

Tartu Ülikool  
Füüsika-keemia teaduskond  
Füüsikalise keemia instituut

HELENI RIIK

**Saasteainete määramine piimas laktaadi biosensoriga**

Magistritöö kolloid- ja keskkonnakeemia erialal

Töö juhendaja: teadur Toonika Rinke, Ph.D

Tartu 2004

## Sisukord

Sissejuhatus	lk 3
1. Kirjanduse ülevaade	lk 4
1.1 Piim ja selles leiduvad lisandid ning nende määramine	lk 4
1.2 Antibiootikumijääkide määramise meetodid piimas	lk 8
1.2.1 Mikroobse inhibeerimise testid	lk 8
1.2.2 Immunoloogilised testid	lk 9
1.2.3 Biosensorid antibiootikumide määramiseks	lk 10
1.2.4 Kromatograafiline määramine	lk 12
1.3 Piimhappe ja laktaatide määramine toiduainetes	lk 12
2. Eksperimentaalne osa	lk 16
2.1 Kasutatud reaktiivid	lk 16
2.2 Mõõtmismetoodika	lk 16
2.3 Mõõtmiseks kasutatud aparatuur	lk 16
2.4 Biosensori väljundsignaal ja seda iseloomustavate parameetrite arvutamine	lk 18
3. Biosensori signaali iseloomustamiseks kasutatud mudeli täiendamine	lk 20
4. Tulemused ja arutelu	lk 22
4.1 Täiendatud mudeli alusel arvutatud laktaadi kontsentratsiooni iseloomustavad parameetrid	lk 22
4.2 Pesuainete jääkide mõju biosensori väljundsignaalile	lk 24
4.3 Antibiootikumide mõju biosensori väljundsignaalile	lk 25
4.3.1 Penitsilliini mõju laktaadi kontsentratsioonile	lk 26
4.3.2 Streptomütsiini mõju laktaadi kontsentratsioonile	lk 28
4.3.3 Klooramfenikooli mõju laktaadi kontsentratsioonile	lk 31
4.4 Antibiootikumide koosmõju väljundvoolu kogumuutusele	lk 33
4.5 Antibiootikumide kvantitatiivne määramine	lk 36
5. Kokkuvõte	lk 37
6. Summary	lk 38
7. Kasutatud kirjandus	lk 39

## SISSEJUHATUS

Inimene on aastatuhandete vältel õppinud kasutama piima ja valmistama sellest toitu. Kõiki eluks vajalikke toitaineid (rasvad, valgud, süsivesikud jt.) on inimese organism võimeline omistama piimast. Piim on kolloidlahus, kus leidub valkude, rasvade ja teiste ainete agregate.

Kvaliteetsete piimatoodete aluseks on kvaliteetne tooraine. Piimatoodete valmistamise tehnoloogilistele protsessidele avaldavad piimas leiduvad antibiootikumide, desinfitseerimis- ja puhastusvahendite ning säilitusainete jäägid negatiivset mõju. Nimetatud ained inhibeerivad piimhappebakterite ja teiste pärm- ning hallitusseente elutegevust, mistõttu kannatab piimatoodete maitse, lõhn, struktuur ja kvaliteet. Lisaks võivad piimatoodetesse sattunud saasteainete jäägid ohustada inimeste tervist, põhjustades allergilisi ja toksilisi reaktsioone või resistentsust teatud bakteritüvede suhtes. Seetõttu on oluline täpsete ja kiirete analüüsimeetodite väljatöötamine toorpiima kvaliteedi hindamiseks. Üks võimalus in-situ analüüsides läbiviimiseks on biosensorite kasutamine.

Biosensorid on miniatuursed integreeritud seadmed erinevate ainete sisalduse määramiseks. Biosensorite eeliseks võrreldes traditsiooniliste analüüsimeetoditega on nende kasutamise lihtsus, kiirus, odavus ja nende suur selektiivsus.

Käesolevas töös uuritakse piimas leiduvate erinevate saasteainete mõju laktaadi oksüdaasil baseeruva amperomeetrilise biosensori väljundvoolu parameetritele. Hinnatakse kloori ja erinevate antibiootikumide jääkide määramise võimalusi piimas biosensori dünaamilise mudeli järgi arvutatud parameetrite alusel.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Piim ja selles leiduvad lisandid ning nende määramine

Piim ja piimatooted kuuluvad kindlalt enamuse inimeste toidulauale. Peamiselt tarvitatakse söögiks lehmapiima, selle kõrval ka kitse, lamba, kaameli, eesli jt. loomade piima. Et Eestis kasutatakse kõige rohkem lehmapiima, siis käsitletakse piimana käesolevas töös edaspidi just lehmapiima ja vaadatakse sellega seotud probleeme.

Värske piim on puhta, meeldiva ja kergelt hapuka maitsega kolloidne vedelik, mis sisaldab keskmiselt 87.3 % vett ja 12.7 % kuivainet. Kuivaines omakorda on keskmiselt 3.7 % rasva, 3.25 % valku, 4.6 % laktoosi, 0.65 % mineraale (Ca, P, Mg, K, Zn, Cl, Fe, Cu jt.) ja 0.18 % erinevaid happeid (sidrunhapet, äädikhapet, piimhapet jt.). Veel leidub piimas vähesel määral lahustunud gaase (hapnik, lämmastik), vitamiine (A, B, D jt) ja teisi bioloogiliselt aktiivseid aineid – ensüüme (nt. peroksidaas, katalaas, fosfataas, lipaas) [1,2]. Piima koostis muutub teatud piirides, sõltudes aastaajast, söödast, loomast ja tema tervisest ning teistest faktoritest. Piim sisaldab inimesele soodsas vahekorras kõiki põhilisi toitaineid, mineraalainetest on alla vajaduse piiri ainult rauda [2].

Kõik piimatooted, mis jõuavad meie toidulauale, peavad olema kvaliteetsed, vastama kehtestatud normidele ja olema kooskõlas toiduseadusega. Kvaliteetsete ja ohutute piimatoodete tootmise eelduseks on nõuetele vastav toorpiim. Piima võivad saasteained sattuda kogemata näiteks tootmisprotsessi käigus. Vahel võltsitakse piima teadlikult selle säilivuse parandamiseks.

Suurim probleem piima ja piimasaaduste tootmisel on bakteriaalne saastumine. Puhtast udarast lüpstav piim ei sisalda olulisel määral baktereid, kuid neid satub piima kõikjalt ümbritsevast keskkonnast. Bakterite arv piimas sõltub ka temperatuurist, sest näiteks 10<sup>o</sup> C juures kahekordistub bakterite arv piimas iga kahekümne minuti tagant, aga 2<sup>o</sup> C juures enamiku bakterite elutegevus puudub [3]. Piima kvaliteedi esmane kriteerium on bakterite arv milliliitris, mis peab olema alla 100 000. Teine kriteerium, mille järgi hinnatakse piima kvaliteeti, on somaatiliste rakkude arv – kokkuostu ülempiiriks on 400 000 rakku milliliitris [2]. Somaatiliste rakkude kõrgem arv viitab udarapõletikku ehk mastiiti haigestunud lehma piimale.

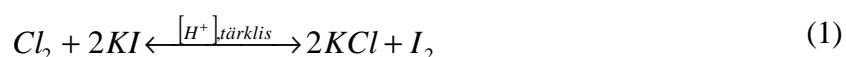
Bakterite ja muude mikroorganismide poolt põhjustatud udarahaiguste ja teiste bakteriaalsete haiguste raviks kasutatakse mitmesuguseid ravimeid, eelkõige

mitmesuguseid antibiootikume. Keemilise koostise alusel jaotatakse veterinaarantibiootikumid 8 gruppi [4]. Loomade raviks kasutatakse põhiliselt  $\beta$ -laktaam antibiootikume, kuid ka mitmesuguseid sulfoonamiide, tetratsükliine ja aminoglükosiide, aktiivselt umbes 15 erinevat antibiootikumi. Tarvitatakse ka nende antibiootikumide segusid ja mõningaid teisi ravimeid [5]. Antibiootikumid hävitavad küll haiguse tekitajad, kuid neis sisalduv toimeaine jõuab looma organismist ka piima. Kuna enamik antibiootikume on termoresistentsed, siis ei lagune nad ka pastöriseerimisel [2]. Loomse päritoluga toit peab vastama määrusele, mis puudutab toidus lubatud saasteainete loetelu ja norme ning vastab euroopa direktiividele [6].

Piimas ja piimatoodetes sisalduvad veterinaarravimite jäägid on otseselt ohtlikud ka inimese tervisele, kuna võivad tekitada allergilisi reaktsioone. Samuti võivad väikesed antibiootikumide hulgad tekitada organismis resistentseid bakteritüvesid ning omada toksilist ja kantserogeenset toimet [7]. Selleks, et ravimitega saastatud piim ei satuks töötlemisse, kasutatakse piimas leiduvate saasteainete määramiseks põhiliselt Delvotesti, penitsilliinide puhul ka Charm II testi [8]. Tavaliselt viiakse toorpiima analüüs läbi mitte selle tootmise kohas, vaid kontrollkeskuste laboratooriumides.

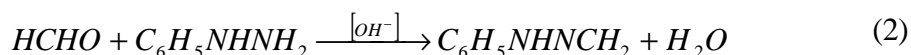
Lüpsiseadmete, torustiku ja muu puhastamiseks kasutatakse mitmeid pesu- ja desovahendeid. Halvasti puhastatud seadmed põhjustavad bakterite arvu kasvu ja selle vähendamiseks või varjamiseks võidakse pesuveele lisada kloori sisaldavaid ühendeid nagu hüpokloriteid, klooramiine jt. Need on leeliselised ühendid ning võivad tekitada söövitust ja olla ärritava toimega nii silmadele kui ka nahale. Piimas leiduvad kloori jäägid võivad esile kutsuda allergilisi reaktsioone, olla toksilised ning avaldada inimorganismile kantserogeenset toimet [9].

Vaba kloori sisaldust määratakse piimas tärglisega:



Kloori olemasolul värvub piim happelises keskkonnas moodustunud joodi ja tärglise kompleksi mõjul siniseks. Nii saab piimas määrata vaba kloori alates 20 ppm-ist [2].

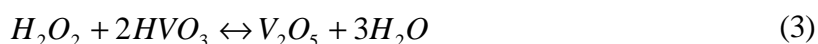
Piimatootmises kasutatakse desinfitseerimiseks ka formaldehüüdi vesilahust. Formaliini määratakse piimas fenüülhüdraziiniga:



Reaktsiooni käigus tekib fenüülhüdrasoon ning formaliini sisaldav piim värvub punaseks [10].

Sageli kasutatakse fenoole sisaldavaid udarasalve ja -kreeme, mis reageerides puhastusvahendites sisalduva vaba klooriga moodustavad klorofenoole. Klorofenoolid on lõhnatud, kuid tugevad kõrvalmaitse tekitajad piimas [1,3]. Töötlejad peaksid kontrollima piima võimalikku kõrvalmaitset, kuid senini ei ole veel leitud ühtset ja piisavalt tundlikku kontrollimismeetodit klorofenoolide määramiseks.

Seadmete puhastamiseks kasutatakse veel vesinikperoksiidi, mis lisaks avaldab piimale ka konserveerivat toimet. Vesinikperoksiidi määratakse vanaadiumhappega (lahustatud väävelhappes):



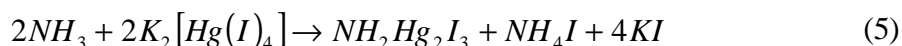
Vesinikperoksiidi olemasolule viitab vanaadiumoksiidi tekkimine ja punase värvuse ilmumine. Sel meetodil on vesinikperoksiidi avastamiskiiriks 0.01 % [2].

Piima säilimise parandamise eesmärgil võidakse, eriti suvisel ajal, sinna lisada soodat, mis võtab ära kibeda maitse ja on bakteritele inhibeeriva toimega. Naatriumvesinikkarbonaati määratakse kvalitatiivselt broomtümoolsiniseiga:



Naatriumvesinikkarbonaadi olemasolu korral muutub piima värvus valgest siniseks, määramiskiiriks 0.05 % soodat [2].

Bakteritele on inhibeeriva toimega ka ammoniaak ja kvaternaarsed ammooniumiühendid, mis võtavad ära kaua seisnud piima hapu lõhna. Kuna ammoniaak kuumutamisel ei lagune, siis määravad tööstused selle sisaldust mitte ainult toorpiimas, vaid ka pastöriseeritud piimas [2]. Ammoniaagi määramine põhineb kolorimeetrilisel reaktsioonil Nessleri reagentiga:



Reaktsiooni käigus tekkiva elavhõbeda kompleksi tõttu värvub ammoniaaki sisaldav piim kollaseks. Selle meetodiga on ammoniaagi määramispiiriks 9 mg/kg [10].

Enamasti määratakse piimas konserveeriva toimega aineid kvalitatiivselt, põhiliselt kolorimeetriliselt, harvem leiab kasutust ka kvantitatiivne analüüs keemiliste meetoditega [11].

Piimas leiduvad saasteained ja mikroorganismide lubatud kõrgem kontsentratsioon avaldavad negatiivset mõju piima ja piimatoodete maitse- ja lõhnaomadustele ning struktuurile ja võivad olla ohtlikud tarbija tervisele. Paljude piimatoodete valmistamiseks kasutatakse erinevaid juuretisi ja baktereid, kuid piimas leiduvate võimalike saasteainete jäägid võivad põhjustada juuretise bakterite hävimist või nende kasvu pidurdumist ning tulemuseks on ebakvaliteetne toode [1-3,9,12]. Samuti võivad piimas leiduvad saasteained häirida tehnoloogilisi protsesse, näiteks koagulatsiooni [12].

Kõrgema klassi toorpiimale kehtestatud normid on toodud tabelis 1 [2,6].

