

ASKORBIINIHAPON JA DEHYDROASKORBIINIHAPON MÄÄRISTÄ MAIDOSSA ERI KÄSITTELY- JA SÄILYTYSVAIHEISSA

HELGE GYLLENBERG, MARJATTA ROSSANDER ja PAAVO ROINE
Helsingin yliopiston ravintokemian laitos,
Helsinki

Saapunut 16. 5. 1953

Ensimmäiset maidon C-vitamiinipitoisuutta koskevat tutkimukset 1920-luvulla suoritettiin biologisia menetelmiä hyväksi käyttäen. Kun C-vitamiini-aktiivisuuden omaava yhdistys oli osoitettu askorbiinihapoksi, kehitettiin askorbiinihapon pelkistämiskykyyn perustuvia, yksinkertaisesti suoritettavia kemiallisia määritysmenetelmiä. 1930-luvulla todettiin kuitenkin eroja kemiallisten ja biologisten menetelmien antamien tulosten välillä. Tämä osoittautui johtuvaksi siitä, että myös askorbiinihapon hapettunut muoto — *dehydroaskorbiinihappo*, joka ei enää pelkistä määrityksessä tavallisimmin käytettyä 2,6-diklorfenolindofenolia — on fysiologisesti aktiivinen, omaten saman C-vitamiinitehon kuin askorbiinihappo.

Maitoa koskevissa tutkimuksissa kiinnittivät WASHBURN ja KRAUS (24) erityistä huomiota dehydroaskorbiinihapon määrittämisen välttämättömyyteen askorbiinihapon ohella maidon totaalista C-vitamiinipitoisuutta tutkittaessa. Siitä lähtien onkin maidon C-vitamiinipitoisuutta käsittelevissä tutkimuksissa kiinnitetty tähän seikkaan huomiota, joskin maidon dehydroaskorbiinihaposta on käytettävissä varsin vähän tietoja verrattuna siihen laajaan kirjallisuuteen, joka maidon askorbiinihappopitoisuudesta ja sen muutoksista eri käsittelyvaiheissa on julkaistu.

Maidon dehydroaskorbiinihappopitoisuus on useimmissa tutkimuksissa määritetty soveltamalla dehydroaskorbiinihapon pelkistämistä rikkivedyllä. On kuitenkin ilmeistä, että tätä menetelmää on pidettävä epävarmana, etenkin biologisiin materiaaleihin sovellettuna (vrt. esim. 2, 7, 4). Tämä johtuu pääasiassa siitä, että rikkivetykäsittely johtaa muidenkin pelkistävien yhdistysten muodostumiseen, jotka häiritsevät askorbiinihapon määrittämistä.

Kun nimenomaan Suomesta ei ole käytettävissä juuri lainkaan tietoja maidon dehydroaskorbiinihappopitoisuudesta ja sen suhteesta askorbiinihapon määrään, tullaan seuraavassa esittämään tätä seikkaa selvittävää tutkimusaineistoa. Vaikka aineisto onkin suhteellisen suppea eikä näin ollen oikeuta pitkälle meneviin johtopäätöksiin, se kuitenkin osaltaan valaisee tätä ravitsemuksen kannalta tärkeätä

kysymystä. On myös syytä todeta, että esitettäviin tuloksiin on päädytty soveltamalla dehydroaskorbiinihapon määrittämisessä ilmeisesti varsin tarkoituksenmukaisista menetelmää. Tätä menetelmää selostetaan seuraavassa yksityiskohtaisesti.

Kirjallisuuskatsaus

Vastalypsetyissä maidossa on C-vitamiinin yleensä todettu esiintyvän miltei täydellisesti askorbiinihappona. KON ja WATSON (15) sekä HAND (5) eivät todeneet vastalypsetyissä maidossa lainkaan dehydroaskorbiinihappoa ja KNIGHT ym. (13) vain poikkeuksellisesti pieniä määriä. HOLMBERG (10) totesi tunnin säilytyksen jälkeen pimeässä n. 10 % dehydroaskorbiinihappoa C-vitamiinin kokonaismäärästä. NIKKILÄN (18) tulokset, joiden mukaan eräissä näytteissä oli heti lypsyn jälkeen jopa 20 mg/l dehydroaskorbiinihappoa, siis lähes yhtä paljon kuin askorbiinihappoa-kin, johtunevat käytetyn rikkivety-menetelmän epävarmuudesta. Ilmeiseltä näyttää, että dehydroaskorbiinihappo syntyy maidossa vasta säilytyksen ja käsittelyn aikana askorbiinihapon hapettuessa.

Askorbiinihapon hapettumista katalysoivat yleensä metallit (lähinnä kupari ja rauta), valo ja askorbiinihappo-oksidaasientsyymi. Maidossa tulevat kysymykseen vain metalli- ja valokatalyysi. Viimeksimainittuun katalyysiin liittyy olennaisena tekijänä riboflaviini-proteiini-kompleksi, jonka määrä maidossa kuitenkin on jotenkin vakinainen, joten sen muutokset eivät muodostu fotolyysiä rajoittavaksi tai kiihdyttäväksi tekijäksi.

Hapen läsnäolo on välttämätön sekä metalli- että valokatalyysissä. Sen vaikutus voidaan esittää seuraavalla yksinkertaisella kaavalla:



Siten jokaisen askorbiinihappomolekyylin hapettamiseen dehydroaskorbiinihappoksi kuluu 1 atomi happea. On kuitenkin todettu, että metallikatalyyttisessä hapettumisessa kuluu 1.19—1.67 atomia happea askorbiinihappomolekyylä kohti ja fotolyttisessä 1.57—2 atomia (6), mikä osoittaa, että dehydroaskorbiinihapon muodostumisen lisäksi tapahtuu muitakin hapettumisreaktioita. Näissä reaktioissa muodostuvilla yhdistyksillä, enempiä kuin dehydroaskorbiinihaposta syntyvällä 2,3-diketogulonihapollakaan ei ole enää C-vitamiini-aktiivisuutta.

Käytännössä voidaan metallien aiheuttama maidon C-vitamiinipitoisuuden alentuminen rajoittaa jotenkin merkityksettömäksi käyttämällä tarkoituksenmukaisia säilytysastioita ja meijerikoneistoja. Ratkaiseviksi tekijöiksi C-vitamiinin säilymisen kannalta jäävät näin ollen maitoon liunneen hapen määrä sekä valon vaikutus.

