

# Ringversuch "Qualitativer Nachweis der Lactoperoxidase in Milch"

Autor(en): **Bosset, Jacques Olivier / Bütikofer, Ueli / Eberhard, Pius**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **90 (1999)**

Heft 3

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-981785>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# Ringversuch «Qualitativer Nachweis der Lactoperoxidase in Milch»

Jacques Olivier Bosset, Ueli Bütikofer, Pius Eberhard und Bruno Nick  
Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft (FAM), Liebefeld-Bern

Paul Eugen Walser  
Chemisches Laboratorium des Kantons Graubünden, Chur

Eingegangen 26. März 1999, angenommen 26. April 1999

## Einführung

Das Inkrafttreten der europäischen Richtlinie 92/46 zeigt die zunehmende Wichtigkeit der Qualitätskontrolle hinsichtlich der thermischen Behandlung der Milch. Ausser den gesundheitlichen oder hygienischen Aspekten muss die Übereinstimmung der Warendeklaration (Milch pasteurisiert oder ultrahoherhitzt) mit analytischen Methoden geprüft werden können.

Einige analytische Kriterien stehen zurzeit für die Kontrolle und Charakterisierung erhitzter Milch (Heisshaltezeit/Temperatur) zur Verfügung (1). Während der Sterilisierung und UHT-Erhitzung (2) werden Lactulose und Maillard-Produkte (3), wie z. B. das Furosin (4), erzeugt. Für schwache thermische Belastungen wie die Thermisierung und Pasteurisierung verfügt man über adäquatere Methoden wie die Bestimmung der Molkenproteine ( $\beta$ -Lactoglobulin) oder die Inaktivierung der milcheigenen Enzyme alkalische Phosphatase, Adenosin-Desaminase (5) und Lactoperoxidase (6–7).

Während die alkalische Phosphatase für die Kontrolle einer genügenden Pasteurisierung (phosphatasen negativ) eingesetzt wird, erlaubt die Bestimmung der hitzestabileren Lactoperoxidase (8–10), die Pasteurisierung in «low heat», «medium heat» und «high heat» (11) zu unterscheiden. Mit dieser Methode kann bei phosphatasen negativen Proben eine robuste, empfindliche und zuverlässige Abschätzung der Pasteurisierung durchgeführt werden. Die Nachweisgrenze für die Lactoperoxida-

se-Bestimmung ist gut bekannt und liegt bei einem Denaturierungsgrad von 90 % (6). Obwohl die Aktivität der Lactoperoxidase von vielen Faktoren abhängt und beim Einzelgemelk um bis zu 50 % variieren kann (12), genügt zur Beurteilung der Hitzebehandlung der Mischmilch der Nachweis der Restaktivität. Ziel des durchgeführten Ringversuches war die Validierung der qualitativen Lactoperoxidase-Bestimmung in Milch (13). Diese Methode hat den Charakter einer Konventionalmethode. Sie wurde von der FAM leicht abgeändert und soll ins Schweizerische Lebensmittelbuch aufgenommen werden. Zwei Aspekte wurden speziell geprüft: i) Die nachweisbare Inaktivierungstemperatur (für eine Heisshaltezeit von 20 s) und ii) der Anteil thermisierter Rohmilch, der in UHT-Milch noch bestimmt werden kann.

Zur Untermauerung der Resultate wurden die Proben in einem Labor parallel auch mit einer photometrischen Methode unter Verwendung eines Klärungsreagenzes (11) gemessen. Mit dieser automatisierbaren Methode lässt sich der Lactoperoxidasegehalt quantifizieren.

