

ATP-biolumineszcencia: egy lehetőség a higiénés gyorsellenőrzés és a HACCP program megvalósításához*

Nógrádi Sándor

Servitec Kft., Tata

Érkezett: 1997. április 15.

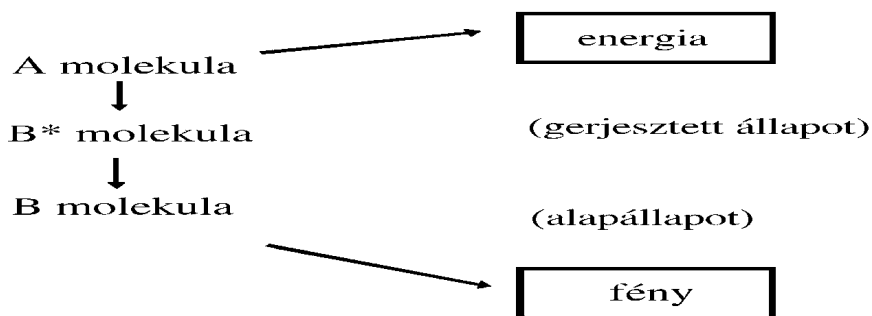
Az élelmiszeripar különböző ágazataiban kiemelkedően fontos a technológiai berendezések tisztaságának, higiénés állapotának következetes ellenőrzése. Az Európai Unióban a HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) program élelmiszergyártókra érvényes kötelező kidolgozása és végrehajtása - végrehajtatása - tulajdonképpen az Élelmiszertörvény által kikényszerített intézkedés. A hagyományos mikrobiológiai vagy kémiai vizsgálatok idő- és munka-, valamint felszereltség igényessége miatt a vizsgálati eredmények termelésbe való gyors visszacsatolása mindig is problémát jelentett. Míg a beltartalmi paraméterek gyorsvizsgálatánál a közeli infravörös spektroszkópia (NIR/NIT) jelentheti a megoldást, addig a mikrobiológiai-higiéniai ellenőrzések esetében az ATP-biolumineszcencia rohamos elterjedése várható.

A mérési módszer elvi alapjai

A vizsgálat elve két alappilléren nyugszik:

1. Lumineszcencia, biolumineszcencia

A lumineszcencia olyan kémiai folyamat, ahol a molekula energia hatására gerjesztett állapotba kerül, majd alapállapotába visszajutva, fényt bocsát ki (1. ábra).



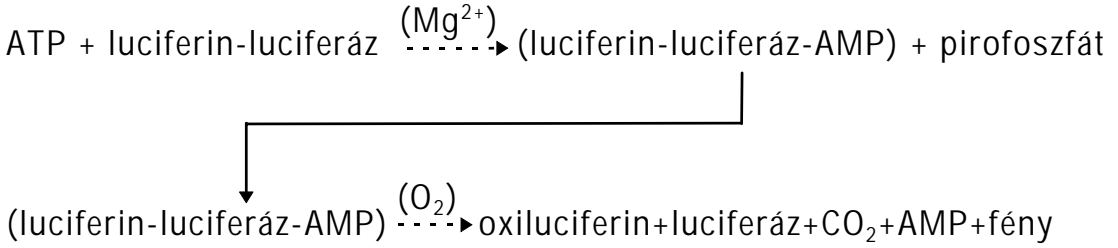
1. ábra: A lumineszcencia folyamata

* A Nagykőrösi Konzervipari Napok tudományos tanácskozáson, 1996. május 13-14-én elhangzott előadás kézírata alapján.

Kemolumineszcencia esetén tisztán kémiai reakcióról beszélünk. Ezen biokémiai folyamatban a katalizátor szerepét egy enzim, a luciferáz tölti be.