Maidon happipitoisuudesta ei ole käytettävissä tietoja Suomesta. Ulkolaisten lähteiden mukaan (3, 9, 20) maito on utareessa miltei happivapaata. Lypsettyä siihen kuitenkin sekoituu ilmaa (4.7—5.8 mg O₂/l). — Käsin lypsettyä jonkin verran enemmän kuin konelypsyissä. Maidon säilytyksen ja kuljetuksen aikana happipitoisuus edelleen lisääntyy ollen meijerin vaa'assa n. 7 mg/l. HERREID ja FRANCISIN (9) mukaan tämä happimäärä säilyy maidossa siten, että pulloitetussa maidossa

on suunnilleen sama happipitoisuus kuin meijeriin punnitussa. Meijerikäsittely aiheuttaa kuitenkin eräitä vaihteluja, joista mainittakoon pastöroinnin happipitoisuutta alentava vaikutus sekä homogenisoinnin ja jäädytyksen kohottava vaikutus. Eräät tutkimukset käytännön olosuhteissa (3, 20) ovat osoittaneet, että maidon deaeroiminen, happipitoisuuden alentaminen 0.4—0.5 mg:aan/l, on ratkaisevasti edistänyt maidon askorbiinihapon säilyvyyttä.

Valon suhteen tiedetään, ettei väritön lasi suojaa maitoa askorbiinihappohäviöiltä (11). Vahalla impregnoidut paperiastiat suojaavat sitävastoin jo huomattavan hyvin (11) ja parhaan suojan tarjoavat värilliset lasiastiat (7, 22). Värillisistä lasista ovat punaiset ja ruskeat edullisimmat (11, 16, 17), kun sen sijaan vihreissä pulloissa tapahtuu melko nopeaa askorbiinihapon häviämistä (10, 11).

Maidon kuumentamisen (pastöroinnin) vaikutus riippuu lähinnä hapettumisreaktioiden lämpötilakertoimista, siis siitä missä määrin kohoava lämpötila kiihdyttää reaktioita. WOESSNER ym. (25) ovat esittäneet käsityksen, että askorbiinihapon hapettumisen lämpötilakerroin olisi varsin alhainen, mutta sen sijaan dehydroaskorbiinihapon tuhoutumisen lämpötilakerroin korkea. Tämä käsitys on sopu- soinnussa sen yleisen havainnon kanssa, että pastöroiminen miltei totaalisesti tuhoaa dehydroaskorbiinihapon (5, 15, 25). On siten ilmeistä, että pastöroinnin vaikutus maidon C-vitamiinin häviämiseen lähinnä rajoittuu dehydroaskorbiinihapon tuhoamiseen ja riippuu maidon dehydroaskorbiinihappopitoisuudesta pastöroimishetkellä.

ROINE (19) ja MAXA (17) ovat kiinnittäneet huomiota käymisteitse valmistettujen maitotuotteiden merkitykseen maidon alkuperäisen C-vitamiinin säilyttä- miseksi. Näissä tuotteissa C-vitamiini esiintyy pääasiassa askorbiinihappona, johtuen siitä että maitohappobakteerit pelkistävät dehydroaskorbiinihappoa askorbiini- hapoksi. Kun labiilimpi dehydroaskorbiinihappo näin pelkistyy pysyvämmäksi askorbiinihapoksi on seurauksena, että maidon C-vitamiini kokonaisuudessaan on vähemmässä määrässä tuhoutumiselle altista.

Hapetus-pelkistys-systeeminä aktiivisen dehydroaskorbiinihappo / askorbiini- happo-systeemin vaikutuksesta kulutusmaidon yleisen hapettumisvirheen, ns. talin maun, muodostumiseen on olemassa runsaasti kirjallisuutta. Tähän seikkaan ei kuitenkaan tässä yhteydessä ole syytä tarkemmin puuttua.

Dehydroaskorbiinihapon määrittäminen

KOHMAN ja SANBORNIN (14) havaitseman eräiden kasviuutteiden dehydro- askorbiinihappoa pelkistävän vaikutuksen lisäksi on tunnettua, että myös eräät bakteerit aikaansaavat dehydroaskorbiinihapon pelkistymisen. Ensimmäisenä osoitti TKACHENKO (23) tämän ilmiön eräillä *Lactobacillus*-lajeilla. Myöhemmin ESSELEN ja FULLER (1) totesivat eräiden *Escherichia coli* kantojen olevan erittäin aktiivisia dehydroaskorbiinihapon pelkistäjiä. Heidän havaintoiaan ovat GUNSALUS ja HAND (2) sekä STEWART ja SHARP (21) käyttäneet hyväksi menetelmän kehittä- miseksi dehydroaskorbiinihapon määrittämiseksi. GUNSALUS ja HAND ovat sovel- taneet menetelmäänsä myös maitoon, ja näin ollen selostettavaa tutkimusta val-

misteltaessa päädyttiinkin tämän menetelmän käyttöön. Kun menetelmä kuitenkin edellyttää kerrasta toiseen muuttuvan biologisen materiaalin käyttöä, suoritettiin aluksi seikkaperäinen tutkimus niiden olosuhteiden selvittämiseksi, jotka ovat edellytyksenä luotettavien tulosten saavuttamiseksi määrityksissä.

Dehydroaskorbiinihapon määrittämismetodiin kohdistetuissa kokeissa käytettiin seuraavia yleisiä menetelmiä.

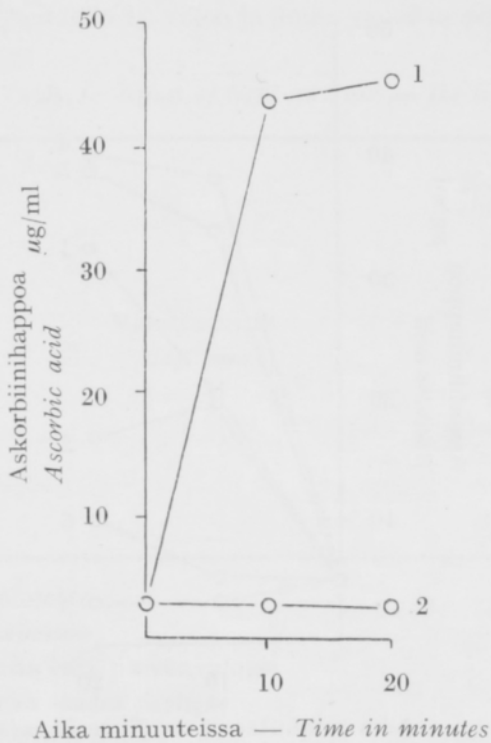
Tarvittavat solususpensiot valmistettiin viljelemällä *E. coli*a joko puskuroidussa glukoosi-peptoni-liuoksessa tai vastaavalla kiinteällä alustalla suurissa petri-maljoissa. Liuoksesta solut erotettiin sentrifugoimalla ja agarilta huuhtomalla sterilillä 0.9 % NaCl-liuoksella. Molemmissa tapauksissa solumassa pestiin sentrifugissa NaCl-liuoksella ja resuspendoitiin sen jälkeen toiseen erään tätä liuosta. Suspensiota säilytettiin jääkaapissa. GUNSALUS ja HAND (2) ilmoittavat solususpension näin menetellen säilyttävän aktiivisuutensa ainakin kuukauden, mutta kokeissamme osoittautui, että käytetyn *E. coli*-kannan solususpensiot alkoivat menettää aktiivisuuttaan jo viikon säilytyksen jälkeen.