## Experimenteller Teil

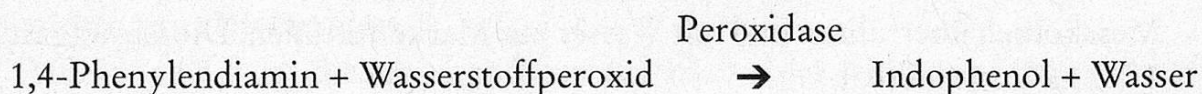
### *Probenmaterial und -vorbereitung*

Zwei Serien von Milchproben wurden vorbereitet. Die erste Serie bestand aus bei 68 °C thermisierter Milch, gemischt in unterschiedlichen Verhältnissen mit UHT-Milch aus dem Handel (Tabelle 1, Probennummer 1–5). Die zweite Serie bestand aus derselben thermisierten Milch, die stufenweise bei verschiedenen Temperaturen im Temperaturbereich von 77 bis 81 °C während 20 s pasteurisiert wurde (Tabelle 1, Probennummer 6–10).

Diese 10 Proben wurden als verschlüsselte Doppelproben ( $n = 20$ ) in 30-ml-Braunglas-Fläschchen per Express an die 7 teilnehmenden Laboratorien verschickt und alle am gleichen Tag untersucht.

### *Prinzip der Bestimmung*

Peroxidase baut Wasserstoffperoxid ab. Der dabei freigesetzte atomare Sauerstoff oxidiert die farblose 1,4-Phenylendiaminlösung zu violetter Indophenol. Die Farbsättigung verhält sich proportional zur Enzymkonzentration. Spuren von Kupferionen (Milch aus Kupferbehältern) bewirken eine positive Reaktion. Zur Hemmung einer solchen nichtenzymatischen Katalyse wird EDTA zugesetzt. Die EU-Methode (13) wurde leicht modifiziert, indem eine wesentlich kleinere Konzentration des 1,4-Phenylendiamins und zusätzlich EDTA verwendet wurde.





**Tabelle 1**  
**Analysierte Proben**

<i>Nr.</i>	<i>Codierung</i>	<i>Beschreibung</i>
1	10, 11	Thermisierte Milch (68 °C)
2	9, 12	90 % UHT-Milch + 10 % thermisierte Milch (1:10)
3	8, 13	95 % UHT-Milch + 5 % thermisierte Milch (1:20)
4	7, 14	97,5 % UHT-Milch + 2,5 % thermisierte Milch (1:40)
5	6, 15	100 % UHT-Milch
6	1, 20	Pastmilch 77 °C während 20 s
7	2, 19	Pastmilch 78 °C während 20 s
8	3, 18	Pastmilch 79 °C während 20 s
9	4, 17	Pastmilch 80 °C während 20 s
10	5, 16	Pastmilch 81 °C während 20 s

### *Modifizierte EU-Méthode*

#### Reagenzien

- 1,4-Phenylendiamin, z. B. Merck 807 246
- Wasserstoffperoxid 300 g/kg
- Schwefelsäure 950–970 g/kg
- EDTA-Dinatriumdihydrat (Titrplex III), molare Masse 372,24, z. B. Merck 8418
- 1,4-Phenylendiaminlösung:  
2,0 g 1,4-Phenylendiamin in einen Erlenmeyerkolben geben und mit ca. 60 ml Wasser von ungefähr 50 °C lösen. In einen 100-ml-Messkolben überführen und bei Raumtemperatur mit Wasser zur Marke auffüllen. Mindestens 2 Tage vor Gebrauch herstellen. Innerhalb von 1–2 Tagen bildet sich ein Niederschlag, der zu entfernen ist. Kühl und lichtgeschützt lagern; Haltbarkeit: ca. 2 Monate bei 4 °C.
- Wasserstoffperoxidlösung:  
9 ml Wasserstoffperoxid mit Stabpipette in einen 100-ml-Messkolben pipettieren. Mit einer Kolbenhubpipette 0,1 ml Schwefelsäure hinzufügen und mit Wasser zur Marke auffüllen. Haltbarkeit: 1 Monat bei 4 °C.
- EDTA-Lösung:  
190 mg EDTA-Dinatriumdihydrat in ca. 50 ml Wasser lösen, in einen 100-ml-Messkolben überführen und mit Wasser zur Marke auffüllen. Die Lösung ist bei 4 °C 1 Monat haltbar.