**Tabel 1:** Toorpiimale esitatavad kvaliteedinõuded ja saasteainete lubatud sisaldused.

<b>Kvaliteedinäitaja</b>	<b>Ühik</b>	<b>Lubatud sisaldus</b>
Bakterite arv	N/ml	50 000
Somaatiliste rakkude arv	N/ml	400 000
$\beta$ -laktaam antibiootikumid	$\mu\text{g}/\text{kg}$	4-50
Aminoglükosiidi rühma antibiootikumid	$\mu\text{g}/\text{kg}$	100-500
Makroliidi rühma antibiootikumid	$\mu\text{g}/\text{kg}$	40-200
Sulfoonamiidi rühma antibiootikumid	$\mu\text{g}/\text{kg}$	100
Tetratsükliini rühma antibiootikumid	$\mu\text{g}/\text{kg}$	0-100
Klooramfenikooli rühma antibiootikumid	$\mu\text{g}/\text{kg}$	0-50
Imidasooli rühma antibiootikumid	$\mu\text{g}/\text{kg}$	0-100
Kinolooni rühma antibiootikumid	$\mu\text{g}/\text{kg}$	0-75
Vaba kloor	mg/kg	10
Formaliin	mg/kg	15
Vesinikperoksiid	mg/kg	0.01
Naatriumvesinikkarbonaat	mg/kg	250
Ammoniaak	mg/kg	5

## 1.2 Antibiootikumijääkide määramise meetodid piimas

Antibiootikumide määramiseks piimas kasutatakse mitmeid erinevaid meetodeid, nende eelised ja puudused on toodud tabelis 2.

**Tabel 2:** Antibiootikumide määramise meetodid piimas.

Meetod	Meetodi eelised	Meetodi puudused
Mikroobne inhibeerimine	Odav, kättesaadav, lihtne teostus	Aeganõudev, mittespetsiifiline, segavad inhibiitorid
Immunoloogilised testid	Spetsiifilisus, kiirus, tundlikkus	Kallid, mõeldud laborites kasutamiseks
Biosensorid	Kiired, kompaktsed, selektiivsed, odavad	Lühike kasutusiga,
Kromatograafia	Spetsiifiline, suur tundlikkus, pikk aparatuuri eluiga	Kallis, vajalik pikk ja keeruline proovi eeltöötlus, aeganõudev

Antibiootikumide jääkide tuvastamine piimas toimub kahes etapis [13]:

- 1) Kvalitatiivne määramine, mille käigus jälgitakse proovi mikroobse inhibeerimise testide, ensümaatiliste või retseptoritel baseeruvate meetodite abil.
- 2) Positiivsete proovide kvantitatiivne analüüs keemiliste meetodite abil.

### 1.2.1 Mikroobse inhibeerimise testid

Paljudes maades on kasutusel mikroobse inhibeerimise testid, millest esimene taoline Charm'i test võeti kasutusele juba 1970. aastate lõpus [14]. Mikroobsed testid sisaldavad mikroorganisme, enamasti *Bacillus stearothermophilus* ja selle kasvuks vajalikke toitaineid agarsöötmele, ning baseeruvad mikroorganismi kasvul inkubeerimise käigus. Inkubatsioonil muutub keskkond bakterite elutegevuse tulemusena happelisemaks, mis võimaldab mikroorganismi kasvu määrata piima füüsikaliste omaduste pH, värvuse, elektrijuhtivuse või luminesentsi muutuse, aga ka nähtava kasvu inhibeerimise põhjal [15-17]. Mikroobse kultuuri kasvu

inhibeerivad piimas leiduvad antibiootikumid. Sel meetodil saab piimas määrata nii aminoglükosiide,  $\beta$ -laktaam antibiootikume, sulfoonamiide, tetratsükliine kui ka teisi antimikroobseid aineid, kuid need testid ei ole tavaliselt spetsiifilised kindlale antibiootikumile. Mõne sellise testiga on võimalik identifitseerida vaid ühe kindla ravimi esinemist piimas, kuid kõiki antibiootikume ikkagi mikroobsete inhibeerimise testidega määrata ei saa [18]. Testi tulemusi mõjutavad ka piimas leiduvad looduslikud inhibiitorid, nagu lüsoosoom ja laktoferrin [17]. Kui nende kontsentratsioon piimas on kõrge, saadakse ravimite jälgede suhtes valepositiivseid tulemusi. See näitab, et mikroobsete testidega saadud antibiootikumide jääkide koguse ja identifitseerimise tulemused ei ole usaldusväärsed. Nende testide puuduseks on veel analüüsile kuluv suhteliselt pikk aeg, sest inkubeerimine kestab mitmeid tunde. Mikroobse inhibeerimise testide eeliseks on odavus, kättesaadavus ja lihtne teostus, kuna osad testid ei vaja spetsiifilise aparatuuri olemasolu [17-19]. Mujal maailmas, näiteks Inglismaal, kasutatakse neid teste ka farmides. Enam levinud on Delvotest (S)P ja Charm Farm testid [17].

### **1.2.2 Immunoloogilised testid**

Immunoloogilist analüüsi kasutatakse antibiootikumide kvalitatiivseks ja poolkvantitatiivseks määramiseks piimast. Seda kasutatakse ka mikroobse testiga positiivseks osunud piimaproovide täpsemaks analüüsiks. Immunoloogilised testid põhinevad immunoloogilisel reaktsioonil, mille käigus toimub antibiootikumi ja antikeha, ensüümi või retseptori vaheline reaktsioon [17]. Testide läbiviimiseks on kaks meetodit: 1) ELISA (ensüümimmunosorptsioon) põhimõte, mille kohaselt antikeha reageerib inkubeerimise käigus proovis oleva võimaliku antibiootikumiga.

2) ELRA (ensüümretseptorsidumine) meetodika, kus vastava antibiootikumi retseptor seob endaga piimas oleva võimaliku antibiootikumi.

Ravimi jäägi detekteerimiseks lisatakse mõlemal juhul proovile ensüümsubstraati, mis reageerib tekkinud kompleksiga ja toob esile spektrofotomeetriliselt mõõdetava värvus- või fluorestsentsreaktsiooni. Esimest meetodit kasutatakse LacTek, SNAP, ELISA jt. komplekttestides, kuid Delvo X-Press, SNAP jt. testides leiab rakendust ELRA tehnoloogia [17,19-21]. Erandiks on Charm II, kus toimub küll proovi inkubeerimise käigus immuunreaktsioon antibiootikumi sidumiseks retseptoriga, kuid

tekkiva kompleksi detekteerimiseks lisatakse piimasegule radioaktiivselt märgistatud antibiootikumi isotoopi, kas  $^{14}\text{C}$  või  $^3\text{H}$ , millega seotakse vaba retseptor ja tulemus saadakse radioaktiivse isotoobi loendamisel [17]. Erandiks on ka Penzym test  $\beta$ -laktaam antibiootikumide määramiseks, mis põhineb ensümaatilisel, mitte aga immunoloogilisel reaktsioonil. Testis kulgevat reaktsiooni katalüüsib DD-karboksüpeptiid, kuid selle aktiivsust inhibeerib antibiootikumi juuresolek ja produkti tekib niivõrd vähe, et värvi muutust ei toimu [14].

Immunoloogiliste testide eeliseks on määramise kiirus, tundlikkus ja spetsiifilisus. Nende testide põhjal saab kindlaks määrata võimaliku antibiootikumi või antibiootikumiklassi piimas, mis lihtsustab aparatuuri valikut kromatograafilisel analüüsil. Kahjuks ei ole enamik kommertsiaalsetest testidest sobivad mitme antibiootikumiklassi üheaegseks määramiseks. Immunoloogiliste testide puuduseks on nende kõrge hind ja see, et mõningaid kommertsiaalseid teste saab kasutada vaid laborites [17,19-21].

Eestis kasutatakse veterinaar- ja toidulaboratuurimis ning jõudluskontrollikeskuses piimas leiduvate antibiootikumide määramiseks Delvotest P-d, mis on 1992. aastal tunnustatud standardina  $\beta$ -laktaam antibiootikumide määramiseks. Teste tehakse iga päev ja tulemused selguvad kuue tunni jooksul [11].

Antimikroobsete ainete määramine euroopa suuremates laborites põhineb ISO standardil 18330:2003 – “Guidelines for the standardized description of immunoassays or receptor assays for the detection of antimicrobial residues in milk and milk products” [22]. Praegu kasutatakse võrdselt nii mikroobse inhibeerimise teste kui ka immuunreaktsioonil põhinevaid teste, järjest enam eelistatakse aga immunoloogilise määramise teste, mis võtavad vähe m aega.

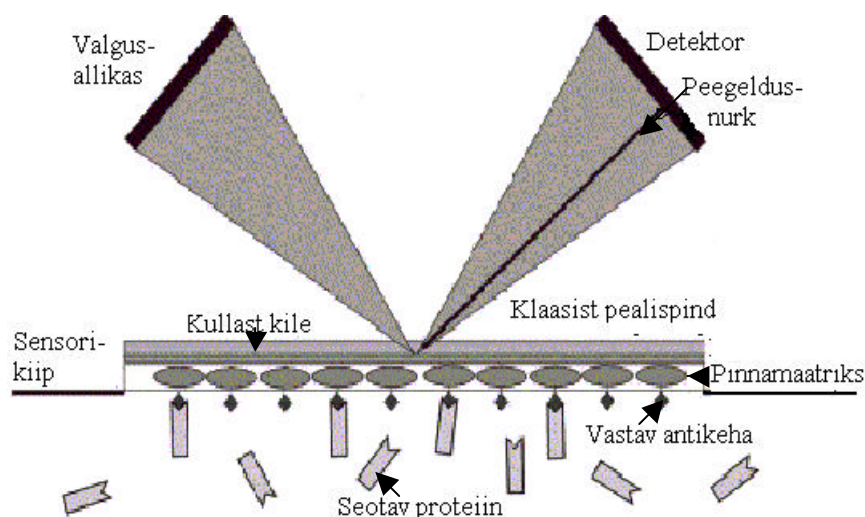
### **1.2.3 Biosensordid antibiootikumide määramiseks**

Antibiootikumide jääkide määramiseks piimas on rakendatud erinevad biosensoreid. Biosensor on vastavalt definitsioonile analüütiline seade, milles on integreeritud bioloogiliselt aktiivne materjal ja keemilise reaktsiooni signaali muundav seade (nt. elektrokeemiline andur), mille abil saab selektiivselt ning kvalitatiivselt või poolkvantitatiivselt analüütilist informatsiooni uuritava aine kohta. Biosensorite selektiivseks elemendiks võivad olla mitmesugused erinevad

bioloogiliselt aktiivsed ained – ensüümid, antikehad, mikroorganismid jne [23]. Toimuva keemilise reaktsiooni signaali detekteerimiseks kasutatakse erinevaid põhimõtteid.

Amperomeetrites biosensorites leiavad antibiootikumide määramisel piimas äratundva elemendina kasutust põhiliselt ensüümid, mis viiakse kontakti sensori tööpinnaga. Lahuses toimub nt. piimas leiduvate suhkrute sidumine ensüümiga (nt. glükoosi oksüdaasi) ja seejärel määratakse amperomeetriselt substraadi osalusel toimuvat reaktsiooni iseloomustavad parameetrid. Ensüümi aktiivsust võivad inhibeerida piimas leiduvad antibiootikumid [24].

Optilise biosensori enim levinud tööpõhimõte baseerub SPR (surface plasmon resonance – pindkihi molekulide resonants) tehnoloogial. Sensori tundlikule pinnale immobiliseeritakse määratavale ainele vastav antikeha, mille abil seotakse lahuses olev valk. Selle tulemusena suureneb sensori pinnal oleva aine mass ja muutub pinna konformatsioon, mida detekteeritakse pinnalt peegelduva laserkiire peegeldusnurga muutumise järgi (joonis 1) [25]. Näiteks kasutatakse penitsilliini määramiseks 3-peptiidi hüdrolüüsi 2-peptiidiks karboksüpeptidaasi abil. Sensori pinnale seotud 2-peptiidi koguse järgi saab teada penitsilliini kontsentratsiooni lahuses. Mida vähem 2-peptiidi tekib, seda rohkem on ensüümi aktiivsus inhibeeritud penitsilliini poolt [14,26].



**Joonis 1.** Optilise biosensori pindkihi molekulide resonantsi põhimõte.

Põhimõtteliselt saab optilise biotsensori abil määrata ka teisi veterinaarravimite jääke, kuid probleem on sobiva antikeha leidmisega. Optiliste biosensorite eeliseks on asjaolu, et ei ole vaja kasutada võrdluselektroodi. Pindkihi molekulide resonants on spetsiifiline ja väga tundlik väikestele muutustele, kuid vajalikud seadmed on suhteliselt kallid.

### **1.2.3 Kromatograafiline määramine**

Kui mikroobse testi ja/või immunoloogilise määramise tulemus osutub positiivseks, siis antibiootikumi edasiseks identifitseerimiseks ja kvantitatiivseks analüüsiks kasutatakse kromatograafilisi meetodeid. Sobiva meetodi valik sõltub proovis olevast antibiootikumist. Põhiliselt kasutatakse gaaskromatograafiat ja vedelikkromatograafiat, kus on ühendatud erinevad detektorid. Gaaskromatograafia leiab kasutust lenduvate ühendite, põhiliselt klooramfenikoolide määramiseks, kusjuures detektorina kasutatakse enamasti negatiivse iooni keemilise ionisatsiooni masspektromeetriat (MS) [27].

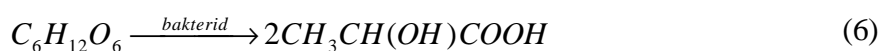
Antibiootikume on võimalik määrata ka kõrgrõhuvedelikkromatograafiliselt ultraviolettdetektoriga (UV) või positiivse ioonmoodiga MS detektoriga [28]. Eluendina kasutatakse tavaliselt atsetonitriili mitmesuguseid segusid, sest antibiootikumid on tüüpiliselt orgaanilised polaarsed ühendid. Vedelikkromatograafias rakendatavate kolonnide pikkus varieerub vahemikus 100 – 250 mm ning graanulite läbimõõt on tavaliselt 5 µm [27-31].