Kokeissa käytetyt dehydroaskorbiinihappoliuokset valmistettiin KOHMAN ja SANBORNIN (14) mukaan hapettamalla askorbiinihappoa ekivalentilla määrällä jodiliuosta.

Koeliuksen pH säädettiin 5.9:ksi 0.1 M fosfaattipuskurilla. Niissä kokeissa, joissa glukoosia tai laktoosia käytettiin substraattina, valmistettiin näistä sokereista 1 %:nen liuos fosfaattipuskuriin. 30 ml:aan tätä liuosta lisättiin 10 ml solususpensiota ja inkuboitiin 30 min. 37°:ssa. Tämän jälkeen pH säädettiin uudelleen NaOH-lisäyksellä 5.9:ksi ja lisättiin 10 ml dehydroaskorbiinihappoliuosta. Koeliuksen dehydroaskorbiinihappopitoisuus oli tämän jälkeen 40—50 µg/ml. Inkubointia 37°:ssa jatkettiin ja määrätyn aikavälein (5—10 minuuttia) otettiin näytteet (5 ml) askorbiinihapon määrittämiseksi. Näytteeseen lisättiin 5 ml 2 % oksaali-happoa ja määritys suoritettiin titraamalla 2,6-diklorfenolindofenolilla.

Alunperin tutkituista kolmesta *E. coli*-kannasta vain yksi, »coli 9», pelkisti dehydroaskorbiinihappoa. Tätä kantaa käytettiin kaikissa myöhemmissä kokeissa. GUNSALUS ja HAND (2) ovat todenneet, että parhaat tulokset saavutetaan nuorista viljelmistä valmistetuilla solususpensioilla. Tätä seikkaa tutkittiin kannan »coli 9» suhteen, jolloin osoittautui että nuoresta viljelmästä (24 tuntia) valmistetun solususpension käyttäminen on ratkaiseva edellytys dehydroaskorbiinihapon pelkistymiselle. Vanhemmista viljelmistä valmistetut suspensiot olivat kokonaan vailla aktiivisuutta (piirros 1).

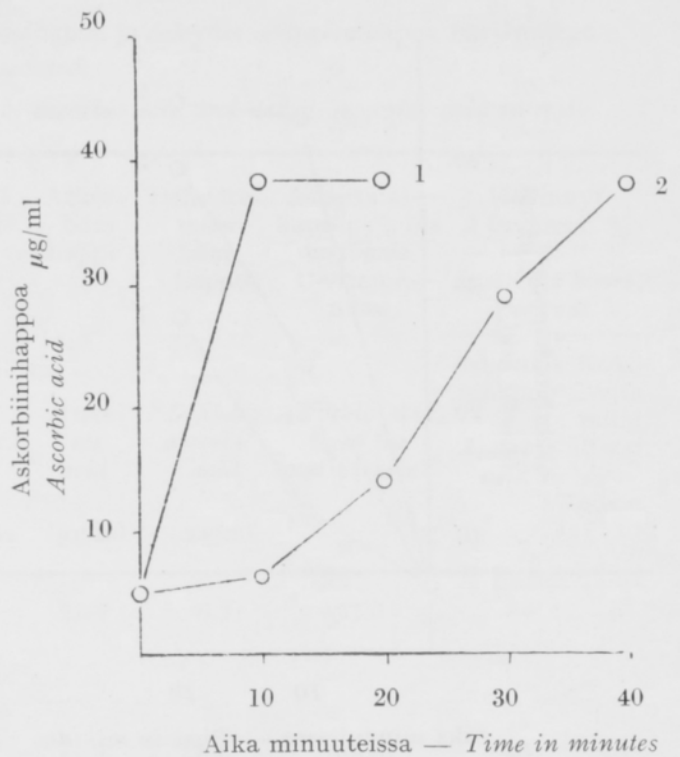
Aikaisemmin on todettu, että sellaisen hiilihydraatin lisääminen koeliukseen, jota ko. bakteerikanta pystyy käyttämään, kiihdyttää dehydroaskorbiinihapon pelkistymistä (ks. 2). Meidän tutkimamme kannan solususpensiot eivät pelkistäneet dehydroaskorbiinihappoa juuri lainkaan pelkässä puskuriliuoksessa. Sen sijaan glukoosipitoisessa liuoksessa pelkistyminen oli hyvin nopeaa. Nopea pelkistyminen edellytti kuitenkin edellä selostettua esi-inkubointia. Mikäli dehydroaskorbiinihappo lisättiin koeliukseen heti, oli sen pelkistyminen huomattavasti hitaampaa (piirros 2). Mikäli koeliukseen lisättiin laktoosia glukoosin asemesta ja esi-inkubointia ei suoritettu, oli todettavissa selvä viipymisvaihe (»lag») ennen pelkis-



Piirros 1. Bakteeriviljelmän iän vaikutus siitä valmistetun solususpension aktiivisuuteen.

Fig. 1. Effect of the age of the *E. coli* culture on the activity of the cell suspension.

1. Suspensio 24 tunnin ikäisestä viljelmästä —
Suspension from a 24 hrs old culture.
2. Suspensio 48 tunnin ikäisestä viljelmästä —
Suspension from a 48 hrs old culture.



Piirros 2. Esi-inkuboinnin vaikutus solususpension aktiivisuuteen.

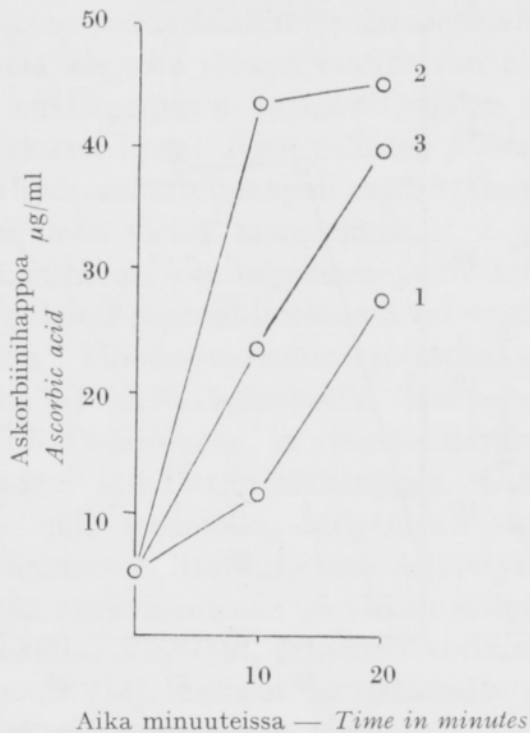
Fig. 2. Effect of pre-incubation on the activity of the cell suspension.