## Ausführung

Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (22–25 °C) einstellen. In ein 20-ml-Reagenzglas (ø 22 mm) 5 ml Milchprobe (Stabpipette) und 0,5 ml EDTA-Lösung zugeben und mit einem Vortexer mischen. Dann 0,1 ml Wasserstoffperoxidlösung hinzufügen und wieder mit dem Vortexer mischen. Noch 0,05 ml Phenylendiaminlösung hinzugeben, sofort mischen und die Stoppuhr starten.

Die Analysen wurden einfach ( $n = 1$ ) ausgeführt, und der Farbumschlag wurde sowohl nach 30 als auch nach 60 s abgelesen.

## *Photometrische Methode mit Klärungsreagenz*

### Reagenzien

- 1,4-Phenylendiamin, z. B. Fluka 78429
- Wasserstoffperoxid 300 g/kg
- Guaiacol, z. B. Merck 4212
- Piperazin, z. B. Merck 7325
- «Réactif pour la transparence de milieux biologiques», Prolabo 27357.232, F-94120 Fontenay sur Bois
- 1,4-Phenylendiaminlösung:  
1,0 g 1,4-Phenylendiamin in 15 ml Wasser lösen und mit einer Lösung von 2 g Guaiacol in 135 ml Ethanol vereinigen.
- Wasserstoffperoxidlösung, 50 mmol/l:  
5,7 g Wasserstoffperoxid in einem 100-ml-Messkolben mit Wasser verdünnen.
- Piperazin-Puffer, 25 mmol/l:  
215 mg Piperazin in 100 ml Wasser lösen und mit Salzsäure 1 mol/l auf pH 6,4 einstellen.
- Milch-Blindprobe:  
UHT-Milch vom Markt 120 s aufkochen.