Kromatograafia meetodid on küll tundlikud ja spetsiifilised kindlale antibiootikumile, kuid puuduseks on vajalike reagentide ja aparatuuri kõrge maksumus. Tavaliselt on analüüs automatiseeritud, kuid proovi ettevalmistamisele kulub palju aega, sest eelnevalt tuleb uuritavat proovi töödelda (lahjendada atsetonitriiliga, homogeniseerida, tsentrifuugida rasvade eemaldamiseks, ekstraheerida jne.) [30,31].

## **1.3 Piimhappe ja laktaatide määramine toiduainetes**

Värske piim sisaldab vähesel määral happeid ja piima pH on tavaliselt vahemikus 6.6 kuni 6.8 pH-ühikut [2,4]. Säilitamise käigus suureneb

piimhappebakterite mõjul hapete kontsentratsioon ning pH väärtus väheneb. Piimhape tekib glükoosi ja teiste süsivesikute aeroobsel lagunemisel [32]:



Piimhappel on kaks optilist isomeeri – D-piimhape ja L-piimhape. Piimas on olemas mõlemad vormid, nende suhe mõjutab piimatoote happelisust [33].

Piimhape (ehk 2-hüdroksüpropanhape) ja tema soolad – laktaadid leiavad tihti kasutust toiduainetetööstuses. Alljärgnevat ühendeid kasutatakse pH reguleerimiseks või konserveerimiseks [34]:

E270 – piimhape, kasutatakse pH reguleerimiseks

E325 – naatriumlaktaat, konservant

E326 – kaaliumlaktaat, konservant

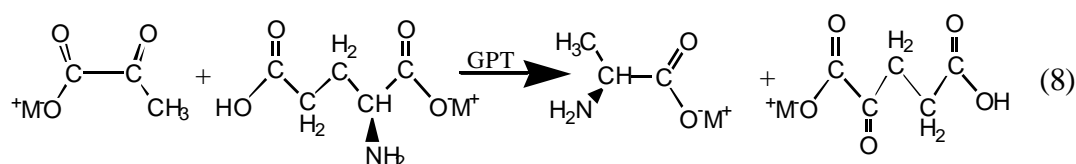
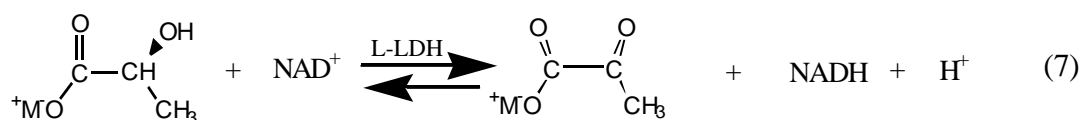
E327 – kaltsiumlaktaat, konservant, pH reguleerimine

E329 – magneesiumlaktaat, konservant

Et tegemist on antioksüdantidega, siis kaitsevad nad piimatooteid oksüdeerimisprotsessidest (nt. rasva rääsumine) tingitud muutuste eest.

Laktaadi sisalduse määramine on olulise tähtsusega vähese alkoholi sisaldusega jookides, puu- ja juurviljades ning piimas ja piimatoodetes. Laktaadi sisalduse järgi on võimalik kontrollida käärimise kulgu, mis mõjutab produktide maitset, kvaliteeti ja stabiilsust [33,35].

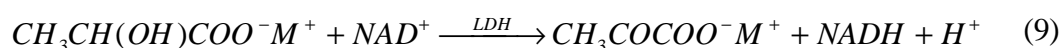
L-piimhappe määramiseks toiduainetes kasutatakse spektrofotomeetrilist analüüsi (UV testi ISO 139 084), mis põhineb piimhappe oksüdeerimisel püruvaadiks ja reaktsiooni tasakaalu nihutamiseks saaduste tekke suunas, muudetakse tekkinud püruvaat edasialaniiniks:



Neelduvuse järgi lainepikkusel 340 nm määratakse moodustunud NADH kontsentratsioon, mis on proportsionaalne piimhappe sisaldusega. Piimhappe lineaarne määramispiirkond on 0.3 – 350 mg/l. Meetod on küll spetsiifiline L-piimhappe jaoks, kuid ei sobi, kui L-piimhapet on alla 0.3 mg/l. Sama põhimõtte järgi toimub toiduainetes ka D-piimhappe määramine, kuid siis kasutatakse vastavalt ensüümi D-laktaadi dehüdrogenaasi. Spektrofotomeetriliselt saab mõõta vaid selgeid, värvituid ja neutraalseid bioloogilisi vedelikke, mistõttu tuleb piimaproovid eelnevalt töödelda (lahjendada, homogeniseerida, ekstraheerida jm) [22]

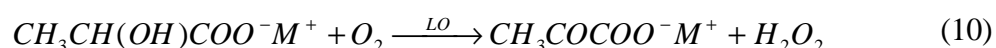
Toiduainetest L-piimhappe ja tema soolade määramiseks on välja töötatud erinevaid biosensoreid. Biosensorite abil saab määrata laktaati ka eelnevalt töötlemata ja kontsentreerimata bioloogilistest vedelikest. Kõige rohkem kasutatakse amperomeetrilisi biosensoreid, kus selektiivse elemendina tarvitatakse ensüüme, mis on spetsiifilised kindlale substraadile. Laktaadi määramiseks kasutatakse biosensorites peamiselt nelja ensüümi: laktaadi dehüdrogenaasi (LDH - EC 1.1.1.27), laktaadi oksüdaasi (LOD - EC 1.13.12.4), tsütokroom b<sub>2</sub> (Cyt b<sub>2</sub> - EC 1.1.2.3) ja laktaadi monooksüdaasi (LMO - EC 1.1.3.2). Kolmel esimesel juhul on saaduseks püruvaat, LMO korral aga atsetaat. Kõik nimetatud ensüümid kuuluvad oksüreduktaaside klassi, kuid nende toimimispõhimõte on erinev [36].

LDH poolt katalüüsitud reaktsioon on järgmine:



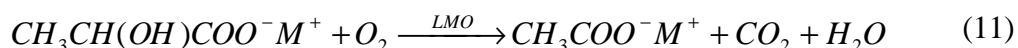
LDH eraldi ei leia kasutust amperomeetrilistes biosensorites laktaadi määramiseks, küll aga koos teiste ensüümidega protsesside tasakaalu nihutamiseks ja määramise tundlikkuse parandamiseks [35,36].

LOD katalüüsib laktaadi oksüdeerimisreaktsiooni lahustunud hapniku toimel:



Laktaadi oksüdaasil baseeruvate biosensoritega saab registreerida kas hapniku kontsentratsiooni vähenemist lahuses või tekkivat vesinikperoksiidi ning nende kaudu arvutatakse biosensori väljundsignaali alusel laktaadi kontsentratsioon, kasutades selleks mitmeid erinevaid meetodeid reaktsiooni iseloomustavate parameetrite leidmiseks [36,37].

LMO katalüüsib laktaadi oksüdeerumist atsetaadiks:



LMO korral arvutatakse laktaadi sisaldus hapniku kontsentratsiooni vähenemise kaudu [36].

Laktaadi biosensorites rakendatakse nimetatud ensüüme eraldi (LOD), koos (LOD/LDH) või kombineeritult ühe või mitme teise ensüümiga (LOD/HRP, SHL/LDH/PyOD). Ensüüme kasutatakse kas solubiliseeritud või immobiliseeritud kujul. Reaktsiooni väljundsignaali mõõtmiseks kasutatakse enamasti plaatina elektroodi, aga ka süsinik elektroodi [33,35-41].

Spektrofotomeetriliselt mõõdetud laktaadi kontsentratsioon on peaaegu alati suurem kui biosensoritega saadud tulemused, samas on ka vead suuremad (tabel 3). Erinevate biosensoritega saadud väärtused on omavahel võrreldavad; mida kõrgem on laktaadi kontsentratsiooni piimatootes, seda parem kokkulangevus erinevate meetoditega on saadud [40-42].

**Tabel 3.** Laktaadi sisalduse mõõtmine erinevates piimatoodetes spektrofotomeetriliselt ja biosensori abil.

Piimatoode	Laktaadi sisaldus (mM)	
	Spektrofotomeetria	Biosensor
Atsidofiilpiim	andmed puuduvad	87.03±0.01
Jogurt	85.3±1.2	83.7±1.1
Juustuvadak	100.9±2.0	99.0±1.4
Lõss	0.66±0.21	0.75±0.05
Pett	100.0±5.0	86±0.9
Piim	määramispiirkonnast väljas	0.16±0.08
Piimapulber	12.4±0.29	13.6±0.16
Puuviljajogurt	42.66±0.01	35.33±0.01

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Kasutatud reaktiivid

- 1) Kaaliumhüdroksiid KOH (Chemapol, Tšehhi, r.g.a $\geq$ 99.99 )
- 2) Kaaliumdivesinikfosfaat KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Reakhim, Venemaa, r.g.a $\geq$ 98)
- 3) Naatrium-(L)-laktaat C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NaO<sub>3</sub> (Lot No 212-762-3, Sigma, USA, r.g.a $\geq$ 98%)
- 4) Naatrium-(L)-laktaat C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NaO<sub>3</sub> (Lot No 212-762-3, Fluka, Šveits, r.g.a=99%)
- 5) Laktaadi oksüdaas (eraldatud *Pediococcus*'est Lot No 232-841-6, Sigma USA)
- 6) Laktaadi oksüdaas (Lot No 232-841-6, Roche Diagnostics, Saksamaa )
- 7) Naatriumsulfit Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>(Reakhim, Venemaa, r.g.a $\geq$ 99.99)
- 8) Penitsilliinipulber (saadud TÜ Farmaatsia instituudist)
- 9) Klooramfenikool (saadud TÜ Farmaatsia instituudist)
- 10) Streptomütsiin (saadud TÜ Farmaatsia instituudist)
- 11) Klooritabletid (Movek Grupp)

### 2.2 Mõõtmismetoodika

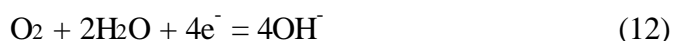
Kõik puhverlahused, antibiootikumide lahused kui ka kloorilahus valmistati bidestilleeritud veega. Lahuste pH väärtusi kontrolliti pH-meetriga (täpsusega 0.02 pH-ühikut).

Enne mõõtmist küllastati mõõdetavaid lahuseid õhuhapnikuga, selleks pumbati neist lahustest 25<sup>o</sup> C juures tund aega läbi õhku. Laktaadi mõõtmiseks piimas lahjendati piimaproovid 0.1 M fosfaatpuhvriga (vahekorras 2:1, pH=6.5). Kõik mõõtmised viidi läbi õhukindlas ja termostateeritud (25<sup>o</sup> C) klaasist mõõterakus (V=35 ml) 0.1 M fosfaatpuhvril (pH=6.5) konstantsel segamisel magnetsegajaga.

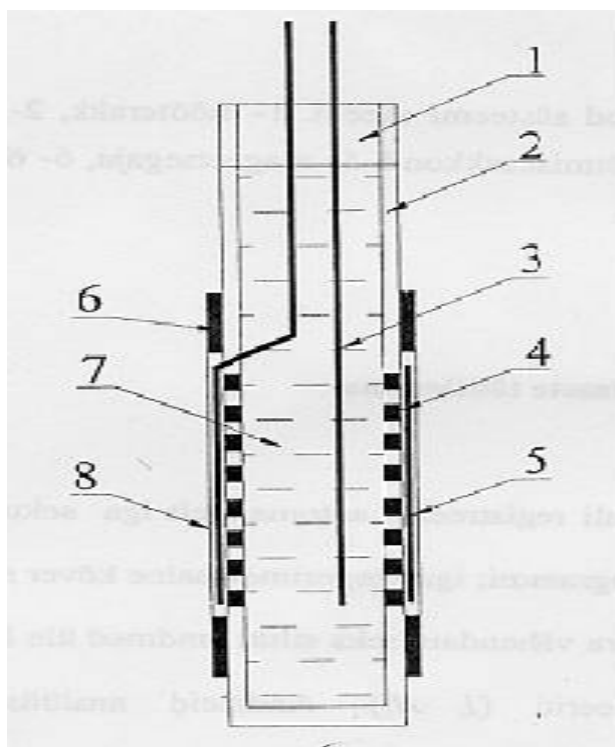
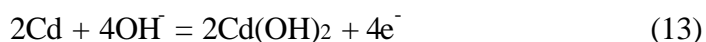
### 2.3 Mõõtmiseks kasutatud aparatuur

Laktaadi oksüdaas katalüüsib piimhappe ja selle soolade oksüdeerumist püruvaadiks ja vesinikperoksiidiks (võrrand 10). Selle reaktsiooni jälgimiseks kasutati amperomeetrilist Clark'i-tüüpi hapnikuandurit, mis kujutab endast ümbritsevast keskkonnast polümeerse kilega eraldatud galvaanielementi. Hapnikuanduri katoodiks on kroom-nikkeltraat, mis on keritud anduri perforatsiooniga korpusele ning anoodiks

pressitud kaadmiumilaastud. Perforatsioon tagab andurit täitva elektrolüüdi (kaaliumhüdroksiidi vesilahus) vaba pääsu elektroodi pinnale. Hapniku molekulid satuvad uuritavast keskkonnast katoodile läbi polümeerse kile, mis takistab kõrvaliste ainete jõudmist elektroodile, aga samas pidurdab ka hapnikumolekulide difusiooni kiirust. Katoodil toimub hapniku elektrokeemiline redutseerimine vastavalt võrrandile:



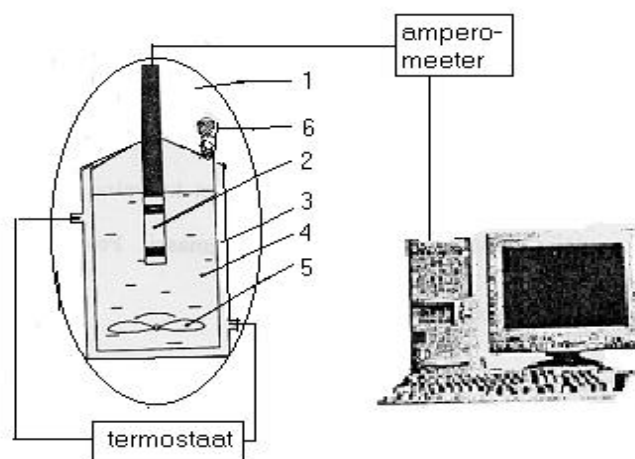
Reaktsiooniks vajalikud elektronid genereeritakse anoodil, kus toimub kaadmiumi oksüdatsioon:



**Joonis 2.** Hapnikuanduri läbilõige. 1 – kummikork, 2 – korpus, 3 – anood, 4 –korpuse perforatsioon, 5 – katood, 6 – kapronniit, 7 – elektrolüüdilahus, 8 – polümeerne kile.