1. Esi-inkuboitu solususpensio —
Pre-incubated suspension.
2. Ilman esi-inkubointia —
No pre-incubation.

tymisen alkamista. Tämä on selitettävissä siten, että glukoosipitoisessa alustassa kasvaneet solut tarvitsevat tietyn ajan sopeutuakseen käyttämään laktoosia (vrt. 12). Selostettu ilmiö viittaa myös siihen, että sokerin käyminen on edellytyksenä dehydroaskorbiinihapon pelkistymiselle. Samaa osoittavat myös eräiden kokeiden tulokset, joissa koeliuokseen lisätyn glukoosin käyminen ehkäistiin monojodetikkahapolla tai natriumfluoridilla. Tämä johti myös dehydroaskorbiinihapon pelkistymisen inhiboitumiseen.

Dehydroaskorbiinihapon pelkistymisen nopeus näytti myös hyvin suuressa määrässä riippuvan koeliuoksen pH:sta. STEWART ja SHARP (21) ovat ilmoittaneet pH 5.9 optimaaliseksi dehydroaskorbiinihapon pelkistymiselle. Suorittamamme koe osoitti tämän havainnon oikeaksi, sillä pH:n kohottaminen 6.2:een hidasti huomattavasti pelkistymistä (piirros 3).

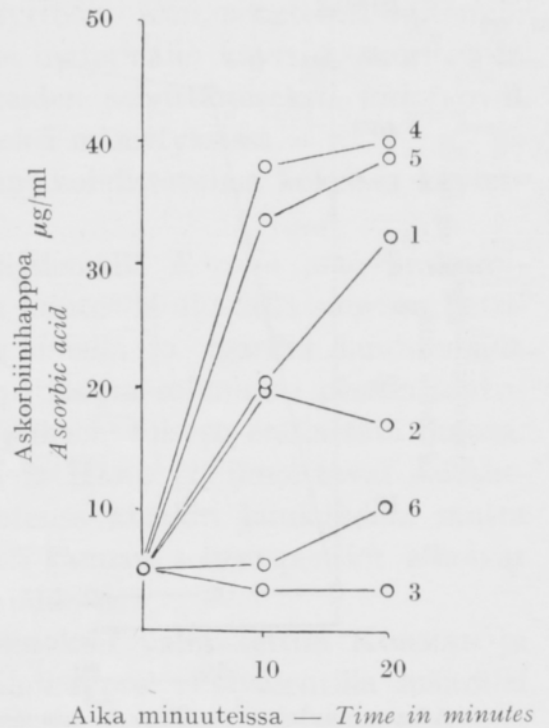
Eräissä lisäkokeissa tutkittiin myös kuparin ja raudan vaikutusta dehydroaskorbiinihapon pelkistymiseen. Kuten piirros 4 osoittaa, on raudan ehkäisevä vaikutus vielä konsentraatiossa 13 µg/ml melko vähäinen, kun sen sijaan kupari jo konsentraatiossa 1.5 µg/ml hidastaa pelkistymistä, ja ehkäisee sen konsentraatiossa 6 µg/ml kokonaan. Raudan läsnäolo lisää kuparin ehkäisevää vaikutusta.



Piirros 3. Koe-liuksen pH:n vaikutus dehydroaskorbiinihapon pelkistymiseen.

Fig. 3. Effect of the pH of the solution on the reduction of dehydroascorbic acid.

1. pH 5.6. 2. pH 5.9. 3. pH 6.2.



Piirros 4. Kuparin ja raudan vaikutus dehydroaskorbiinihapon pelkistymiseen.

Fig. 4. Effect of copper and iron on the reduction of dehydroascorbic acid.

1. 1.5 µg Cu/ml. 2. 3 µg Cu/ml. 3. 6 µg Cu/ml.
4. 5 µg Fe/ml. 5. 13 µg Fe/ml. 6. 3 µg Cu + 2.5 µg Fe/ml.

Rutiinimenetelmänä käytettynä dehydroaskorbiinihapon määrittäminen maidosta suoritettiin seuraavasti: *E. coli*-massa valmistettiin kuten yllä on selostettu. Solut suspendoitiin steriiliin 0.9 % NaCl-liuokseen. Yhdistettiin yhtä suuret määrät solususpensiota ja 0.1 M fosfaattipuskuria (pH 5.9), joka sisälsi 1 % glukosia. Tätä seosta inkuboitettiin 30—45 minuuttia 37°:ssa. pH säädettiin uudelleen 5.9:ksi. 5 ml:aan tutkittavaa maitoa lisättiin 5 ml esi-inkuboitua substraattiliuosta, ja tätä seosta inkuboitettiin edelleen 20—30 minuuttia 37°:ssa. Sen jälkeen näyte huuhdottiin 10 ml:lla 2 % oksaalihappoa dekantterilasiin ja titrattiin välittömästi 2,6-diklorfenolindofenolilla. Samasta maitonäytteestä oli askorbiinihappo sillä välin määritetty suoralla diklorfenolindofenoli-titrauksella. Molemmissa titrauksissa saattujen arvojen erotus ilmaisee dehydroaskorbiinihapon määrän.

Kunkin analyysisarjan yhteydessä suoritettiin tarkistusmäärittäksiä käyttämällä tunnettua dehydroaskorbiinihappoliuosta bakteerisuspension aktiivisuuden kontrolloimiseksi. Puhtaassa dehydroaskorbiinihappoliuoksessa pelkistyi 95—98% lasketusta dehydroaskorbiinihappomäärästä askorbiinihapoksi. Kun maitoon lisättiin tunnettuja dehydroaskorbiinihappomääriä, voitiin todeta dehydroaskorbiinihapon pelkistymisen maidossa olevan samaa suuruusluokkaa.

Taulukko 1. Valon ja ilman vaikutus askorbiinihapon ja dehydroaskorbiinihapon häviämiseen maidossa.

Table 1. Effect of light and air on the losses of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in milk.

Valottaminen <i>Exposure</i>	Kok.-C- vitamiini	Askor- biini- happo	Dehydro- askor- biini- happo	Askorbiini- happo %:ina kokonais C-vitamiini- nista	Hävinnyt 2 tunnissa, %	
	<i>Total vitamin C</i>	<i>Ascor- bic acid</i>	<i>Dehydro ascorbic acid</i>	<i>Ascorbic acid, % of the total vitamin C</i>	<i>Ascorbic acid</i>	<i>Kok.- vita- miini Total vita- min C</i>
	µg/ml	µg/ml	µg/ml			
Ei valotettu <i>No exposure</i>	22.6	21.9	0.7	97.0	—	—
2 tuntia varj. päivänvalossa <i>2 hrs in shaded daylight</i>						
Väritön pullo <i>Colourless bottle</i>	20.4	11.8	8.6	58.0	46	10
Ruskea pullo <i>Brown bottle</i>	20.9	15.6	5.3	74.7	29	8
2 tuntia varj. päivänvalossa ravistettu <i>2 hrs in shaded daylight, shaken</i>						
Väritön pullo <i>Colourless bottle</i>	20.1	10.2	9.9	50.9	53	11
Ruskea pullo <i>Brown bottle</i>	20.6	13.7	6.9	66.5	37	9
2 tuntia auringonvalossa <i>2 hrs in sunlight</i>						
Väritön pullo <i>Colourless bottle</i>	6.3	1.4	4.9	22.3	94	72
Ruskea pullo <i>Brown bottle</i>	17.8	9.7	8.1	55.2	56	21
2 tuntia auringonvalossa laakeassa maljassa <i>2 hrs in sunlight in a white dish</i>	5.5	1.1	4.4	20.0	95	76