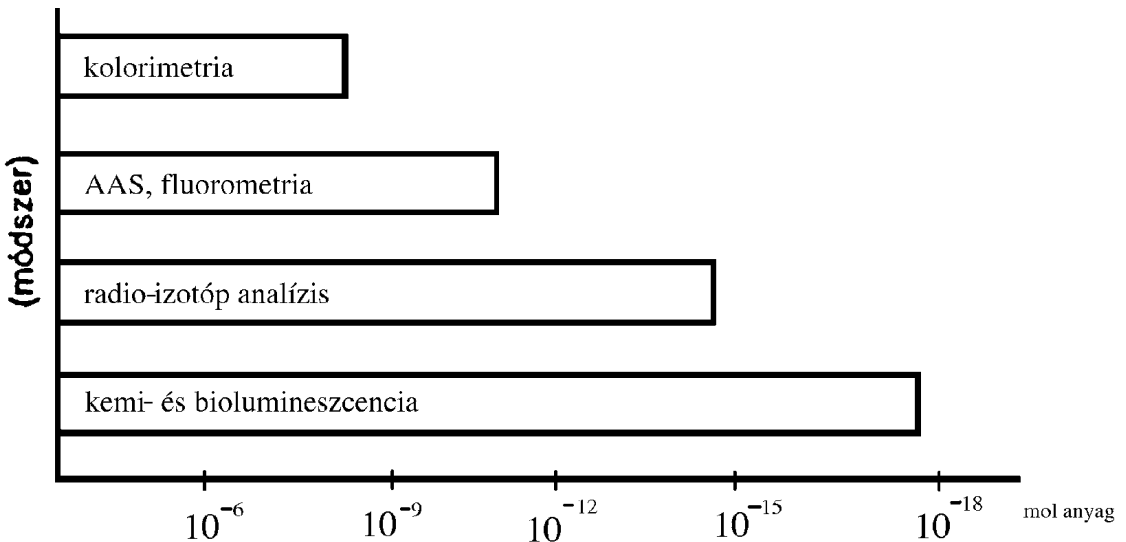
2. Az ATP biolumineszcens reakciója

A minden élő sejtben megtalálható adenosin-trifoszfát (ATP) a biokémiai reakció során luciferin-luciferáz enzimpreparátum hatására lebomlik, miközben biolumineszcencia (fénykibocsátás) történik. A folyamatot a 2. ábra szemlélteti. A kibocsátott fény - műszeresen - lumino-méter segítségével detektálható. A fény intenzitása az ATP koncentrációval, tehát a rendszerben lévő sejtek mennyiségével szoros korrelációban van.



2. ábra: ATP-meghatározás biolumineszcens reakcióval

A luminometriás mérési módszerek érzékenysége a 3. ábrán látható. Ennek alapján kézenfekvőnek tűnik, hogy rendkívül kis mennyiségű ATP jelenléte már nagy biztonsággal kimutatható. Legnagyobb előnye a mérési módszernek azonban az, hogy a reakció 10 másodpercen belül lejátsszódik, tehát egy rendkívül érzékeny és gyors vizsgálati módszer áll rendelkezésünkre.



3. ábra: Analitikai módszerek érzékenysége

Minden vizsgálandó élelmiszermintában gyakorlatilag három különböző forrásból keletkező ATP van:

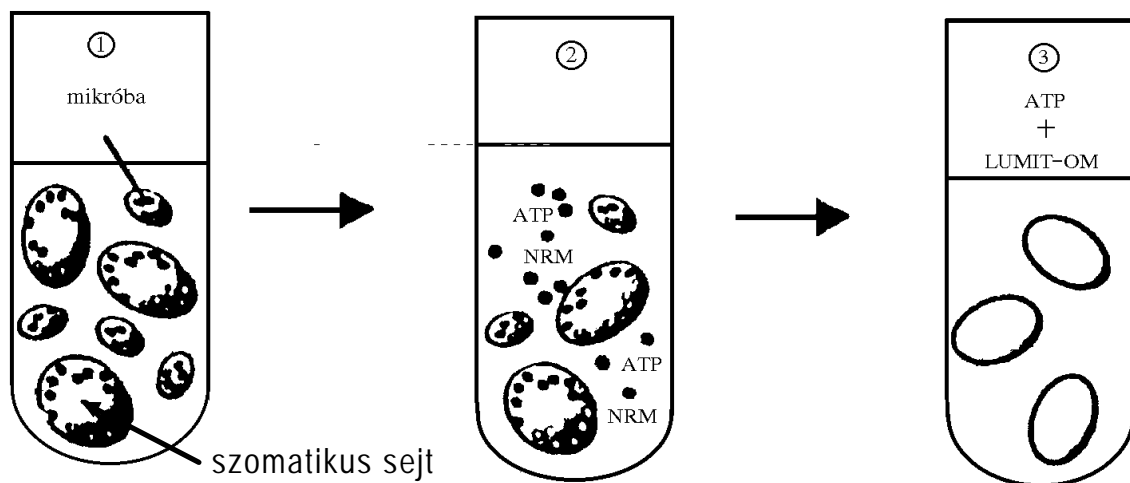
- szomatikus sejtekbe zárt ATP,
- szabad (oldott ATP),
- baktériumokban, mikroorganizmusokban zárt ATP.