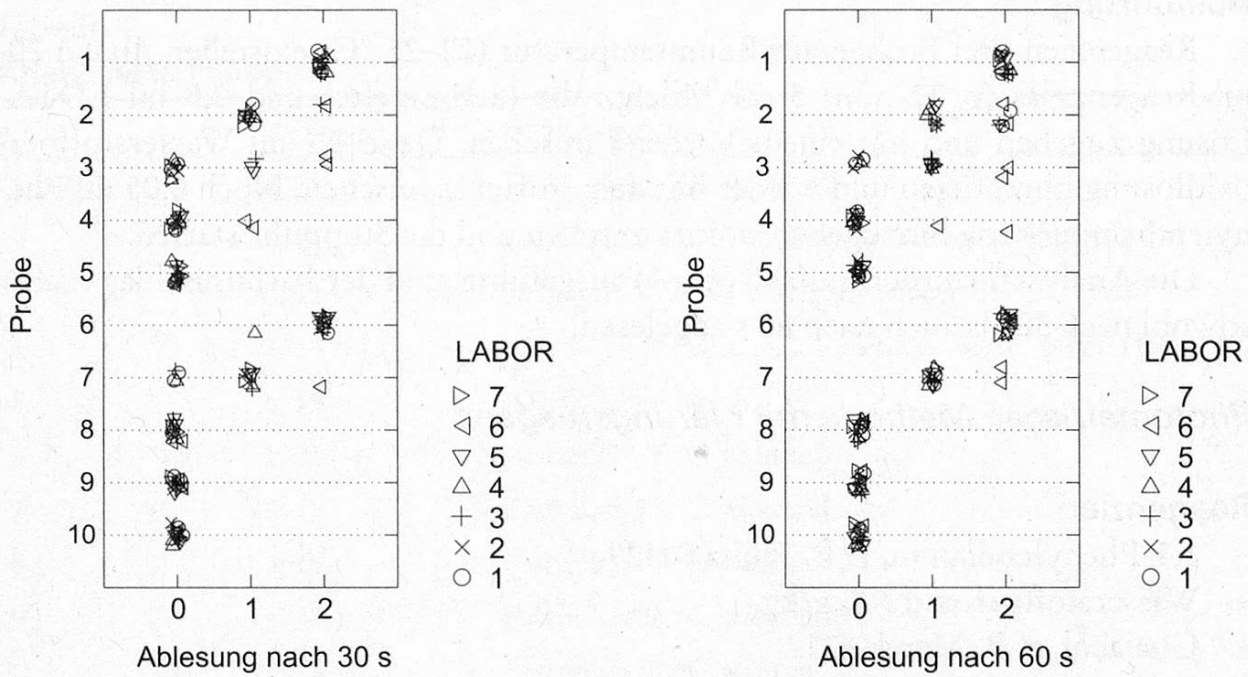
## Ausführung

In einem verschliessbaren Reagenzglas 200 µl Milch-Blindprobe vorlegen. 50 µl Probe, 1 ml Piperazinpuffer, 100 µl 1,4-Phenylendiaminlösung und 100 µl Wasserstoffperoxidlösung dazugeben. Reagenzglas leicht schütteln und nach 120 s 2 ml «Réactif pour la transparence» zusetzen. Die Probe nun intensiv schütteln und 120 s in einem Wasserbad bei 37 °C inkubieren. Die geklärte Lösung nach spätestens 10 Minuten mittels Spektralphotometer bei 560 nm in einer 1-cm-Küvette gegen den Reagenzien-Blindwert der Milch-Blindprobe messen.

## Resultate und Diskussion

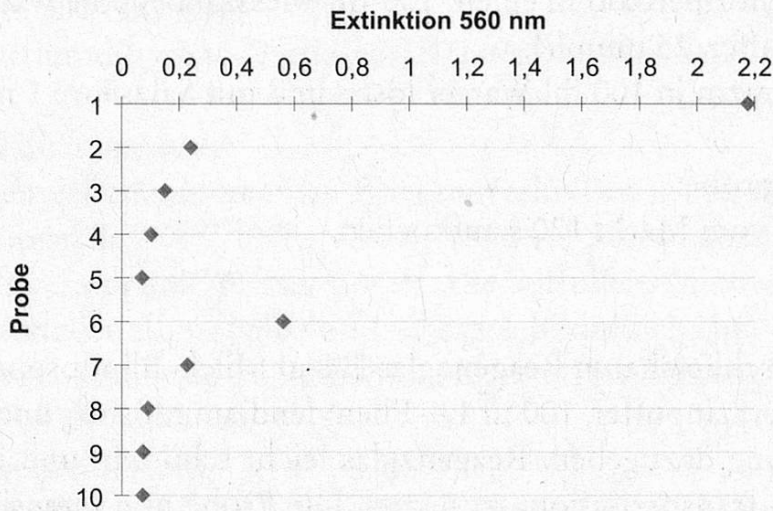
Abbildung 1 zeigt die erzielten Resultate nach einer Ablesezeit von 30 s bzw. nach 60 s.





Legende: 0 = negativ, 1 = schwach positiv, 2 = positiv  
 Für die Probenidentifikation siehe Tabelle 1

Abbildung 1 Verteilung der Resultate bei der qualitativen Bestimmung der Milch-Peroxidase nach 30 s (links) und nach 60 s (rechts)



Legende: Für die Probenidentifikation siehe Tabelle 1

Abbildung 2 Quantitative Resultate der Methode mit Klärungsreagens

Die bei 68 °C thermisierte und die bei 77 °C pasteurisierte Milch wurde in allen Fällen als peroxidasepositiv sowie UHT-Milch mit einem Zusatz von 10 % thermisierter Milch als schwach positiv oder positiv beurteilt. Pastmilch mit einer Pasteu-

risationstemperatur von 78 °C wurde bei einer Ablesezeit von 30 s von 29 % (bzw. 0 % nach 60 s) der Laboratorien als peroxidase negativ bewertet. UHT-Milch mit einem Zusatz von 5 % thermisierter Milch wurde bei einer Ablesezeit von 30 s von 64 % (bzw. 36 % nach 60 s) der Laboratorien, UHT-Milch mit einem Zusatz von 2,5 % thermisierter Milch von 86 % der Laboratorien als peroxidase negativ nach 30 und 60 s angegeben. UHT-Milch und Pastmilch mit einer Pasteurisationstemperatur von 79 °C bis 81 °C waren in allen Fällen peroxidase negativ.