Valon ja hapen vaikutus askorbiinihapon ja dehydroaskorbiinihapon määriin maidossa

Laboratoriomittakaavassa suoritettiin eräitä kokeita, joiden tarkoituksena oli valaista, miten maidon asettaminen valolle alttiiksi ja ilman sekoittaminen siihen vaikuttaa askorbiinihapon ja dehydroaskorbiinihapon määriin.

Kokeissa käytettiin sekamaitoa, joka oli lypsetty n. 12 tuntia aikaisemmin ja sen jälkeen välittömästi jäädytetty 0°:seen. 300 ml maitoa lisättiin 500 ml:n reagenssipulloihin, joita oli kahta laatua: värittömiä ja ruskeita. Yksi pullo kumpaa-kin lajia asetettiin kahdeksi tunniksi auringonvaloon (ikkunalaudalle; aamupäivä;

toukokuu), yksi pullo varjostettuun päivänvaloon (varjonpuoleinen huone) ja yhtä pulloa ravisteltiin 2 tuntia varjostetussa päivänvalossa ravistelukoneessa. Sen lisäksi vastaavaa maitomäärää valotettiin auringonvalossa laakeassa porssiinimaljassa. Kokeen päätyttyä määritettiin askorbiinihappo ja dehydroaskorbiinihappo kaikista pulloista kuten yllä on selostettu.

Kokeen tulokset on esitetty taulukossa 1.

Tulosten yhdistelmistä käy ilmi, että maidon asettaminen alttiiksi varjostetulle päivänvalolle on koeajan kuluessa aiheuttanut vain n. 10 %:iin nousevan häviön C-vitamiinin kokonaismäärässä, ja että ruskea lasi on vain vähäisessä määrässä pienentänyt tätä häviötä. Askorbiinihapon ja dehydroaskorbiinihapon määriä näissä tapauksissa erikseen tarkasteltaessa toteaa kuitenkin, että askorbiinihapon määrä värittömissä pulloissa on alentunut huomattavasti nopeammin, joten askorbiinihapon suhteellinen osuus kokonais-C-vitamiinipitoisuudesta on näissä säilytysastioissa supistunut vähäisemmäksi kuin ruskeissa pulloissa. Näissä koeolosuhteissa on siis askorbiinihappo pääasiassa hapettunut dehydroaskorbiinihapoksi, jota tapahtumaa ruskea lasi on selvästi ehkäissyt, ja dehydroaskorbiinihapon edelleen muuttumista on tapahtunut melko vähäisessä määrässä. Maidon ravistaminen kokeen kuluessa on jonkin verran edistänyt askorbiinihapon hapettumista molemmissa säilytysastioissa.

Auringonvalossa oli C-vitamiinin kokonaishäviö sekä värittömässä pullossa että avonaisessa maljassa yli 70 %. Askorbiinihappo on hapettunut miltei kvantitatiivisesti, ja sen osuus kokonais-C-vitamiinimäärästä on supistunut n. 20 %:ksi. Samanaikaisesti on myös runsaasti dehydroaskorbiinihappoa hajonnut edelleen. Ruskeassa pullossa on vielä yli puolet askorbiinihaposta säilynyt, joten ruskea lasi on tässäkin tapauksessa ehkäissyt varsinaista askorbiinihapon hapettumista. Myös dehydroaskorbiinihapon häviäminen on ollut ruskeassa pullossa huomattavasti hitaampaa kuin värittömässä pullossa.

Kauppamaitoa koskevat tutkimukset

Kauppamaitoon kohdistuneissa tutkimuksissa meneteltiin seuraavasti:

Näytteet hankittiin muutamista Helsingin maitokaupoista, jotka oli valittu siten, että ne edustivat eri meijereiden maitoa. Näytteet otettiin ruskeisiin pulloihin ja kuljetettiin laboratorioon, missä analyysit suoritettiin välittömästi. Ensimmäinen tutkimusjakso suoritettiin kesäkuussa (1952) ja vastaavat määritykset uusittiin marraskuussa (1952) ja helmikuussa (1953). Kesäkuussa tutkittiin vertailumielessä myös muutamilta maatiloilta saatuja vastalypettyä maitoa edustavia näytteitä.

Määritysten tulokset on esitetty taulukossa 2. Käytettävissä olevan aineiston pienuus tekee sen tilastollisessa mielessä epäluotettavaksi, mutta kuitenkin esitetyt tulokset oikeuttavat päätelmään, että askorbiinihapon osuus kauppamaidon kokonais-C-vitamiinipitoisuudesta on valoisana ja lämpimänä vuodenaikana huomattavasti vähäisempi kuin pimeänä ja kylmänä vuodenaikana. Vastalypettyä ja

Taulukko 2. Kauppamaidon kokonais-C-vitamiini- ja askorbiinihappopitoisuus eri vuodenaikoina.

Table 2. Vitamin C and ascorbic acid content of market milk in different seasons.

Näytteiden lukumäärä <i>Number of samples</i>	Kokonais-C-vitamiini <i>Total vitamin C</i>		Askorbiinihappo <i>Ascorbic acid</i>		Askorbiini- happo %ina kok.-C-vita- miinista <i>Ascorbic acid, % of the total vitamin C</i>	
	Keskim. <i>average</i>	Vaihtelu- rajat <i>limits of variation</i>	Keskim. <i>average</i>	Vaihtelu- rajat <i>limits of variation</i>		
	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml		
Vastalypsetty maito, kesäkuu	8	22.1	18.7—25.8	20.9	17.7—25.5	94.5
<i>Freshly drawn milk, June</i>						
Kauppamaito, kesäk. . .	30	15.1	12.7—17.1	10.9	8.0—12.6	72.3
<i>Market milk, June</i>						
Kauppamaito, marrask.	15	16.4	14.6—17.9	14.5	13.0—15.7	88.7
<i>Market milk, November</i>						
Kauppamaito, helmik. . .	11	16.8	15.4—17.8	16.1	14.7—17.5	95.9
<i>Market milk, February</i>						

kauppamaitoa edustavat luvut eivät ole suoraan vertailukelpoisia, mutta todettakoon kuitenkin että kauppamaidon askorbiinihappopitoisuus on vain noin puolet (10.9 mg/l) vastaavasta määrästä vastalypsetyissä maidossa (20.9 mg/l), kun sen sijaan kokonais-C-vitamiinista vain vajaa kolmannes näyttää tuhoutuneen. Tämä on sopusuunnassa edellä selostettujen laboratoriokokeissa tehtyjen havaintojen kanssa päivänvalon vaikutuksesta maidon askorbiini- ja dehydroaskorbiinihappopitoisuuteen. Edelleen taulukko 2 osoittaa, että kauppamaidon kokonais-C-vitamiinipitoisuus on melko stabiili vuodenaikasta riippumatta. On kuitenkin muistettava, että suurempi labiilimman dehydroaskorbiinihapon määrä saattaa nopeasti johtaa myös kokonais-C-vitamiinipitoisuuden alentumiseen.