Fentiekből kiindulva két különböző mérési módra nyílik lehetőség.

Az ATP-biolumineszcencia alkalmazási területei

Az élelmiszergyártó technológiai vonal gyors higiénés ellenőrzése

Ez esetben csak másodlagos szempont, hogy a vizsgált kritikus ellenőrizendő ponton vett mintákban baktérium- vagy szomatikus sejt eredetű ATP-t találunk. A vizsgált ponton található ATP-t tartalmazó szerves anyagot, azaz a vizsgált pont szennyezettségének megállapítására szolgáló vizsgálat során tamponnal levett mintát egy NRM (nucleotide releasing reagent for microbial cells) nevű felületaktív reagenssel kezelve felnyitjuk, hogy a sejtekbe zárt ATP az oldatba kiáramolhasson. Az így keletkezett ATP-t a 2. ábra szerinti reakció alapján enzimpreparátummal kezeljük. A keletkezett fényt detektáljuk. A folyamatot a 4. ábra szemlélteti.



- ① Mikrobiális sejteket, szabad ATP-t és szomatikus sejteket tartalmazó minta.
- ② NRM hozzáadásával az ATP felszabadul a mikrobiális és szomatikus sejtekből.
- ③ Végül LUMIT-QM-et adunk hozzá, és az ATP mennyiségét az M1500 Light-tal mérjük.

4. ábra: A higiéniai állapot monitorozásának elve

A mérés kiértékelése: amennyiben a vizsgálati érték a minta nélküli reagensek (vakpróba) fényintenzitását háromszorosan meghaladja, a vizsgált pont szennyezettnek tekintendő és a takarítást, fertőtlenítést el kell rendelni.