Töös kasutati silindrikujulist hapnikuandurit (joonis 2), mille membraani pinna suurus on  $5.65 \text{ cm}^2$  ja polüetüleenkile paksus  $60 \text{ }\mu\text{m}$ .

Hapnikuandur asetati õhuhapnikuga küllastatud mõõtelahusega täidetud mõõterakku, väljundvoolul lasti paar minutit reaktsioonikeskkonnas stabiliseeruda, kusjuures vajadusel pumbati samal ajal mõõterakku õhku. Seejärel süstiti mõõterakku reaktsiooni käivitamiseks ensüümi laktaadi oksüdaasi 37  $\mu\text{l}$  ( $c = 0.19 \mu\text{g/ml}$ ) ning samal hetkel alustati väljundvoolu registreerimist. Laktaadi oksüdeerumine ensüümi toimel põhjustas hapniku kontsentratsiooni vähenemise lahuses ja detekteeritava muutuse sensori väljundvoolus. Hapnikuanduri signaali digitaliseerimiseks kasutati amperomeetrit ja registreerimiseks arvutit, mis võimaldas signaali automaatselt töödelda ja analüüsida. Mõõtmiseks kasutatud süsteemi skeem on toodud joonisel 3.



**Joonis 3.** Mõõtmisüsteemi skeem. 1 – mõõterakk, 2 – hapnikuandur, 3 – kahekordne klaassein, 4 – mõõtelahus, 5 – magnetsegaja, 6 – ava ensüümi süstimiseks.

#### **2.4 Biosensori väljundsignaali ja seda iseloomustavate parameetrite arvutamine.**

Biosensori väljundvool registreeriti automaatselt 1 s intervalliga. Iga eksperimentaalne kõver koosnes vähemalt 600 punktist. Andmed normaliseeriti ( $I_t / I_0$ ) ning keskmistati üle 8 punkti eksperimentaalse müra vähendamiseks. Andmete silumiseks ja arvutamiseks kasutati programme SigmaPlot®5.0 (SPSS Software,

USA) ja GraphPad Prism®3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), andmete salvestamiseks kasutati A. Raidaru poolt kirjutatud originaalset tarkvara.

Andmete analüüs toimus mittelineaarse vähimruutude meetodil biosensori integreeritud mudeli alusel, mis võimaldab sensori tasakaaluese oleku väljundsignaali alusel määrata reaktsiooni kineetikat ja statsionaarset olekut iseloomustavaid sõltumatuid parameetreid. Kasutatud biosensori integreeritud mudeli matemaatiline kuju on järgmine:

$$\frac{I(t)}{I_0} = A \exp(-Bt) - 2A \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{t_s}{\frac{n^2}{B} - t_s} \left[ \exp(-Bt) - \exp\left(\frac{-n^2 t}{t_s}\right) \right] + (1 - A) \quad (14)$$

kus  $I(t)$  on väljundvoolu intensiivsus ajahetkel  $t$ ;  $I_0$  on väljundvoolu intensiivsus ajahetkel  $t=0$ ;  $t_s$  on hapnikuanduri inertsiooni iseloomustav suurus ning  $A$  ja  $B$  on substraadile iseloomulikud kompleksparameetrid, mis avalduvad järgmiselt:

$$A = \frac{k_{kat} [E]_{kogu} c_s^{lahus}}{k_{diff}^{O_2} K_{O_2} K_s + (k_{kat} [E]_{kogu} + k_{diff}^{O_2} K_{O_2}) c_s^{lahus}} \quad (15)$$

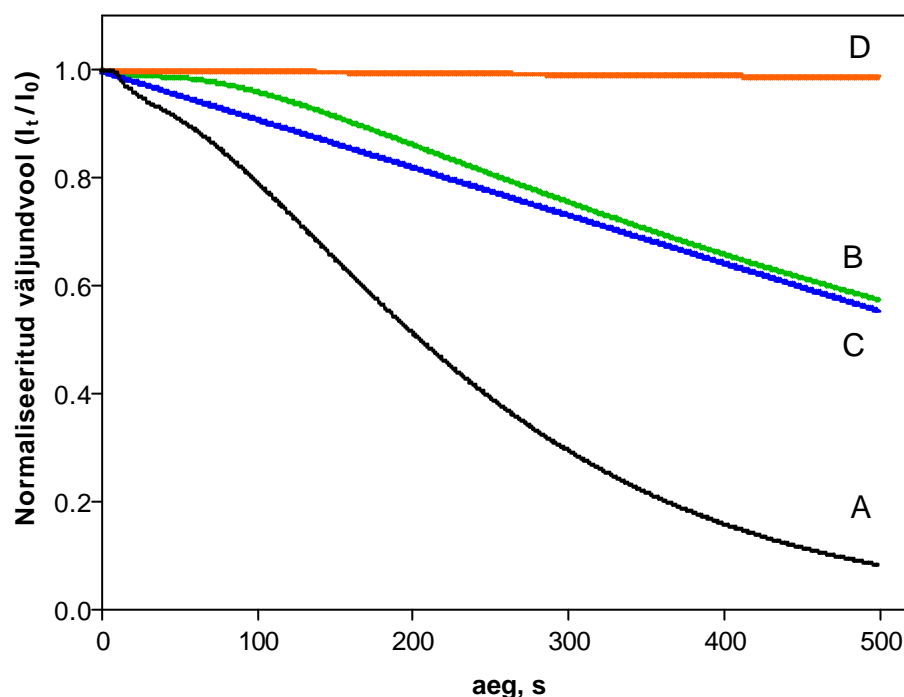
$$B = \frac{\frac{k_{kat} [E]_{kogu} c_s^{lahus}}{K_{O_2}}}{K_s + c_s^{lahus}} + k_{diff}^{O_2} \quad (16)$$

kus  $k_{kat}$  on näiv katalüütiline konstant,  $[E]_{kogu}$  on ensüümi kontsentratsioon lahuses,  $c_s^{lahus}$  vastab substraadi kontsentratsioonile lahuses,  $k_{diff}^{O_2}$  on hapniku difusiooni konstant,  $K_{O_2}$  ja  $K_s$  iseloomustavad vastavalt hapniku sidumist aktiveeritud ensüümiga ja ensüüm-substraat kompleksi moodustumist [43].

Parameeter  $A$  vastab väljundsignaali kogumuutusele (vt 8) ja parameeter  $B$  on kineetiline parameeter. Mõlemad arvutatud parameetrid  $A$  ja  $B$  sõltuvad substraadi kontsentratsioonist hüperboolselt (võrrandid 15 ja 16). Mudeli alusel arvutati kolm signaali iseloomustavat sõltumatut parameetrit  $A$ ,  $B$  ja  $t_s$ , millest kahte esimest kasutati substraadi kontsentratsiooni iseloomustamiseks lahuses.

### 3. BIOSENSORI MUDELI TÄIENDAMINE

Biosensori väljundvoolu muutus ajas kujutab endast tüüpilist S-kujulist kõverat, kus on alguses anduri inertsist ja reaktsiooni käivitumisest tingitud viivitusperiood, sellele järgneb ensüümreaktsioonist tingitud hapniku kontsentratsiooni kiire vähenemine kuni saabub protsessi tasakaaluolek ja väljundsignaal oluliselt ei muutu.



**Joonis 4.** Sensori normaliseeritud väljundvoolu muutus ajas.

A – summaarne väljundvoolu kogumuutus (andur, inerts, bakterite hingamine ja ensüümreaktsioon) piimaproovis,  $[LO] = 0.19 \mu\text{g/ml}$ ;

B – ensüümreaktsioon piimaproovis,  $[LO] = 0.19 \mu\text{g/ml}$ ;

C – bakterite hapniku tarbimine suvel piimaproovis (ensüümi ei lisatud);

D – sensori hapniku tarbimine puhverlahuses;

Kõik mõõtmised viidi läbi temperatuuril  $25^{\circ}\text{C}$ , 0.1 M fosfaatpuhvril ( $\text{pH}=6.5$ ) konstantsel segamisel.

Väljundsignaali suurus on lineaarses sõltuvuses hapniku kontsentratsioonist lahuses konstantsel temperatuuril. Väljundsignaali dünaamika oleneb laktaadi kontsentratsioonist ning lisatud antibiootikumi kogusest, katalüüsitava ensüümreaktsiooni iseloomust, bakterite hingamisest ja anduri enda hapniku tarbimisest (joonis 4).

Sensori enda hapniku tarbimine ajas on suhteliselt väike. Õhuhapnikuga küllastatud 0.1 M fosfaatpuhvril muutus sensori väljundsignaal 10 minuti jooksul vähem kui 2 % ja seepärast seda mudeli alusel parameetrite arvutamisel arvesse ei võetud (joonis 4, kõver D).

Bakterite tarbimisest tingitud väljundvoolu muutus on näidatud joonisel 4 (kõver C). Bakterite hulk piimas sõltub aastaajast ja suureneb märkimisväärselt suvel, kui õhutemperatuur väljas on pidevalt üle 10° C. Selle arvesse võtmine biosensori signaali iseloomustamisel on oluline, sest bakterite hingamise tõttu toimus soojal aastaajal signaali vähenemine ligikaudu 50 %. Piimas olevate bakterite hingamise arvestamiseks täiendati biosensori mudelit (võrrand 14) lineaarse liikme  $Dt$  võrra, sest 25 minuti jooksul oli bakterite hingamisest tingitud sensori väljundsignaali muutus vastavalt eksperimentaalsetele andmetele lineaarne (joonis 4, C):

$$\frac{I(t)}{I_0} = A \exp(-Bt) + (1 - A) - 2A \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{t_s}{n^2 / B - t_s} \left[ \exp(-Bt) - \exp\left(-n^2 \frac{t}{t_s}\right) \right] - Dt \quad (17)$$

Bakteriaalse hingamise lisaparametri  $D$  sissetoomine võimaldas kasutada biosensori dünaamilist mudelit laktaadi näiva kontsentratsiooni iseloomustamiseks kasutatavate parameetrite arvutamiseks igal aastaajal.  $D=0$  kui bakterite hulk on väike ja nende elutegevus ei avalda olulist mõju laktaadi biosensori väljundsignaalile.

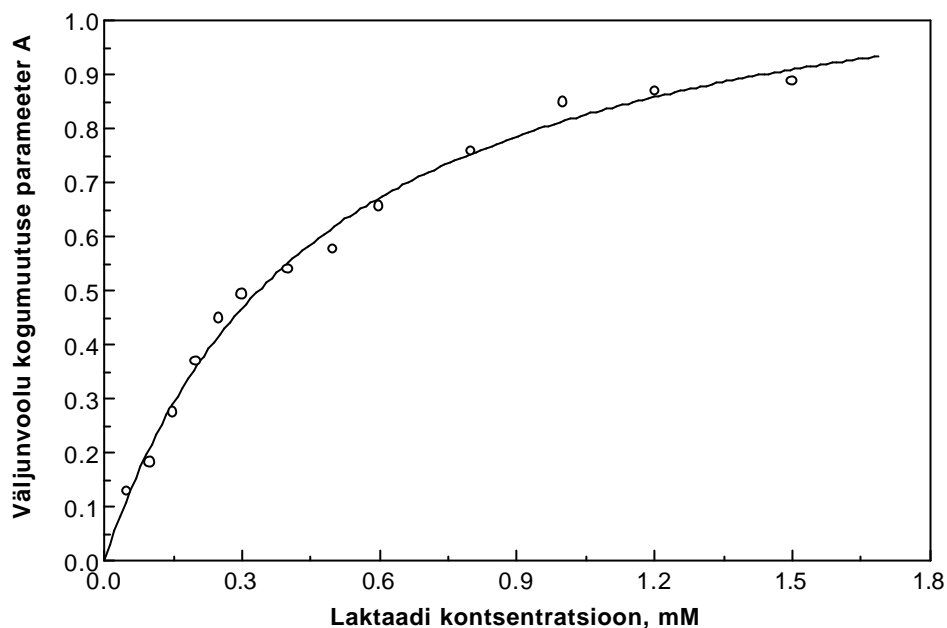
## 4. TULEMUSED JA ARUTELU

### 4.1 Biosensori mudeli alusel arvutatud laktaadi näivat kontsentratsiooni iseloomustavad parameetrid.

Täiendatud biosensori dünaamilise mudeli (võrrand 17) abil arvutati eksperimentaalsetest andmetest kolm biosensori väljundsignaali iseloomustavat parameetrit – statsionaarsele olekule vastav signaali kogumuutus (parameeter  $A$ ), kineetiline parameeter (parameeter  $B$ ) ja anduri inertsiaalse iseloomustav  $t_s$ .  $t_s$  väärtus ei olene laktaadi ega lisatud antibiootikumi kontsentratsioonist ja on igale hapnikuandurile iseloomulik suurus. Antud töös kasutatud anduri jaoks saadi  $t_s$  väärtuseks  $15 \pm 3$  sekundit.