Kauppamaidon suhteen tutkittiin myös askorbiinihapon ja dehydroaskorbiinihapon määrien muutoksia vuorokauden kestävän säilytyksen aikana. Näytteet säilytettiin ruskeissa pulloissa pimeässä. Tutkittiin kahta säilytyslämpötilaa, 0 ja 18°. Tämän kokeen tulokset on esitetty taulukossa 3.

Taulukosta ilmenee, että säilytyslämpötilan ollessa 0° on kokonais-C-vitamiinihäviö ollut 2.6 mg/l. Samanaikaisesti aleni askorbiinihapon määrä 4.4 mg/l. Erotus, 1.8 mg/l, on todettavissa dehydroaskorbiinihapon lisääntymisenä. Siten myös askorbiinihapon suhteellinen osuus kokonais-C-vitamiinista on huomattavasti alentunut ja dehydroaskorbiinihapon vastaavasti noussut. Näyttää siten siltä, että alhainen säilytyslämpötila ei ehkäise askorbiinihapon hapettumista dehydroaskorbiinihapoksi, mutta että viimeksi mainittu yhdistys on näissä olosuhteissa melko pysyvä.

Maitoa huoneen lämpötilassa säilytettäessä kuva on täysin toisenlainen. C-vitamiinin kokonaishäviö on tosin jonkin verran suurempi, 4.2 mg/l, mutta suurin osa

Taulukko 3. Kauppamaidon askorbiinihappo- ja dehydroaskorbiinihappopitoisuuden muutokset vuorokauden säilytyksen aikana.

Table 3. Changes in the ascorbic acid and dehydroascorbic acid contents of market milk during storage for 24 hrs.

	Kok.-C- vitamiini <i>Total vitamin C</i>	Askorbiinihappo <i>Ascorbic acid</i>		Dehydroaskorbiinihappo <i>Dehydroascorbic acid</i>	
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	%:a kok.- C-vitamiini- nista <i>% of the total vita- min C</i>	$\mu\text{g/ml}$	%:a kok.- C-vita- miinista <i>% of the total vitamin C</i>
I. Säilytyslämpötila 0° <i>Stored at 0°C</i>					
Kokeen alkaessa	15.2	10.9	71.9	4.3	28.1
<i>At the beginning</i>					
Kokeen päättyessä ..	12.6	6.5	51.1	6.1	48.9
<i>At the end</i>					
Muutos kokeen aikana	-2.6 (-17 %)	-4.4 (-41 %)		+1.8 (+42 %)	
<i>Change during storage</i>					
II. Säilytyslämpötila 18° <i>Stored at 18°C</i>					
Kokeen alkaessa	15.2	10.7	70.2	4.5	29.8
<i>At the beginning</i>					
Kokeen päättyessä ..	11.0	9.1	82.7	1.9	17.3
<i>At the end</i>					
Muutos kokeen aikana	-4.2 (-28 %)	-1.6 (-15 %)		-2.6 (-58 %)	
<i>Change during storage</i>					

tästä häviöstä tulee dehydroaskorbiinihapon osalle, 2.6 mg/l. Siten on askorbiinihapon suhteellinen osuus kokonais-C-vitamiinipitoisuudesta noussut (70.2 resp. 82.7 %). Huoneenlämpötilassa askorbiinihappo on siis sangen pysyvää, mutta korkea säilytyslämpötila näyttää sen sijaan edistävän dehydroaskorbiinihapon häviämistä. Askorbiinihapon pysyvyyteen korkeassa säilytyslämpötilassa on bakteeritoiminnalla, joka aiheuttaa muodostuvan dehydroaskorbiinihapon osittaisen jälleenpelkistymisen askorbiinihapoksi, ilmeisesti ollut suuri osuus.

Kauppamaitoon kohdistetussa tutkimuksessa kiinnitettiin myös huomiota niihin muutoksiin maidon askorbiinihapon ja dehydroaskorbiinihapon keskinäisissä suhteissa, joita meijerikäsittely mahdollisesti aiheuttaisi. Näitä kokeita, jotka suoritettiin eräessä Helsingin kaupunkimeijerissä, vaikeutti meijeriin saapuvan maidon heterogeenisuus. Saapuvan maidon eri erät, jotka olivat eri tavoin käsiteltyjä ja kuljetettuja, sekoittuivat meijerissä, joten kunkin erän vastaista kulkua oli mahdoton seurata.

Meijeriin saapuvan maidon kokonais-C-vitamiinipitoisuus oli suunnilleen sama (18.5—19.0 mg/l) sekä suoraan maataloilta että maaseutumeijereistä autoilla saapu-

vassa maidossa. Sen sijaan junalla maaseutumeijereistä kuljetetun maidon C-vitamiinipitoisuus oli huomattavasti alhaisempi (15.4 mg/l). Suoraan maatiloilta saapuvan maidon suhteellinen dehydroaskorbiinihappopitoisuus oli jonkin verran korkeampi kuin maaseutumeijereistä autoilla kuljetetun maidon (9 resp. 7 % C-vitamiinin kokonaismäärästä). Tämä johtunee siitä, että jälkimmäisessä maidossa oli pastöroituja maitoeriä, joista dehydroaskorbiinihappo on pastöroitaessa tuhoutunut. Kuljetuksen aikana vallinneissa olosuhteissa on siten askorbiinihappo vain melko vähäisessä määrässä ehtinyt hapettua dehydroaskorbiinihapoksi. Hidas junakuljetus oli kuitenkin johtanut myös dehydroaskorbiinihapon suhteellisen määrän lisääntymiseen maaseutumeijereistä saapuvassa maidossa (11 % C-vitamiinin kokonaismäärästä).

