlieku. Do mlieka sme pridali známe množstvo diacetylu a časť vzoriek sme okyslili 10 % HCl na pH 4,7, čo je izoelektrický bod mliečnej bielkoviny kazeínu. Vzorky sme scentrifugovali a v supernatante sme stanovili diacetyl opísaným postupom. Výsledky uvádza tab. 1.

Tabuľka 1. Stanovenie známeho množstva diacetylu pridaného do kravského mlieka, pH vzoriek sme upravili na 4,7 pomocou 10 % HCl.

Table 1. Determination of the known amount of diacetyl added to cow milk. pH was adjusted to 4.7 with 10% HCl

Vzorka mlieka ¹	pH	Pridavok diacetylu ² [mg.l ⁻¹]	Stanovený diacetyl ³ [mg.l ⁻¹]	%
Pôvodná ⁴	6,5	0	0	—
Upravená ⁵	4,7	0	0	—
Pôvodná ⁴	6,5	41,5	37,5	90,36
Upravená ⁵	4,7	41,5	35,3	85,06

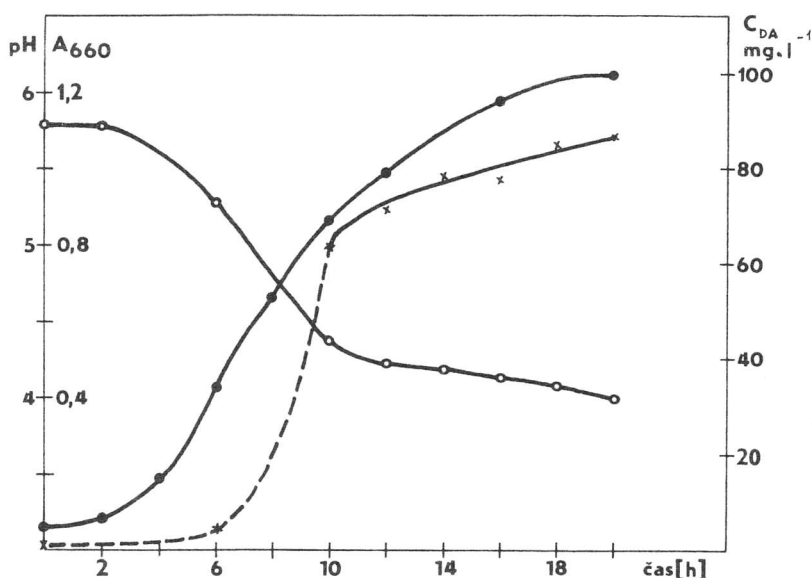
¹Sample of milk; ²Diacetyl added; ³Diacetyl determined; ⁴Original; ⁵Adjusted.

Příklad použitia navrhnutého postupu. Navrhnutý postup stanovenia diacetylu sme odskúšali kultiváciou kmeňa *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 16, ktorý produkuje diacetyl na citrónanovej pôde. Výsledky uvádza obrázok 1.

Diskusia

Výskum mliečnych baktérií produkujúcich diacetyl vyžaduje rýchlu a technicky nie príliš náročnú metódu stanovenie diacetylu v rôznych kultivačných médiách vrátane fermentovaného mlieka. Navrhnutá spektrofotometrická metóda spĺňa tieto požiadavky pre bežnú charakterizáciu kultúr mliečnych baktérií. Percentuálne množstvo diacetylu stanovené v kultivačnom médiu i v mlieku postačuje pre tento účel. Pre absolútne analytické stanovenie diacetylu odporúčame špeciálnu kalibráciu pre každé použité médium.

Metóda stanovenia diacetylu po destilácii sa ukázala ako dostatočne reprodukovateľná a spoľahlivá. Stanoviteľná koncentrácia diacetylu vo vzorke je 10—150 mg.l⁻¹. Roztok 1-naftolu treba pripravovať čerstvý pred každým stanovením, lebo na svetle rýchlo tmavne, roztoky kreatínu a diacetylu treba tiež chrániť pred svetlom a uchovávať v chlade maximálne 1 týždeň.



Obr. 1. Statická kultivácia kmeňa *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 16 na citrónanovej pôde pri 30°C počas 20 h, závislosť pH, rastu kultúry vyjadreného ako absorbancia a koncentrácie diacetyl na čase.



Fig. 1. Statical cultivation of the strain *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* in citrat medium at 30°C during 20 h, time dependence of pH, culture growth expressed as absorbance and diacetyl concentration.

Zaradenie kroku destilácie vodnou parou zaručuje dostatočnú selektivitu metódy oproti iným podobným metabolitom s vyššou teplotou varu, keď diacetyl má teplotu tvaru 88°C a, napríklad, acetoín 148°C. Použitie destilačnej jednotky prístroja Kjeltec výrazne urýchľuje túto operáciu a umožňuje spracovanie väčšieho počtu vzoriek.

Literatúra

1. BOTTAZZI, V., In: Biotechnology, Vol. 5 (G. Reed, Ed.). Weinham, Verlag Chemie, 1983, s. 352.
2. MATTESSICH, J.—COLLINS, E. B., Anal. Biochem., 180, 1989, s. 349.
3. TEPLÝ, M.: Čisté mlékařské kultury. Praha, SNTL 1984, s. 175.
4. DAVÍDEK, J.: Laboratorní příručka analýzy potravin. Praha, SNTL 1981, 219 s.
5. HARVEY, R. J.—COLLINS, E. B., J. Bacteriol., 82, 1961, s. 954.

Do redakcie došlo 6. 2. 1992

Spectrophotometric determination of diacetyl produced during the cultivation of the microorganisms *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

Summary

A method for spectrophotometric determination of diacetyl in microbiological culture media and in milk is described. The method involves distillation with steam, reaction with creatine in alkaline environment in the presence of 1-naphtol, and measurement of absorbance at 525 nm. The method was tested by monitoring diacetyl production by a strain *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

Спектрофотометрическое наблюдение за образованием диацетила при культивации микроорганизмов *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

Резюме

Мы разработали метод спектрофотометрического определения диацетила в микробиологических питательных средах и в молоку. Метод включает в себя дистилляцию водным паром, реакцию с креатином в щелочной среде в присутствии 1-нафтола и измерением поглощения при 525 нм. Метод мы проверили при наблюдении за образованием диацетила штамом *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.