In der Abbildung 2 sind die quantitativen Resultate mit der photometrischen Methode unter Verwendung des Klärungsreagenzes dargestellt. Weil die Enzymaktivität von Lactoperoxidase in der Regel über ein anderes Substrat bestimmt werden muss (Oxidation von Iodid zu Iod (14)), wurde darauf verzichtet, eine Umrechnung auf Internationale Enzymeinheiten vorzunehmen. Es lässt sich folgern, dass bei einer Pasteurisation bei  $\leq 78$  °C während 20 s bzw. bei einem Anteil von  $\geq 10$  % thermisierter Milch in UHT-Milch ein Extinktionsschwellenwert von  $0,20 E_{560}^{1\text{cm}}$  sicher überschritten wird.

### Schlussfolgerung

Aufgrund der Resultate kann gefolgert werden, dass die Lactoperoxidase mit dem modifizierten Schnelltest mit oder ohne Verwendung eines Klärungsreagenzes bei Zusätzen von 10 % thermisierter Milch in UHT-Milch sicher bestimmt werden kann und bereits eine Pasteurisationstemperatur von 79 °C während 20 s zu eindeutig negativen Resultaten führt. Dieser Zusammenhang wird durch die Abbildung 3 veranschaulicht, wobei die dargestellten Abbaukurven aus den Literaturdaten (15) rekonstruiert wurden.

Bei der im Ringversuch geprüften Methode ohne Verwendung des Klärungsreagenzes ist eine Ablesung nach 60 s deutlich empfindlicher und führt zu klareren Resultaten. Die Bestimmung nach 60 s ist deshalb zu empfehlen.

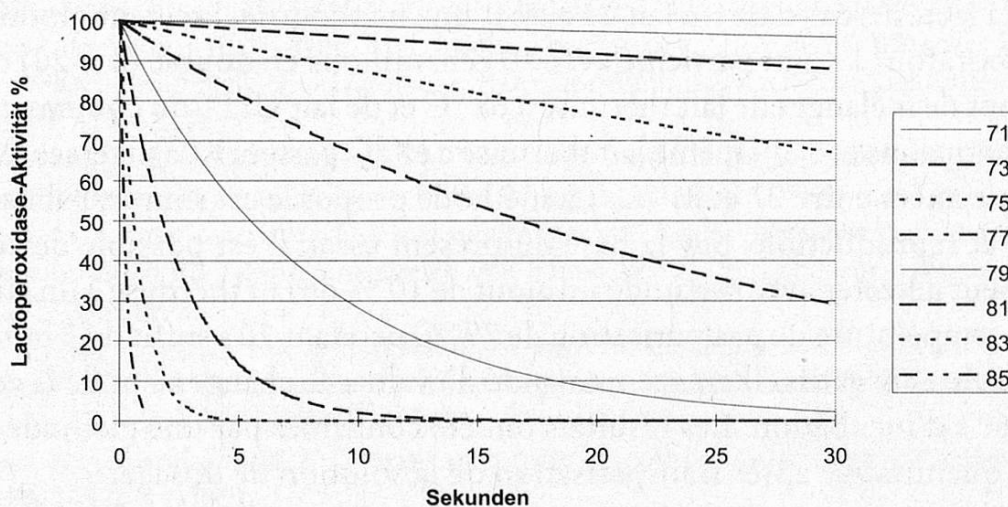


Abbildung 3 Abbau der Lactoperoxidase bei verschiedenen Pasteurisierungstemperaturen (°C) gemäss (15)