Meijereistä jakeluun lähtevän maidon C-vitamiinin kokonaismäärä oli käytännöllisesti katsoen sama kuin saapuvan maidon. Sitä vastoin oli jakeluun lähtevän maidon askorbiinihappopitoisuus jonkin verran alhaisempi kuin meijeriin saapuvan maidon (15.9 resp. 16.6 mg/l). Vastaavasti oli dehydroaskorbiinihapon suhteellinen määrä jakeluun lähtevässä maidossa korkeampi kuin meijeriin saapuvassa maidossa (11.3 resp. 7.5 % C-vitamiinin kokonaismäärästä). Maidon käsittely ja säilytys meijerissä on siten johtanut vähäiseen maidon dehydroaskorbiinihappopitoisuuden kohoamiseen, C-vitamiinin kokonaismäärän säilyessä muuttumattomana. Dehydroaskorbiinihapon määrän lisääntyminen on katsottava niin vähäiseksi, ettei se välittömästi osoita maidon C-vitamiinin säilyvyyden alentuneen meijerikäsittelyn ja -säilytyksen seurauksena.

Yhteenveto

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää maidon askorbiinihapon ja dehydroaskorbiinihapon määriä ja keskinäisiä suhteita sekä niiden muutoksia etenkin sellaisissa olosuhteissa, jotka tulevat kysymykseen kauppamaidon eri käsittelyvaiheissa.

Maidon dehydroaskorbiinihappopitoisuus määritettiin pelkistämällä dehydroaskorbiinihappo titrimetrisesti määritettäväksi askorbiinihapoksi *Escherichia colin* lepäävien solujen suspensiolla. Tähän menetelmään erikseen kohdistetussa kokeissa todettiin maksimaalisen pelkistymistuloksen riippuvan seuraavista tekijöistä:

1. Bakteerikannasta. Kaikki *E. coli*-kannat eivät pelkistä dehydroaskorbiinihappoa. — 2. Solususpension valmistamiseen käytetyn viljelmän iästä. Ko. viljelmän pitää olla 24 tunnin ikäinen tai sitä nuorempi. — 3. Solususpension iästä. Viikkoa kauemmin säilytettyä solususpensiota ei ole tarkoituksenmukaista käyttää. — 4. Koeliuoksen pH:sta. Dehydroaskorbiinihapon pelkistymisen pH-optimi on 5.9—6.0. — 5. Koeliuoksen kokoomuksesta. Koeliuoksen pitää sisältää käytettävälle bakteerikannalle käyttökelpoista hiilihydraattia. Koetulokset viittaavat siihen, että sokerin käyminen on ratkaiseva edellytys dehydroaskorbiinihapon pelkistymiselle. Koeliuoksen (ja maidon) kupari- ja rautapitoisuus vaikuttaa myös pelkistymistulokseen. Jo 1.5 µg Cu/ml hidastaa pelkistymistä. Raudan vaikutus

on huomattavasti vähäisempi, mutta rauta lisää kuparin vaikutusta. — 6. Pelkistämisaajan pituudesta. Optimaalinen pelkistämisaika on 20 minuuttia. Pidempi aika johtaa muodostuneen askorbiinihapon uudelleen hapettumiseen. — 7. Solujen aktiivisuudesta pelkistämisen alkaessa. Solujen aktiivisuutta voidaan lisätä suoritamalla esi-inkuboinen puskuroidussa glukoosiliuoksessa ennen tutkittavan maitonäytteen lisäämistä.

Saavutetut tulokset ovat pääkohdiltaan yhtäpitäviä GUNSALUS ja HANDIN (2) sekä STEWART ja SHARPIN (21) aikaisemmin esittämien tietojen kanssa. Solususpension aktiivisuuden säilymisen, koeliuoksen kokoomuksen ja esi-inkuboinnin välttämättömyyden suhteen tulokset kuitenkin poikkesivat aikaisemmin saaduista. Kuparin ja raudan vaikutuksesta bakteerien aiheuttamaan dehydroaskorbiinihapon pelkistymiseen ei kirjallisuudessa esiinny tietoja.

Vastalypsetyissä maidossa on C-vitamiini käytännöllisesti katsoen kvantitatiivisesti askorbiinihappomuodossa. Tämä havainto vahvistaa aikaisempien tutkijoiden esittämiä tietoja.

Tutkittaessa valon vaikutusta askorbiinihapon ja dehydroaskorbiinihapon määriin maidossa todettiin varjostetun päivänvalon aiheuttavan pääasiassa askorbiinihapon hapettumista dehydroaskorbiinihapoksi, kokonais-C-vitamiinipitoisuuden säilyessä lähes muuttumattomana. Dehydroaskorbiinihappo on siis näissä olosuhteissa sangen pysyvä. Ruskea lasi hidastaa askorbiinihapon hapettumista. Suorassa auringonvalossa tuhoutuu myös dehydroaskorbiinihappo nopeasti joskin ruskea lasi hidastaa jonkin verran tätäkin tapahtumaa. Ilman sekoittaminen maitoon (säilytysastian ravistaminen) kiihdyttää jonkin verran askorbiinihapon hapettumista, mutta ei suljetussa astiassa vaikuta sanottavasti kokonais-C-vitamiinipitoisuuteen.

Kauppamaidon kokonais-C-vitamiinipitoisuus todettiin suunnilleen samaksi kaikkina vuodenaikoina. Askorbiinihappopitoisuus on sen sijaan kesällä huomattavasti alhaisempi kuin syksyllä ja talvella.

Säilytettäessä kauppamaitoa 0°:ssa todettiin huomattavaa askorbiinihapon hapettumista. Dehydroaskorbiinihappo todettiin sen sijaan tässä lämpötilassa melko pysyväksi. 18°:ssa suurin osa dehydroaskorbiinihaposta tuhoutuu, mutta askorbiinihappohäviöt ovat vähäiset.

Maidon käsittely ja säilytys meijerissä ei aiheuta varsinaisia C-vitamiinitalppioita, mutta askorbiinihapon hapettumista dehydroaskorbiinihapoksi tapahtuu vähäisessä määrässä.

KIRJALLISUUSLUETTELO

- (1) ESSELEN, W. B. ja FULLER, J. E., 1939. The oxidation of ascorbic acid as influenced by intestinal bacteria. *J. Bact.*, 37, 501—521.
- (2) GUNSALUS, I. C. ja HAND, D. B., 1941. Use of bacteria in the chemical determination of total vitamin C. *J. Biol. Chem.*, 141, 853—858.