Az összcsíraszám meghatározása

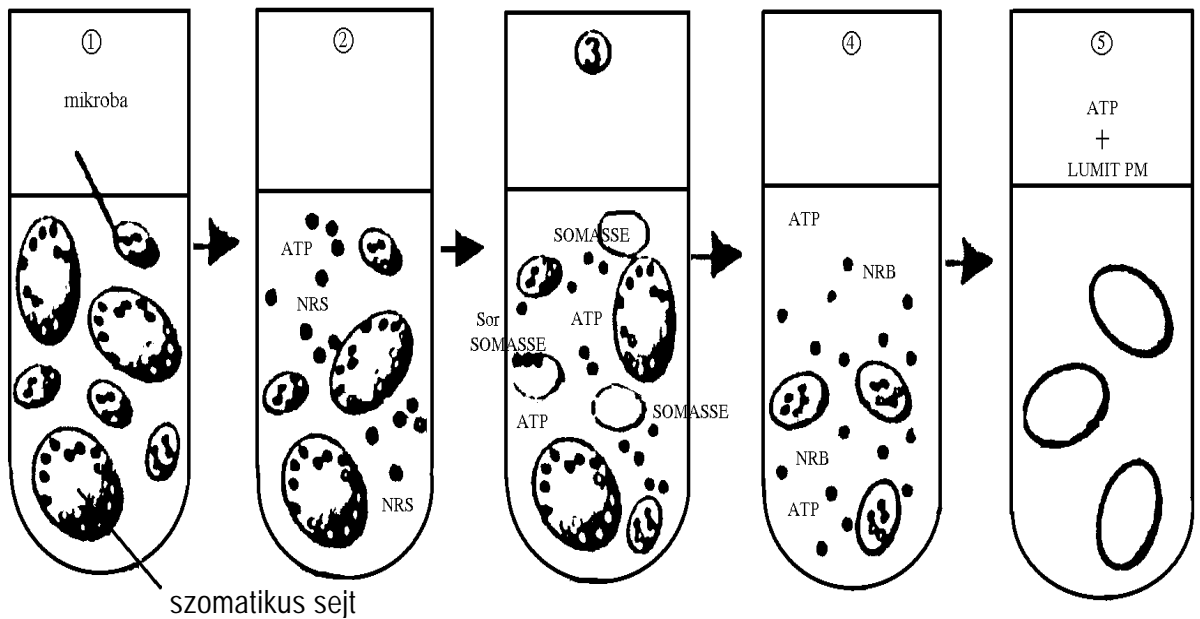
A fent említett különböző eredetű ATP-k szétválasztása, illetve valamennyi nem mikrobiális eredetű ATP hidrolízis útján való eltávolítása a rendszerből lehetőséget nyújt a vizsgálati anyag összcsíraszámának vizsgálatára is. Az eljárás annyiban különbözik az előző pontban leírt higiénés vizsgálatától, hogy a vizsgálandó mintát először egy NRS (nucleotide releasing reagent for somatic cells) vegyszerrel kezeljük, amely csak a szomatikus sejtek sejtfalát képes átjárhatóvá tenni. Így a rendszerbe kiáramlik az ezen sejtekben lévő ATP, amelyet a más eddig is jelenlevő oldott ATP-vel együtt elhidrolizálunk a Somase nevű enzim segítségével. Így a rendszerben már csak kizárólag baktériumeredetű ATP lehet, még mindig a sejtbe zárva. A közismerten zárt baktérium sejtfalat egy NRB (nucleotide releasing reagent for bacterial cells) nevű vegyszerrel nyitjuk fel, majd a szabaddá váló ATP-t a már ismert módon detektáljuk. A folyamatot az 5. ábra szemlélteti. Az eredmény kiértékelése: a csíraszámhoz egy kalibráció készítésének útján jutunk el, amely során ugyanazon mintából hagyományos bakteriológiai úton mért csíraszámhoz rendeljük hozzá a luminometriás vizsgálattal mért értékeket. Természetesen a módszer nem alkalmas arra, hogy különböző típusú (például aerob, anaerob, Gram+, Gram-) baktériumokat megkülönböztessünk.

Következtetések

A leírt módszereket az EU tagországokban és az USA-ban széles körben alkalmazzák, elsősorban a tejipar, a húsipar, a sör- és az üdítőitalgyártás területein.

A hét pontból álló HACCP alapelvek között a negyedik a monitorozási folyamat kialakítását mondja ki (6. ábra).

Az ATP-biolumineszcencia ezen pontban válhat kifejezetten hatékony módszerré, hiszen 1...2 perc alatt értékelhető adatokat kaphatunk, szemben a 3...4 napot is igénylő hagyományos mikrobiológiai vizsgálattal. Természetesen így azonnali beavatkozásra, korrekcióra nyílik lehetőségünk.



- ① Mikrobiális és nem-mikrobiális sejteket tartalmazó minta.
- ② NRS hozzáadásával az ATP felszabadul a nem mikrobiális sejtekből.
- ③ Ezzel egyidőben SOMASSE hozzáadásával a felszabadított ATP-t elhidrolizáljuk.
- ④ NRB-t hozzáadva az ATP felszabadul a mikrobákból.
- ⑤ 10 mp elteltével LUMIT-ot adunk hozzá. Az ATP koncentrációját a Luminométeren mérjük.

5. ábra: Az összcsíraszám meghatározásának elve

1. Veszélyforrások felmérése, kockázat felmérése és a megelőző intézkedések azonosítása
2. Kritikus ellenőrzési pontok beazonosítása
3. Minden egyes kritikus ellenőrzési pontnál kritikus limitek megállapítása
4. Monitorozási folyamat kialakítása
5. Korrekciós intézkedések meghozatala
6. Megerősítési folyamat kialakítása
7. Dokumentálás

6. ábra: HACCP elvek a WHO/Codex szabvány szerint