## Dank

Die Autoren danken *R. Gauch* und *W. Strahm* für ihre technische Assistenz, *Dr. R. Sieber* für die sorgfältige Begutachtung des Manuskripts sowie den Teilnehmern des Ringversuchs: ELSA, Estavayer Lait SA, C.P. 29, 1470 Estavayer-le-Lac (*M. Häberli*); Toni AG, Sparte Milch / QSL, Förrlibuckstrasse, 8037 Zürich (*M. Schmid*); Kantonales Labor, Vonmattstrasse 16, 6002 Luzern (*R. Schmid*); Kantonales Labor, Kapuzinerstrasse 9, 4500 Solothurn (*Dr. W. Bussmann*); Kantonales Labor, 7000 Chur; Molkereischule Rütli, 3052 Zollikofen (*H.-U. Markwalder*) und FAM, Liebefeld-Bern.

## Zusammenfassung

Ein Ringversuch für die qualitative Bestimmung der Lactoperoxidase in Milch wurde mit einer leicht modifizierten Methode durchgeführt. Insgesamt haben 7 Laboratorien an diesem Vergleich teilgenommen. Der Test wurde mit 10 kodierten Doppelproben ( $n = 20$ ) ausgeführt: 5 Proben bestanden aus verschiedenen Gemischen von bei 68 °C thermisierter Milch mit UHT-Milch und 5 Proben aus thermisierter Milch, die während 20 s bei Temperaturen stufenweise zwischen 77 bis 81 °C pasteurisiert wurde. Die vorgeschlagene Methode ist robust, einfach, gut wiederhol- und reproduzierbar. Aufgrund dieser Resultate kann gefolgert werden, dass die Lactoperoxidase bei Zusätzen von 10 % thermisierter Milch in UHT-Milch sicher bestimmt werden kann und eine Pasteurisationstemperatur von 79 °C während 20 s bereits zu negativen Resultaten führt. Es wird empfohlen, die Ablesung des Farbumschlags nach einer Inkubationszeit von 60 s vorzunehmen. Die Resultate konnten mit einer quantitativen photometrischen Methode unter Verwendung eines Klärungsreagenzes bestätigt werden.

## Résumé

Un essai interlaboratoire a été effectué pour tester la méthode de détection qualitative de la lactoperoxydase du lait à l'aide d'une méthode légèrement modifiée. Au total, 7 laboratoires y ont participé avec 10 échantillons en double ( $n = 20$ ) codés: 5 provenaient de mélanges de lait thermisé à 68 °C et de lait UHT du commerce en diverses proportions et 5, du même lait thermisé à 68 °C pasteurisé à diverses températures échelonnées entre 77 et 81 °C. La méthode proposée est simple, robuste, bien répétable et reproductible. Sur la base du présent essai, il est possible de conclure que l'on peut détecter avec certitude un ajout de 10 % de lait thermisé à un lait UHT et qu'une température de pasteurisation de 79 °C pendant 20 s suffit déjà pour obtenir des résultats négatifs. Il est recommandé d'évaluer le changement de la coloration après 60 s d'incubation. Les résultats ont été confirmés par une méthode photométrique quantitative après transparation de la solution de dosage.



## Summary «Collaborative Test on the Qualitative Detection of Lactoperoxidase in Milk»

A collaborative study of the qualitative detection of lactoperoxidase in milk was carried out using a slightly modified method. In total, seven laboratories have participated in this trial with ten coded samples in duplicate ( $n = 20$ ): 5 samples were prepared by mixing a thermized milk (68 °C) with an industrial UHT milk at various ratios, and 5 samples were prepared by pasteurizing the same thermized milk stepwise at different temperatures in the range from 77 up to 81 °C. The detection method proposed is simple, robust, repeatable and reproducible. The results obtained lead to the following conclusions: it is possible to detect lactoperoxidase by adding at least 10 % thermized milk to UHT milk, whereas a pasteurization at 79 °C for 20 s already gives negative results. It is recommended to evaluate the colour change after 60 s of incubation. The results were confirmed by a quantitative photometric assay using a clarifying reagent.