Pärast bakterite ja anduri enda hapniku tarbimise mõju elimineerimist biosensori väljundsignaalist oli väljundsignaali ülejäänud muutus tingitud ensüümreaktsioonist, mille käigus toimus laktaadi oksüdeerumine LO toimel püruvaadiks ja vesinikperoksiidiks vastavalt võrrandile 10. Ensüümreaktsioonist on tingitud väljundsignaali kiire vähenemine ajas (joonis 4). Selles vahemikus on reaktsioonist tingitud muutused kõige suuremad ja mõõtmise vead kõige väiksemad. Tasakaaluse oleku punktide alusel arvutati reaktsioonile iseloomulikud parameetrid  $A$  ja  $B$ .

Aja suurenemisel läheneb väljundsignaali kõver eksponentsiaalselt platoole. Väljundsignaali muutuse võimalikku koguulatust iseloomustab parameeter  $A$ . Selle suurus sõltub nii mõõdetavast laktaadi hulgast kui ka lisatud antibiootikumi kontsentratsioonist. Parameetri  $A$  väärtus sõltub hüperboolselt (eeldusel, et hapniku algkontsentratsioon on konstantne) laktaadi kontsentratsioonist ja kõrgematel laktaadi kontsentratsioonidel läheneb selle arvutatud väärtus normaliseeritud andmete ( $I_t / I_0$ ) korral hüperboolselt ühele, mis on selle maksimaalne võimalik väärtus (joonis 5). Parameetri  $A$  arvutamiseks kasutati nii varasemat biosensori dünaamilist mudelit (võrrand 14) kui ka täiendatud mudelit (võrrand 17), kusjuures täiendatud mudeli põhjal ja varasema biosensori mudeli alusel saadud andmed moodustavad ühtse sõltuvuse substraadi (antibiootikumi) kontsentratsioonist (korrelatsioonikoeffitsient  $r > 0.98$ ).

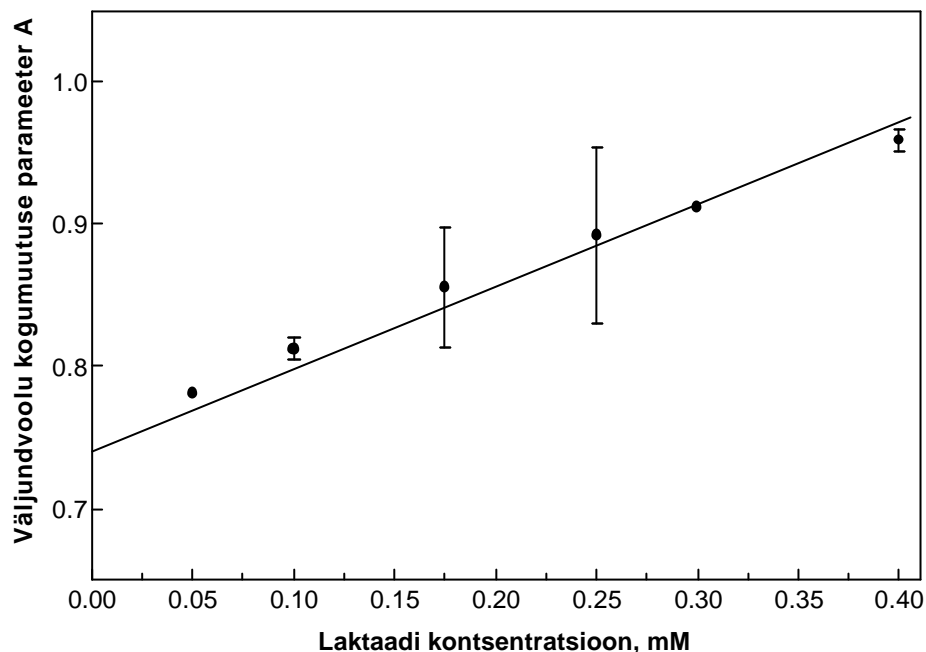


**Joonis 5.** Laktaadi kontsentratsiooni mõju biosensori väljundvoolu kogumuutusele. Kõik mõõtmised viidi läbi temperatuuril 25° C, 0.1 M fosfaatpuhvris (pH=6.5), [LO]=0.19 µg/ml.

Laktaadi sisaldus piimas määrati lisamismeetodiga, st. piimaproovile lisati kindel kogus laktaadi lahust. Väljundvoolu kogumuutus sõltus lineaarselt piimale lisatud väikestest laktaadi kogustest ( $c_{\text{laktaat}} < 0.4 \text{ mM}$ ). Saadud sirge ja abtsisstelje lõikepunkti alusel hinnati laktaadi kontsentratsiooni väärtuseks piimas 1.4 mmol/l (joonis 6).

Kolmas mudeli põhjal arvutatud reaktsiooni iseloomustav suurus oli kineetiline parameeter  $B$ . See iseloomustab ensüümreaktsiooni algkiirust ja selle väärtus oleneb samuti nii laktaadi sisaldusest kui ka lisatud antibiootikumi hulgast uuritavas lahuses. Kineetilise parameetri  $B$  väärtus oli 1 mM laktaadi lahuse korral  $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ja mõõtmiseks kasutatud lahjendatud piima korral keskmiselt  $7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ .

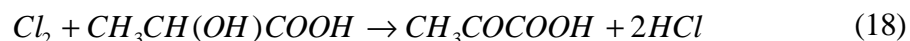
Saadud parameetrite  $A$  ja  $B$  sõltuvusi laktaadi näivast kontsentratsioonist võrreldi lisanditeta ja saasteaineid sisaldavate lahustega ja nende parameetrite erinevuste põhjal iseloomustati antibiootikumide sisaldust erinevates proovides.



**Joonis 6.** Piimas laktaadi määramine. Kõik mõõtmised viidi läbi temperatuuril 25° C, 0.1 M fosfaatpuhvril (pH=6.5), [LO]=0.19 µg/ml.

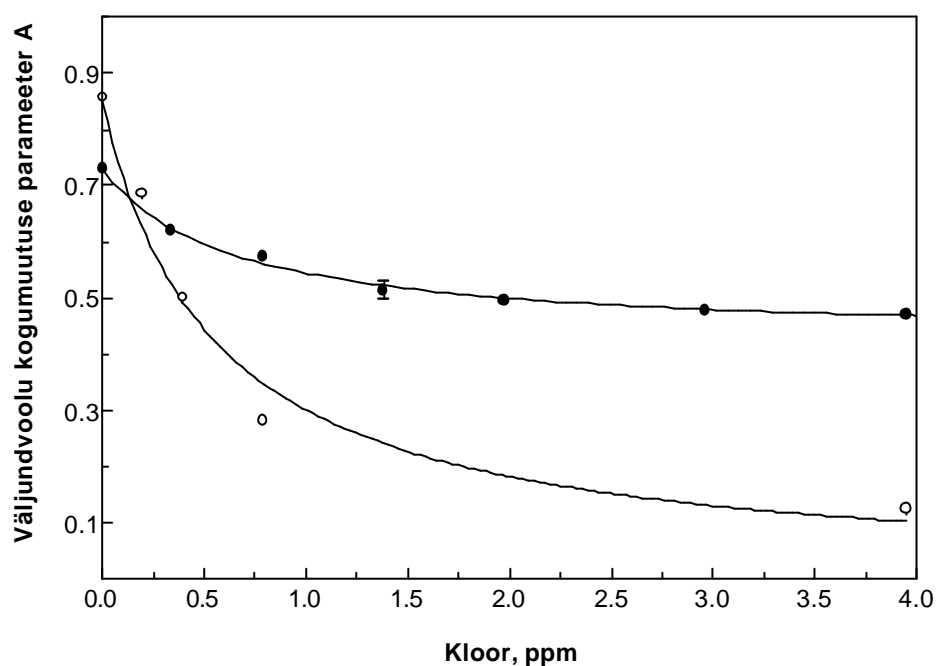
#### 4.2 Pesuainete jääkide mõju biosensori väljundsignaalile

Paljud puhastusvahendid sisaldavad kloori, seetõttu uuriti laktaadi oksüdaasil põhineva biosensoriga kloori mõju näivale laktaadi kontsentratsioonile. Toimeainena sisaldavad kloori tabletid “aktiivset kloori”, mis käitub tugeva oksüdeerijana ja laktaat oksüdeeritakse püruvaadiks juba enne ensüümi lisamist vastavalt järgmisele reaktsioonile:



Seepärast vähenes oluliselt nii 1 mM laktaadi lahuses kui ka piimaproovides laktaadi kontsentratsiooni iseloomustav väljundvoolu kogumuutuse parameeter *A* (joonis 7). Juba 0.8 ppm kloori lisamine laktaadi lahusele ja piimaproovidele vähendas parameetri *A* väärtusi vastavalt 74.4 % ja 21.4 % võrreldes lisanditeta lahustega.

Piimaproovides oli muutus väiksem, sest kloor võib reageerida ka piimas leiduvate hapetega ning valkudega. Piimaproovides jõuab see sõltuvus platoole 3 ppm kloori sisalduse juures kui väljundvoolu väärtus on vähenenud 0.73-lt 0.46-ni. Kui praegu on piimatööstustes määramispiiriks vaba kloori sisaldus 20 ppm, siis laktaadi biosensoriga on piimas võimalik määrata kloori sisaldust alates kloori kontsentratsioonist 0.5 ppm. Laktaadi lahuses parameetri  $A$  sõltuvus uuritud kloori kontsentratsioonil (kuni 4 ppm) platoole ei jõudnud.



**Joonis 7.** Kloori mõju biosensori väljundvoolu kogumuutusele piimas (●) ja 1 mM laktaadi lahuses (○). Mõõtmised viidi läbi temperatuuril 25° C, 0.1 M fosfaatpuhvril, (pH=6.5), [LO] = 0.19 µg/ml.

#### 4.3 Antibiootikumide jääkide mõju biosensori väljundsignaalile

Antud töös uuriti veterinaarmeditsiinis kasutatavate antibiootikumide mõju laktaadi biosensori väljundsignaalile ja selle alusel hinnati nende määramise võimalusi piimas. Kuna antibiootikumide mõju realiseerub tavaliselt ensüümide

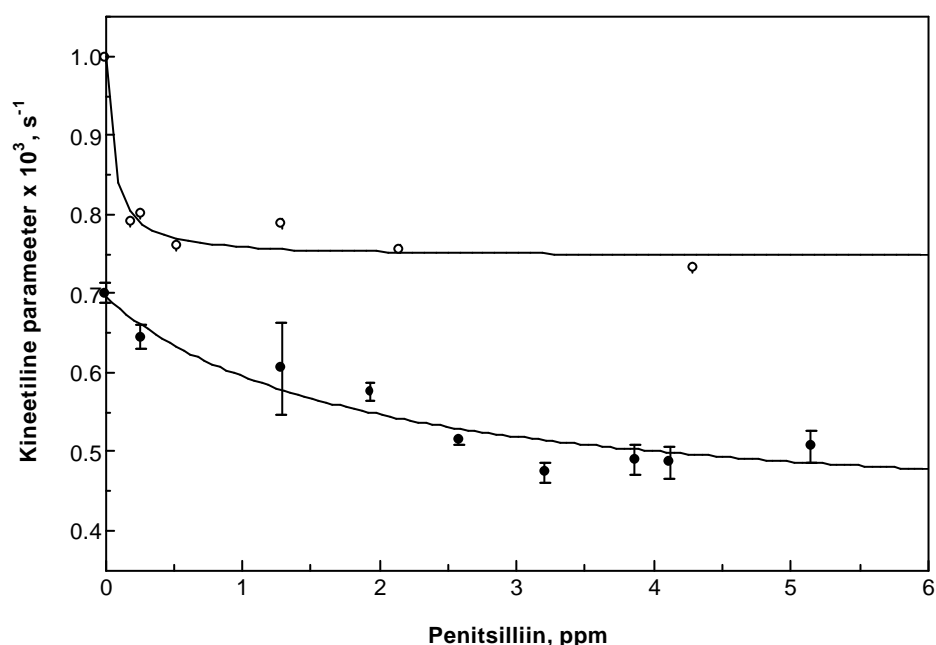
kaudu, siis peaks nende toimed muutuma biosensoris kasutatava laktaadi oksüdaasi aktiivsus ja sellest tulenevalt sensoriga mõõdetav laktaadi näiv kontsentratsioon.

Ilmnes, et erinevate ravimite toime on erinev nii väljundvoolu kogumuutusele kui ka kineetilisele parameetrile ja seda nii piimaproovides kui ka 1 mM laktaadi lahuses. Nende parameetrite alusel arvatud näiv laktaadi sisaldus lahuses oleneb nii kasutatavast antibiootikumist kui ka selle kontsentratsioonist.

### 4.3.1 Penitsilliini mõju laktaadi kontsentratsioonile

Kõige sagedamini kasutatakse veterinaarias bakteriaalsete infektsioonide raviks  $\beta$ -laktaame, sellepärast uuriti bensüülpenitsilliini mõju laktaadi väljundsignaali iseloomustavatele parameetritele.

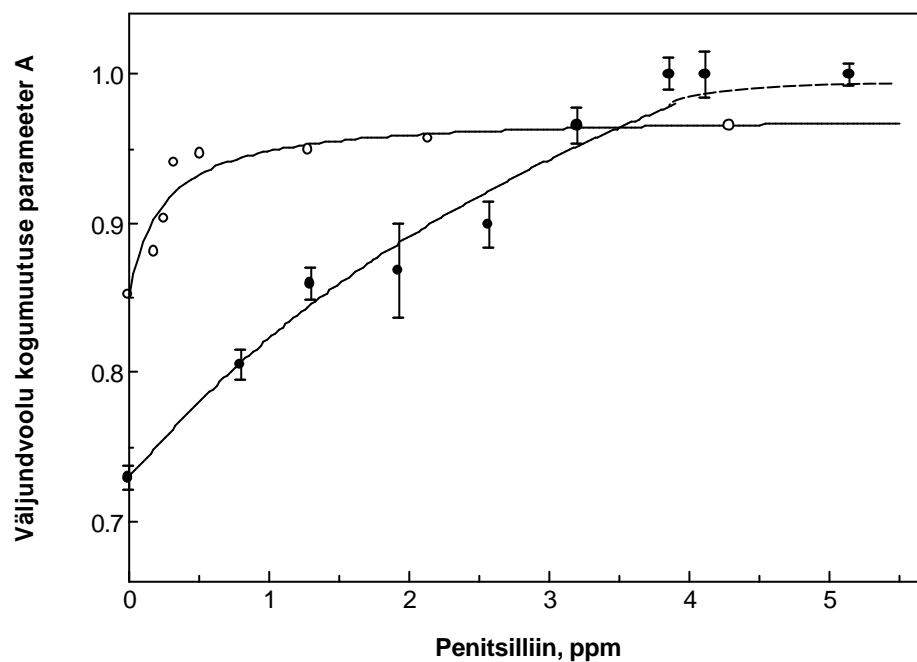
Bensüülpenitsilliini jääkide mõju kineetilisele parameetrile on näidatud joonisel 8. Bensüülpenitsilliini lisamisel väheneb kineetilise parameetri väärtus.