- (3) GUTHRIE, E. S., 1946. The results of deaeration on the oxygen, vitamin C, and the oxidized flavors of milk. *J. Dairy Sci.*, *29*, 359—369.
- (4) GYÖRGY, P. ja RUBIN, S. H., 1950, Chemical methods of vitamin assay (in *Vitamin Methods*, vol. I, ed. by P. György, New York, Academic Press).
- (5) HAND, D. B., 1943. Reduced and total vitamin C in milk. *J. Dairy Sci.*, *26*, 7—12.
- (6) HAND, D. B. ja GREISEN, E. C., 1942. Oxidation and reduction of vitamin C. *J. Amer. Chem. Soc.*, *64*, 358—361.
- (7) HAWK, P. B., OSER, B. L. ja SUMMERSON, W. H., 1948. *Practical Physiological Chemistry*, 12th ed. Philadelphia, The Blakiston Company.
- (8) HENDERSON, J. L., FOORD, D. C. ja ROADHOUSE, C. L., 1940. Influence of sunlight on flavor and ascorbic acid content of milk exposed in three different types of paper containers. *Food Res.*, *5*, 153—159.
- (9) HERREID, E. O. ja FRANCIS, J., 1949. The effect of handling and processing milk on its oxygen content. *J. Dairy Sci.*, *32*, 202—208.
- (10) HOLMBERG C. G., 1938. The effect of pasteurization on the vitamin C content of winter milk. *Kgl. Fysiograf. Sällskap. Lund, Förh.* *7*, 105—110. *Ref. C.A.*, *34*, 2477³, 1940.
- (11) HOUSTON, J., KON, S. K. ja THOMPSON, S. Y., 1939. The effect of light on the vitamin C of milk in different containers. *J. Dairy Res.*, *10*, 471—474.
- (12) KARSTRÖM, H., 1930. Über die Enzymbildung in Bakterien und über einige physiologische Eigenschaften der untersuchten Bakterien. *Ann. Acad. Sci. Fen.*, *A*, *33*: 2.
- (13) KNIGHT, S. A., DUTCHER, R. A. ja GUERRANT, N. B., 1939. The quantitative determination of vitamin C in milk. *Science*, *89*, 183—185.
- (14) KOHMAN, E. F. ja SANBORN, N. H., 1937. Vegetal reduction of dehydroascorbic acid, *Ind. Eng. Chem.* *29*, 1195—1199.
- (15) KON, S. K. ja WATSON, M. B., 1936. The effect of light on the vitamin C content of milk. *Biochem. J.*, *30*, 2273—2290.
- (16) KROKER, F., 1938. Über das vitamin C in Kuh- und Frauenmilch und die Möglichkeit der Herstellung einer vitamin C-Milch. *Milchw. Forsch.*, *19*, 318—337.
- (17) MAXA, V., 1949. The decreases of vitamin C during some treatments of milk. *Int. Dairy Congr. XII, Stockholm*, *2*, 208.
- (18) NIKKILÄ, O. E., 1948. Talin maku maidossa. *Meijeritiet. aikakausk.*, *X*, 109—118.
- (19) ROINE, P., 1948. Effect of oxidation-reduction potential on the stability of ascorbic acid in milk and in fermented milk. *Acta Chem. Scand.*, *2*, 97—108.
- (20) SHARP, P. F., HAND, D. B. ja GUTHRIE, E. S., 1942. Experimental work on deaeration of milk. *Assoc. Bull. (Intern. Assoc. Milk Delaers)* *34*, 365—375.
- (21) STEWART, A. P. ja SHARP, P. F., 1945. Determination of vitamin C in the presence of interfering reducing substances. Selective oxidationreduction method. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, *17*, 373—376.
- (22) ——— 1946. Vitamin C content of market milk, evaporated milk, and powdered whole milk. *J. Nutr.*, *31*, 161—173.
- (23) TKACHENKO, E. S., 1936. *Biokhimija I*, 579—582. *Ref. C.A.*, *31*, 7461, 1937.
- (24) WASHBURN, R. G. ja KRAUSS, W. E., 1938. The vitamin C content of milk. *Ohio Agr. Exp. Sta.*, 56th Ann.rept. (in *Bull.* 592), 85—86.
- (25) WOESSNER, W. W., WECKEL, K. G. ja SCHUETTE, H. A., 1940. The effect of commercial practices on ascorbic acid and dehydroascorbic acid (vitamin C) in milk. *J. Dairy Sci.*, *23*, 1131—1141.

SUMMARY:

ON THE AMOUNTS OF ASCORBIC ACID AND DEHYDROASCORBIC ACID IN MILK UNDER DIFFERENT HANDLING AND STORAGE CONDITIONS

HELGE GYLLENBERG, MARJATTA ROSSANDER AND PAAVO ROINE

Department of Nutritional Chemistry, University of Helsinki

Investigations were carried out to establish the actual and relative amounts of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in milk, especially under the conditions prevailing in the marketing of milk in Finland.

Dedehydroascorbic acid was determined titrimetrically after its previous reduction to ascorbic acid by means of resting cell suspensions of *Escherichia coli*. Special attention was paid to the conditions under which this method gives reliable results. The extent and rate of the reduction were found to depend on the following factors.

1. The strain of *E. coli*; not all strains are capable of reducing ascorbic acid.
2. The age of the culture from which the cell suspension is prepared; cultures over 24 hours old cannot be used.
3. The age of the cell suspension; suspensions stored longer than one week must not be used.
4. The pH of the solution; the optimal pH for the reduction of dehydroascorbic acid is 5.9 to 6.0.
5. The composition of the solution; the solution must contain fermentable carbohydrates, e.g. glucose, in addition to buffering agents (phosphates). The results obtained indicate that the reduction of dehydroascorbic acid is contingent on the fermentation of carbohydrates. The reduction is influenced by small amounts of copper, 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. being a distinctly inhibiting concentration. Iron is not as effective, but it increases the effect of copper.
6. The time of incubation; the optimal time is 20 minutes. A longer incubation results in reoxidation of ascorbic acid.
7. The activity of the bacterial cells; the activity can be increased by preincubation of the bacteria in a buffered glucose solution, prior to the addition of the milk sample.

The results obtained agree in most respects with those reported by GUNSALUS and HAND (2) and STEWART and SHARP (21). As regards the changes in activity of the cell suspensions during storage, composition of the test solution, and importance of preincubation, our results differ from those recorded by earlier authors.

The vitamin C of freshly drawn milk was found to occur practically quantitatively in the form of ascorbic acid, a finding made earlier by other investigators.

The exposure of milk to diffuse daylight leads to a marked oxidation of ascorbic acid to dehydroascorbic acid. The latter compound, however, is fairly stable in these conditions. The total vitamin C content is thus only slightly affected. Exposure to direct sunlight, on the other hand, causes a rapid disappearance of dehydroascorbic acid, and, accordingly, an abrupt fall in the vitamin C potency. Aeration of milk (shaking the bottle) accelerates the oxidation of ascorbic acid but, in a closed bottle, has no influence on the total vitamin C content.

The total vitamin C content of market milk was found to be about the same in summer, autumn and winter. The percentage of ascorbic acid, however, was distinctly lower in summer than in autumn and winter.

Storing of market milk at 0°C, caused a marked oxidation of ascorbic acid to dehydroascorbic acid, the latter compound being relatively stable. At 18°, on the other hand, most of the dehydroascorbic acid disappeared, while only small losses of ascorbic acid occurred.

Handling and storage of milk in the dairy causes only insignificant losses in the total vitamin C potency, but slight oxidation of ascorbic acid to dehydroascorbic acid does take place.