### Key words

Lactoperoxidase, Qualitative analysis, Collaborative test, Milk, Pasteurization

### Literatur

- 1 Villamiel, M., Arias, M., Corzo, N. and Olano, A.: Use of different thermal indices to assess the quality of pasteurized milks. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch* **208**, 169–171 (1999).
- 2 Pellegrino, L., Resmini, P. and Luf, W.: Assessment (indices) of heat treatment of milk. Heat-induced changes in milk. *Internat. Dairy Federation (Fox, P.F., ed.), Ed. 2*, 409–453, Bruxelles 1995.
- 3 Pischetsrieder, Monika, Gross, Ursula and Schoetter, Christiane: Detection of Maillard products of lactose in heated or processed milk by HPLC/DAD. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch* **208**, 172–177 (1999).
- 4 Eberhard, P. und Bütikofer, U.: Das Furosin als Hitzeindikator. *Schweiz. Milchztg.* **124** (41), 11 (1998).
- 5 Schlimme, E., Kiesner, C., Lorenzen, P. Chr. and Martin, D.: Influence of heat treatment of milk on the activities of indigenous milk enzymes alkaline phosphatase and adenosine deaminase. In: *The use of enzymes in dairying*. *Bull. Intern. Dairy Fed.* no 332, 25–31, Bruxelles 1998.
- 6 Eberhard, P., Strahm, W. und Gallmann, P.U.: Konsummilch nach EU-Richtlinien. *Agrarforschung* **4**, 420–422 (1997).
- 7 Hernandez, M.C.M., Markwijk, B.W.V. and Vreeman, H.J.: Isolation and properties of lactoperoxidase from bovine milk. *Neth. Milk Dairy J.* **44**, 213–231 (1990).
- 8 Olszewski, E. und Reuter, H.: Das Inaktivierungs- und Reaktivierungsverhalten der Lactoperoxidase in Milch im Temperaturbereich von 50 bis 135 °C. *Z. Lebensm.-Untersuch.-Forsch.* **194**, 235–239 (1992).
- 9 Meyer, J.M.: Vergleichende Untersuchungen zur Hitzestabilität von originären Enzymen,  $\beta$ -Lactoglobulin und Vitaminen in Milch und daraus hergestellten Ultrafiltrationsretentaten. *Dissertation ETH Zürich Nr. 11460* (1996).
- 10 Kumar, Rajesh and Bhatia, K.L.: Standardization of method for lactoperoxidase assay in milk. *Lait* **79**, 269–274 (1999).
- 11 Guingamp, Marie-France, Blel, M., Gaillard, J.-L., Gaillard et Humbert, G.: A rapid method for peroxidase activity in heated milk with the Clarifying Reagent®. In: *Proceedings of the Sym-*

- posium Euro Food Chem IX, September 24–26, 1997, Interlaken (Switzerland), Vol. 2, 353–356 (1997).
- 12 *Kiermeier, F. und Kayser, Ch.*: Zur Kenntnis der Lactoperoxydase. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **112**, 481–498 (1960).
  - 13 *Anonym. III.* Bestimmung der Peroxidaseaktivität. In: *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften*, Nr. L93/19, 34. Jahrgang vom 13. April 1991, Rechtsvorschriften, Ausgabe in deutscher Sprache, ISBN 0376-9453.
  - 14 *Anonym.* (Manual of the) Worthington Biochemical Corporation, USA-Lakewood NJ (1999).
  - 15 *Estalayo, J.J., Estepar, J. and Ena, J.M.*: Kinetic Parameters for Denaturation of Bovine, Ovine and Caprine Milk Lactoperoxidase. In: *Proceedings of the Symposium Euro Food Chem IX*, September 24–26, 1997, Interlaken (Switzerland), Vol. 2, 394 (1997).

Korrespondenzadresse: Dr. Jacques Olivier Bosset, Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld, CH-3003 Bern, E-Mail: jacques-olivier.bosset@fam.admin.ch