**Joonis 8.** Bensüülpenitsilliini mõju biosensori kineetilisele parameetrile piimas (●) ja 1 mM laktaadi lahuses (○). Mõõtmised viidi läbi temperatuuril 25<sup>o</sup> C, 0.1 M fosfaatpuhvril, (pH=6.5), [LO] = 0.19 µg/ml.

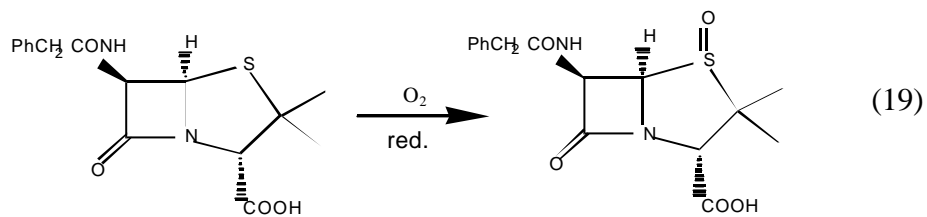
Maksimaalselt vähenes see parameeter bensüülpenitsilliini mõjul  $2.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  1 mM laktaadi lahuses ja  $2.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  piimas, seega bensüülpenitsilliini poolt põhjustatud efekti suuruses olulist erinevust piimaproovide ja laktaadi lahuse vahel ei olnud. Samal ajal oli kineetilise parameetri vähenemise kiirus 1 mM laktaadi lahuses peaaegu 3.7 korda kõrgem kui piimas. See võib olla tingitud piimaproovides leiduvatest valkudest, mis moodustavad penitsilliinis sisalduva  $\beta$ -laktaamtuuma kaudu donoorseid komplekse.

Väljundvoolu kogumuutus suurenes bensüülpenitsilliini lisamisel nii piimaproovides kui ka laktaadi lahuses (joonis 9).



**Joonis 9.** Bensüülpenitsilliini mõju biosensori väljundvoolu kogumuutusele piimas (●) ja 1 mM laktaadi lahuses (○). Mõõtmised viidi läbi temperatuuril  $25^{\circ} \text{ C}$ , 0.1 M fosfaatpuhvril, (pH=6.5),  $[\text{LO}] = 0.19 \mu\text{g/ml}$ .

Näiv laktaadi sisalduse kasv võib olla põhjustatud bensüülpenitsilliini kahevalentse väävlil muutumisest kolmevalentseks hapniku juuresolekul, mille tulemusena tekib sulfiidist sulfoksiid ja hapniku kontsentratsioon mõõdetavas lahuses langeb:



Laktaadi lahuses suurenes väljundvoolu kogumuutuse parameeter madalatel bensüülpenitsilliini kontsentratsioonidel kiiresti, seejärel jõudis väljundvoolu kogumuutuse väärtus platoole ja edasine bensüülpenitsilliini lisamine näivale laktaadi kontsentratsioonile enam mõju ei avaldanud. Bensüülpenitsilliini lisamine piimaproovidele suurendas oluliselt parameetri  $A$  väärtust. Piimaproovides saabus platoo väljundvoolu kogumuutuse väärtusel üks ( $A=1$ ), mis on parameetri  $A$  maksimaalne võimalik väärtus. Seega parameetri  $A$  väärtus tõusis piimas 37 % ning platoo väärtus saavutati 3.8 ppm bensüülpenitsilliini lisamisel (joonis 9). Laktaadi lahuses oli küll näiva laktaadi sisalduse muutus oluliselt väiksem, vaid 13 %, kuid platoo väärtus 0.95 saavutati juba 0.5 ppm bensüülpenitsilliini lisamisel. Seega penitsilliini kontsentratsioonist sõltuv piima väljundvoolu kõvera alg tõus oli ligikaudu kolm korda väiksem kui laktaadi kõveral, kuid bensüülpenitsilliini mõju suurus oli oluliselt suurem.

Piimas lubatud bensüülpenitsilliini tase on 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [6], mis on võimalik kaasaegsete analüüsimeetodite saavutada. Mikroobsete testidega saadakse määramispiiriks 3-8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , kiirete komplekstestidega 2-6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ning kromatograafiliselt saab penitsilliine detekteerida alates kontsentratsioonist 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Kuna bensüülpenitsilliin maksimaalse ühekordse manustamise korral looma organismi kaovad ravimi jäägid piimast 48 tunni möödumisel, siis on väga oluline välja töötada kiired meetodid penitsilliinide määramiseks kohapeal, et eraldada saastatud piim koheselt, sest praegusel ajal kasutatavate meetoditega võtab penitsilliinide määramine aega kuni 6 tundi.

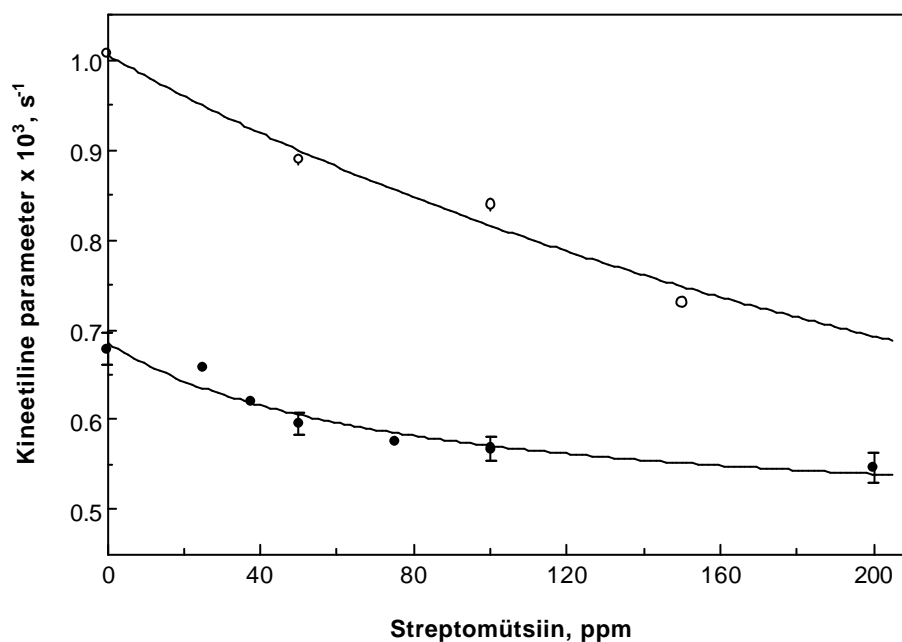
#### 4.3.2 Streptomütsiini mõju laktaadi kontsentratsioonile

Streptomütsiin kuulub aminoglükosiidide klassi, mida kasutatakse iseseisvalt või koos penitsilliinidega bakteriaalsete haiguste raviks nii veterinaarmeditsiinis kui

ka inimeste ravimisel. Streptomütsiin ei oma inimese organismile otsest toksilist efekti, kuid ebaõige kasutamine võib põhjustada mitmeid allergilisi reaktsioone. Streptomütsiini määramine toidus on tema omaduste (aluselisus, hüdrofiilsus) tõttu raskendatud.

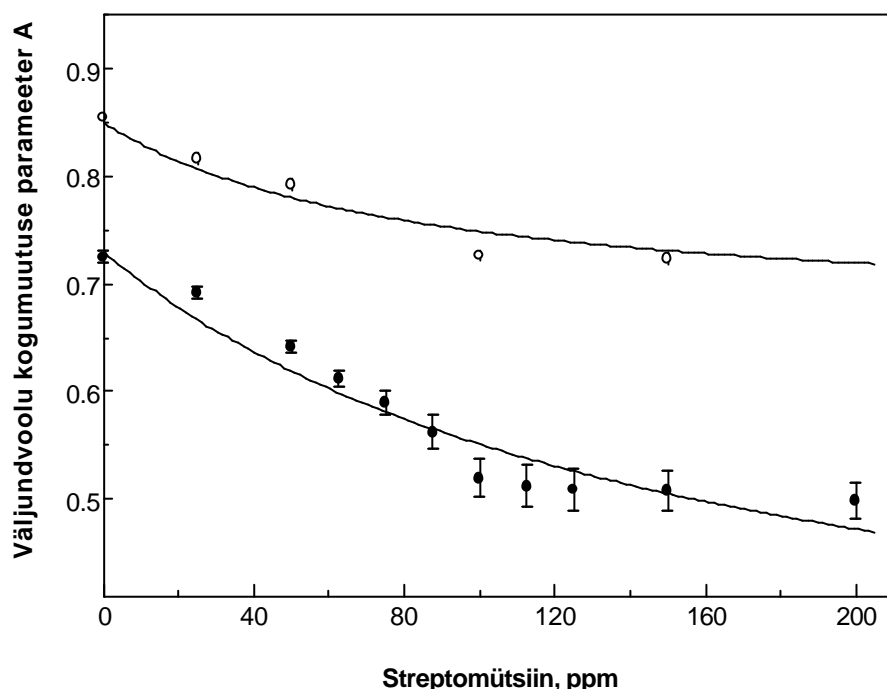
Streptomütsiini sulfaadi mõju laktaadi biosensori väljundvoolule uuriti piimaproovides ja 1 mM laktaadi lahuses.

Streptomütsiini sulfaadi mõju biosensori väljundsignaali iseloomustavale kineetilisele parameetrile on toodud joonisel 10. Kineetilise parameetri märgatav muutus toimus 1 mM laktaadi lahuses, kus selle väärtus vähenes kuni 34 %. Piimas on kineetilise parameetri muutus väiksem, selle väärtus langes 19 % ja jõudis platoole 75 ppm streptomütsiini sulfaadi mõjul ning edasine streptomütsiini kontsentratsiooni lisamine kineetilise parameetri väärtust enam ei mõjutanud.



**Joonis 10.** Streptomütsiini sulfaadi mõju biosensori kineetilisele parameetrile piimas (●) ja 1 mM laktaadi lahuses (○). Mõõtmised viidi läbi temperatuuril 25<sup>o</sup> C, 0.1 M fosfaatpuhveris (pH=6.5), [LO] = 0.19 μg/ml.

Streptomütsiini sulfaadi lisamisel vähenes oluliselt biosensori mudeli alusel arvatud väljundvoolu kogumuutuse parameeter  $A$  (joonis 11). Piimas vähenes väljundvoolu kogumuutus maksimaalselt 0.22 ühikut ja jõudis platoole parameetri  $A$  väärtuse 0.5 juures 100 ppm streptomütsiini sulfaadi lisamisel. Sama koguse antibiootikumi lisamisel laktaadi lahusele toimub väljundvoolu kogumuutuse vähenemine vaid 0.13 ühikut ja väljundvoolu kogumuutuse platoon saabus parameetri  $A$  väärtuse 0.72 juures. Samas on väljundvoolu muutuse vähenemise kiirused mõlemas lahuses omavahel võrreldavad.



**Joonis 11.** Streptomütsiini sulfaadi mõju biosensori väljundvoolu kogumuutusele piimas (●) ja 1 mM laktaadi lahuses (○). Mõõtmised viidi läbi temperatuuril 25° C, 0.1 M fosfaatpuhvril (pH=6.5), [LO] = 0.19 µg/ml.

Suurtel streptomütsiini kontsentratsioonidel üle 300 ppm ei olnud kasutatud puhverlahuse puhvermahtuvus piisav ja streptomütsiini lisamine mõjutas lahuse pH-d, muutes keskkonda aluselisemaks, mistõttu ei saadud võrreldavaid andmeid.

Lubatud streptomütsiini sisaldus piimas on 200 µg/kg [6].

Streptomütsiini määratakse mikroobsete testidega, kuid need pole eriti usaldusväärsed ja seepärast kasutatakse põhiliselt immuunreaktsioonil põhinevat detekteerimist, mille puhul streptomütsiini määramispiiriks on 15-30 µg/kg. Streptomütsiini aluselisuse ja hüdrofiilsuse tõttu on selle kromatograafiline määramine raskendatud.

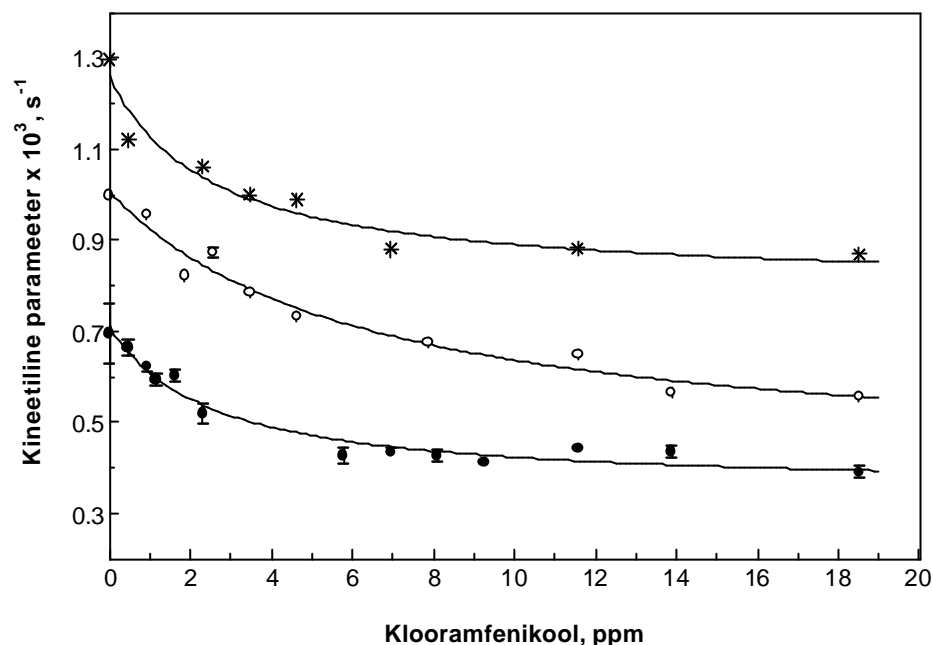
### 4.3.3 Klooramfenikooli mõju näivale laktaadi kontsentratsioonile

Klooramfenikool on laia toimespektriga antibiootikum, mille kasutamine on keelatud selliste loomade puhul, mille liha või piima kasutatakse inimtoiduks. Sellest nõudest aga ei peeta sageli kinni, sest klooramfenikooli toime bakteriaalsete haiguste ravimisel on tõhus. Klooramfenikooli mittesihipärast kasutamist kinnitab ka paari aasta tagune piimatoodete ekspordi juhtum, kui Eestist pärit piimapulbris avastati klooramfenikooli jääke, mille määramiseks eesti laborites puudusid võimalused. Osad piimatootjad lähevad klooramfenikooli kasutamisel riski peale ka teadlikult, sest puudub kiire ja usaldusväärne meetod klooramfenikooli määramiseks. Klooramfenikooli määramiseks ei ole olemas ühtegi mikroobse inhibeerimise testi ja immuunoloogiliste testide määramispiir on vahemikus 10-300 µg/kg. Väga tundlik on kromatograafiline määramine, kus klooramfenikooli detekteerimispiiriks on 0.5-5 µg/kg. Probleemiks kromatograafilise määramise puhul on aga selle suur ajakulu ja kõrge hind. Samas ei jõua nii mõnigi positiivne piimaproov lihtsalt viimase määramisetapini, sest eelnevad testid on andnud negatiivse tulemuse.

Käesolevas töös uuriti klooramfenikooli määramise võimalusi piimas laktaadi biosensoriga.

Klooramfenikooli lisamine avaldas laktaadi biosensori kineetilisele parameetrile mõju nii laktaadi lahustes kui ka piimaproovides (joonis 12). 18.5 ppm klooramfenikooli lisamine põhjustas kineetilise parameetri languse piimas  $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , 1 mM laktaadi lahuses  $4.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  ja 1.5 mM laktaadi lahuses  $4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Seega kineetilise parameetri vähenemise suurus ei sõltu laktaadi sisaldusest lahuses. Küll aga sõltus laktaadi hulgast maksimaalse efekti (plato) saavutamiseks vaja mineva antibiootikumi kogus, sest piima ja 1.5 mM laktaadi lahuse korral saabus plato juba

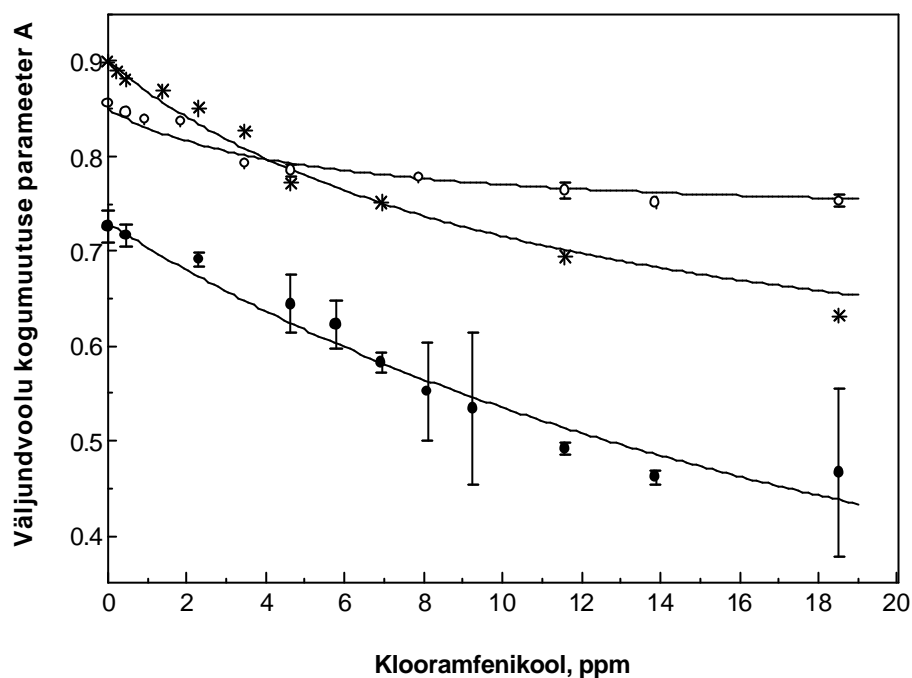
7 ppm klooramfenikooli lisamisel, samal ajal kui 1 mM laktaadi lahuses jõudis kineetilise parameetri väärtus platoole 14 ppm klooramfenikooli lisamisel (joonis 12).



**Joonis 12.** Klooramfenikooli mõju biosensori kineetilisele parameetritele piimas (●), 1 mM laktaadi lahuses (○) ja 1.5 mM laktaadi lahuses (□). Mõõtmised viidi läbi temperatuuril 25° C, 0.1 M fosfaatpuhvrts (pH=6.5), [LO] = 0.19 µg/ml.

Klooramfenikooli lisamisel laktaadi sisaldavale lahusele vähenes väljundvoolu kogumuutuse parameeter  $A$ . Seejuures sõltusid nii väljundvoolu muutumise kiirus kui ka vähenemise ulatus nii klooramfenikooli kui ka laktaadi sisaldusest lahuses (joonis 13). Näiteks klooramfenikooli 4.6 ppm lisamine põhjustas 1 mM laktaadi lahuses 8.3 %-lise väljundvoolu parameetri  $A$  muutuse, kuid piimas, mis vastab umbes 1.4 mM laktaadi lahusele, ja 1.5 mM laktaadi lahuses olid parameetri  $A$  muutused sama klooramfenikooli koguse juures vastavalt 11.2 % ja 14.3 %. 1 mM laktaadi lahusele 12 ppm klooramfenikooli lisamisel jõudis väljundvoolu kogumuutus platoole parameetri  $A$  väärtusel 0.76. Piima korral saabus platoole väärtusel 0.47 levomütsetiini 14 ppm lisamisel ja 1.5 mM laktaadi korral tuli lisada 18.5 ppm levomütsetiini, et

saavutada väljundvoolu platoo parameetri  $A$  väärtusel 0.63. Väljundvool vähenes kõigil juhul hüperboolselt, kuigi mida suurem oli laktaadi sisaldus, seda kiirem oli vähenemine kõvera alguses. Kineetilise parameetri vähenemise kiirus erineb 1 mM ja 1.5 mM laktaadi lahustes 1.5 korda.



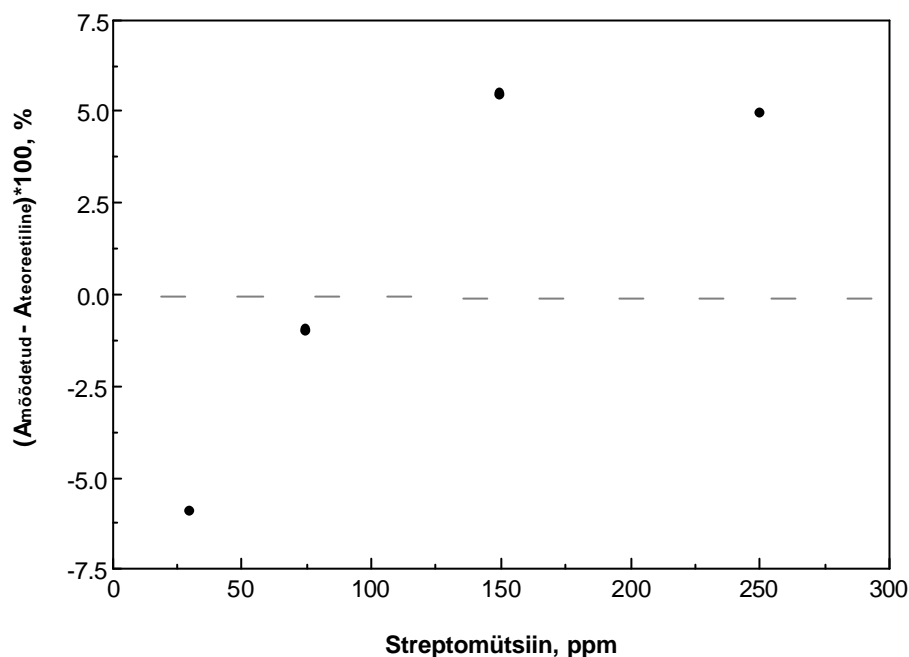
**Joonis 13.** Klooramfenikooli mõju biosensori väljundvoolu kogumuutusele piimas (●), 1 mM laktaadi lahuses (○) 1.5 mM laktaadi lahuses (◻). Mõõtmised viidi läbi temperatuuril 25° C, 0.1 M fosfaatpuhvrts (pH=6.5), [LO] = 0.19 µg/ml.

#### 4.4 Antibiootikumide koosmõju väljundvoolu kogumuutusele

Käesolevas töös uuriti ka antibiootikumide koosmõju laktaadi biosensoriga mõõdetavatele parameetritele.

Bensüülpenitsilliin suurendas laktaadi näivat hulka lahuses, samal ajal kui streptomütsiin ja klooramfenikool seda vähendasid. Esiteks uuriti streptomütsiini sulfaadi ja bensüülpenitsilliini koosmõju biosensori väljundvoolu kogumuutusele.

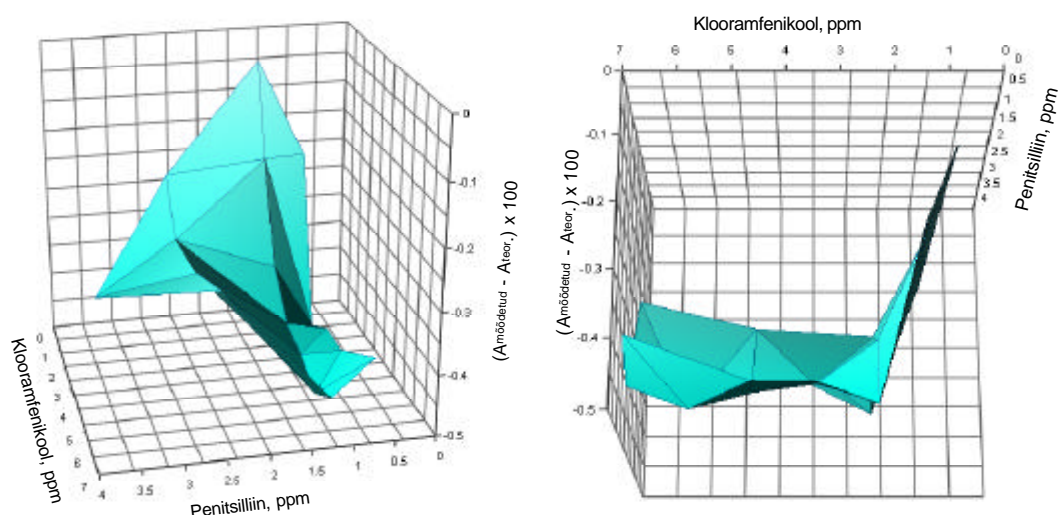
Madalatel streptomütsiini kontsentratsioonidel jääb väljundvoolu kogumuutus väiksemaks kui puhaste antibiootikumide efektide liitmisel eeldada võiks (joonis 14). Samal ajal on kõrgematel streptomütsiini sulfaadi sisaldustel sama penitsilliini koguse juures parameetri  $A$  väärtus suurem kui eraldi mõõdetud efektide liitmisel.



**Joonis 14.** Antibiootikumide koosmõju väljundvoolu kogumuutusele piimas penitsilliini kontsentratsioonil 1.29 ppm. Mõõtmised viidi läbi temperatuuril 25° C, 0.1 M fosfaatpuhveris (pH=6.5), [LO] = 0.19 µg/ml.

Viimasel juhul avaldub nende antibiootikumide sünergistlik toime, mille tõttu neid antibiootikume meditsiinis ka koos kasutatakse [44]. Huvitav on märkida, et see sünergistlik efekt on detekteeritav ka mittefüsioloogiliselt in vitro tingimustes lihsate mõõtmisvahendite ja – meetodikatega. Nagu ilmneb saadud tulemustest, võib nimetatud kahe ravimi kasutamisel vales kontsentratsiooni suhtes tagajärjeks olla hoopis nende mõju vähenemine. Võimalust määrata erinevate ravimite vastastikust mõju biosensori abil tuleks edaspidi kindlasti põhjalikumalt uurida.

Uuriti ka klooramfenikooli ja bensüülpenitsilliini koosmõju laktaadi biosensori väljundvoolu kogumuutusele. Nende kahe antibiootikumi poolt põhjustatud väljundvoolu muutuse väärtus oli väiksem kui eraldi mõõtmistel saadud suuruste summaarne efekt kõikidel uuritud bensüülpenitsilliini ja klooramfenikooli erinevatel kontsentratsioonidel (joonis 15). See viitab nende kahe ravimi antagonismile, mida on täheldatud ka meditsiinilistes uurimustes ja seetõttu ei ole otstarbekas neid koos kasutada [44,45]. Väljundsignaali kogumuutuse vähenemine ei olnud ühtlane ning kolmemõõtmelisel (3D) graafikul moodustus ebasümmeetriline nõgus pind sõltuvalt antibiootikumide kontsentratsioonidest (joonis 15). Suurim antagonistlik efekt ilmnes penitsilliini kontsentratsioonil alla 1 ppm ja klooramfenikooli kontsentratsioonidel 2 kuni 5 ppm.



**Joonis 15.** Antibiootikumide koosmõjul moodustunud ebasümmeetriline gaussi pind. Erinevate penitsilliini ja klooramfenikooli kontsentratsioonide mõju suhtelisele väljundvoolu kogumuutusele piimas. Mõõtmised viidi läbi temperatuuril 25<sup>o</sup> C, 0.1 M fosfaatpuhvril (pH=6.5), [LO] = 0.19 µg/ml.

#### 4.5 Antibiootikumide jääkide kvantitatiivne määramine piimas

Saadud tulemused loovad eelduse laktaadi oksüdaasil põhineva biosensori kasutamiseks piimas leiduvate antibiootikumide jääkide määramiseks. Eriti perspektiivne on töötada välja meetodika penitsilliini määramiseks, mille puhul on iseloomulikuks biosensori väljundsignaali kogumuutuse märgatav suurenemine, kusjuures analoogilist efekti ei põhjustanud ükski teine uuritud saasteaine.

Käesolevas töös kasutatud laktaadi biosensor võimaldas bensüülpenitsilliini kvantitatiivset määramist tasakaaluse väljundvoolu andmetest leitud parameetrite põhjal, kusjuures bensüülpenitsilliini väljundvoolu kogumuutuse sõltuvus on praktiliselt lineaarne kuni bensüülpenitsilliini kontsentratsioonini 2.5 ppm (joonis 9). Määramispiiri alandamiseks on vaja kasutada oluliselt tundlikumaid seadmeid hapniku kontsentratsiooni detekteerimiseks.

Suhteliselt väikeste väljundvoolu muutuste efektide tõttu saab laktaadi oksüdaasil põhineva biosensoriga määrata streptomütsiini sisaldust alates 30 ppm-st, väljundvoolu graafik on lineaarne kuni streptomütsiini kontsentratsioonini 90 ppm (joonis 11).

Kasutatud laktaadi biosensoriga saavutati klooramfenikooli määramispiiriks piimas 0.4 ppm, mis on võrreldav kasutatavate immunoloogiliste testide määramispiiriga. Klooramfenikoolist põhjustatud väljundvoolu kogumuutuse graafik oli piimaproovides lineaarne kuni klooramfenikooli kontsentratsioonini 14 ppm (joonis 13).

Antibiootikumide koosmõju uurimine näitas, et kliinilistes in vivo uuringutes saadud tulemusi on võimalik detekteerida ka in vitro mõõtmistel. See annab võimaluse erinevate ainete koosmõju uurimiseks in vitro tingimustes füsiokokeemiliste meetoditega ning uuritavate nähtuste iseloomustamiseks ja kirjeldamiseks molekulaarsel tasemel.

## KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida saasteainete määramise võimalusi piimas amperomeetrilise laktaadi oksüdaasil põhineva biosensoriga.

Saasteaine kontsentratsiooni määramiseks kasutati nende mõju laktaadi oksüdeerumisreaktsiooni kineetikale ja laktaadi näivat kontsentratsiooni iseloomustavatele parameetritele. Ilmnes, et nii puhastusvahendites sisalduv kloor kui ka veterinaarias kasutatavad antibiootikumid vähendavad nii piimaproovides kui ka laktaadi puhverlahuses kineetilise parameetri väärtust. Klooril põhinevad deso- ja puhastusvahendid vähendavad märgatavalt ka teist biosensori väljundvoolu andmete alusel arvutatud parameetrit – väljundvoolu kogumuutuse parameetrit. Antibiootikumide mõju parameetritele  $A$  oli erinev: penitsilliini mõjul selle väärtus suurenes, kuid streptomütsiini ja klooramfenikooli mõjul vähenes. See asjaolu võimaldab põhimõtteliselt kasutada biosensorit penitsilliini määramiseks, kuna ühegi teise seni uuritud saasteaine korral sellist efekti ei esinenud.

Antibiootikumide koosmõju katsed kinnitasid varem tehtud kliinilisi uuringuid, et penitsilliini ja streptomütsiini koos kasutamisel on nende efekt sünergistlik, kuid penitsilliini ja klooramfenikooli korral antagonistlik. Efekt ja selle suurus sõltub mõõdetavate antibiootikumide omavahelisest kontsentratsioonide suhtest.

Läbiviidud mõõtmised on aluseks edaspidistele uurimustele antibiootikumide ja teiste lisa- ning saasteainete mõju ja koosmõju iseloomustamisel elektrokeemiliste sensoritega bioloogilistes lahustes.

## SUMMARY

In the present study were examined the possibilities of determination the impurities in milk with oxygen sensor based lactate biosensor. The concentrations of the residual of washing agents and antibiotics were determined with the two characteristic reaction parameters of biosensor output signal, calculated from the biosensor transient response data with the help of dynamic biosensor model.

The influence the residues of the milk impurities on the biosensor signal parameters was studied both in raw milk and in 1 mmol/l lactate solution.

All studied substances decreased the value of the kinetic parameter. Washing agents, including chlorine, reduced also the total signal change parameter  $A$ . The influence of antibiotics on the value of parameter  $A$  was different, as penicillin increased it, but streptomycin and chloramphenicol decreased this value.

We also studied the shift of the change of parameter  $A$  in milk as a combined effect of different antibiotics. The change of parameter  $A$  was smaller than the summarized effect of penicillin and chloramphenicol on this parameter at every studied combination of different concentrations. The same antagonistic effect has also been noticed in clinical studies. The combined effect of streptomycin and penicillin depend on the antibiotics' concentrations.

The obtained results form a good basis for further studies of cooperative effects of different compounds in biological fluids with electrochemical sensor.

## KASUTATUD KIRJANDUS

1. Kuresoo, M. *Piimakoguja käsiraamat*, EV PÕM, Tallinn, 2002.
2. Olkonen, A. *Piimanduse käsiraamat*, Greif OÜ Trükikoda: Tartu, 2001.
3. <http://www.epkk.ee> Eesti Põllumajanduse-Kaubanduskoda.
4. <http://www.foodsci.uoquelpa.ca/dairyedu/> Dairy Chemistry and Physics, 2004
5. Takeba, K., Fujiinuma, K., Miyazaki, T., Nakazawa, H. Simultaneous determination of B-lactams antibiotics in milk by ion-pair liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1998, **812**, 205-211.
6. Toidus lubatud saasteainete loetelu ja piinormide kinnitamine. *Riigi Teataja I osa*, 1999, **21**, 342.
7. Ramirez, A., Gutierrez, R., Diaz, G., Gonzalez, C., Perez, N., Vega, S., Noa, M. High-performance thin-layer chromatography-bioautography for multiple antibiotics residues in cow's milk. *Journal of Chromatography B*, 2003, **784**, 315-322.
8. Toor- ja kuumtöödeldud piimast kontrollproovide võtmise ja analüüsimeetodid. *Riigi Teataja I osa*, 2003, **18**, 167.
9. Pangsep, M., Pärn, J. Kloori sisaldavate desinfitseerimiseainete jääkide esinemine toorpiimas. *Teaduslik-praktiline konverents LPT 40.40 aastat liha- ja piimatenhologia alast haridust EPA-s*, 2000, 44-47.
10. Püssa, T. *Kvalitatiivne orgaaniline analüüs*, Tartu Ülikool, Tartu, 1995.
11. <http://www.reg.agri.ee/> Jõudluskontrolli keskus.
12. Grunwald, L., Petz, M. Food processing effects on residues: penicillins in milk and yoghurt. *Anal.Chim.Acta*, 2004, **483**, 73-79.
13. Ghidini, S., Zanardi, E., Varisco, G., Chizzolini, R. Prevalence of molecules of B-lactam antibiotics in bovine milk in lombardia and emilia romagna. *Ann.Fac.Medic.Vet.di Parma*, 2002, **22**, 245-252.
14. Gustavsson, E., Bjurling, P., Sternesjö, A. Biosensor analysis of penicillin G in milk based on the inhibition of carboxypeptidase activity. *Anal.Chim.Acta*, 2002, **468**, 153-159.
15. Aureli, P., Ferrini, A.M., Mannoni, V. Presumptive identification of sulphonamide and antibiotic residues in milk by microbial inhibitor tests. *Food Control*, 1996, **7**, 165-168.
16. Chem, H.C., Chang, T.C. Detection of penicillin G in mil using a conductimetric method. *Journal of Dairy Science*, 1994, **77**, 1515-1520.

17. Neaves, P. Monitoring antibiotics in milk - the changing world of test methods. *British mastitis conference*, 1999, 15-23.
18. Nouws, J., Van Egmond, H., Smulders, I., Loeffen, G., Schouten, J., Stegeman, H. A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue levels. *International Dairy Journal*, 1999, **9**, 85-90.
19. Rapid test kits for detection of antibiotics and sulphonamides in milk. *Food safety authority of Ireland*, 2002, **06**, 1-23.
20. Hammer, P., Kirchhoff, H., Hahn, G. Detection of streptomycins in raw milk by an antibody-capture immunoassay. *Analytica Chimica Acta*, 1993, **273**, 313-316.
21. Scannella, D., Neaves, P., Keedy, K., Bell, C. An evaluation of the Delvo X-Press test for detecting B-Lactams in ex-farm raw milks. *International Dairy Journal*, 1997, **7**, 93-96.
22. <http://www.iso.ch/iso/en/CatalogueListPage.CatalogueList> ISO tests.
23. Pearson, J.E., Gill, A., Vadgama, P. Analytical aspects of biosensors. *Ann.Clin.Biochem.*, 2000, **37**, 119-145.
24. Setford, S.J., Van Es, R.M., Blankwater, Y.J., Kröger, S. Receptor binding protein amperometric affinity sensor for rapid B-lactams quantification in milk. *Anal.Chim.Acta*, 1999, **398**, 13-22.
25. Hock, B., Seifert, M., Kramer, K. Engineering receptor and antibodies for biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, 2002, **17**, 239-249.
26. Gaudin, V., Fontaine, J., Maris, P. Screening of penicillin residues in milk by a surface plasmon resonance-based biosensor assay: comparison of chemical and enzymatic sample pre-treatment. *Anal.Chim.Acta*, 2001, **436**, 191-198.
27. Schenck, F.J., Callery, P.S. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *Journal of Chromatography A*, 1998, **812**, 99-109.
28. Shaikh, B., Moats, W.A. Liquid chromatographic analysis of antibacterial drug residues in food products of animal origin. *J.Chromatogr.*, 1993, **643**, 369-378.
29. Voyksner, R.D., Tyczkowska, L., Aronson, A.L. Development of analytical methods for some penicillins in bovine milk by ion-paired chromatography and confirmation by thermospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B - Biomedical Applications*, 1991, **567**, 389-404.
30. Van de Water, C., Haagsma, N. Analysis of chloramphenicol residues in swine tissues and milk: comparative study using different screening and quantitative methods. *Journal of Chromatography B - Biomedical Applications*, 1991, **566**, 173-185.
31. Moats, W.A., Romanowski, R.D. Multiresidue determination of b-lactam antibiotics in milk and tissue with the aid of high-performance liquid chromatographic fractionation for clean up. *Journal of Chromatography A*, 1998, **812**, 237-247.

32. Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, **79**, 3-16.
33. Serra, B., Reviejo, A.J., Parrado, C., Pigarron, J.M. Graphite-teflon composite bienzyme electrodes for the determination of L-lactate: Application to food samples. *Biosensors & Bioelectronics*, 1999, **14**, 505-513.
34. Toidus lubatud lisainete loetelu ja piinormid toidugruppide kaitsmine, lisainete kasutamise tingimused ja viisid ning lisainete määrgistamine ja muul viisil teabe edastamise erinõuded ja kord. *Riigi Teataja I osa*, 2000, **23**, 131.
35. Fernandez-Villamil, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Tunon-Blanco, P. Immobilized enzyme electrode for the determination of L-lactate in food samples. *Anal.Chim.Acta*, 1997, **345**, 37-43.
36. Patel, N.G., Erlenkötter, A., Cammann, K., Chemnitz, G. -C. Fabrication and characterization of disposable type lactate oxidase sensors for dairy products and clinical analysis. *Sensors and Actuators B*, 2000, **67**, 134-141.
37. Collier, W., Janssen, D., Hart, A.L. Measurement of soluble L-lactate in dairy products using screen-printed sensor in batch mode. *Biosensors & Bioelectronics*, 1996, **11**, 1041-1049.
38. Casimiri, V., Burstein, C. Biosensor for L-lactate determination as an index of E.coli number in crude culture medium. *Anal.Chim.Acta*, 1998, **361**, 45-53.
39. Kwan, R.C.H., Hon, P.Y.T., Mak, K.K.W., Renneberg, R. Amperometric determination of lactate with novel trienzyme/poly(carbamoyl) sulfonate hydrogel-based sensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 2004, In Press.
40. Collier, W., Hart, A.L., Lovejoy, P. Estimation of soluble L-lactate in dairy products using screen-printed sensors in a flow injection analyser. *Biosensors & Bioelectronics*, 1998, **13**, 219-225.
41. Torriero, A.A.J., Salinas, E., Battaglini, F., Raba, J. Milk lactate determination with a rotating bioreactor based on an electron transfer mediated by osmium complexes incorporating a continuous-flow/stopped-flow system. *Anal.Chim.Acta*, 2003, **498**, 155-163.
42. Bardeletti, G., Sechaud, F., Coulet, P.R. A reliable L-lactate electrode with a new membrane for enzyme immobilization for amperometric assay of lactate. *Anal.Chim.Acta*, 1986, **187**, 47-54.
43. Rinke, T. The modelling of amperometric biosensors based on oxidoreductases. *D.Sc. thesis*, Tartu Ülikool, Tartu, 2000.
44. Mikelsaar, M., Karki, T. Antibiootikumid. In *Meditiiniline mikrobioloogia I osa*, Tartu Ülikooli, Tartu, 1998, 99-114.
45. Shann, F., Barker, J., Poore, P. Chloramphenicol alone versus chloramphenicol plus penicillin for bacterial meningitis in children. *The Lancet*, 1985, **326**, 681-684.