

A tej lúgos foszfatáz próbáinak összehasonlítása a színmérés tükrében II.*

WAGNER ATTILA, HORVÁTH LÓRÁND**, KISS TIBOR**
és GYETVAI JUDIT

Tejtermékek Ellenőrző Állomása, Budapest

Érkezett: 1977. október 30.

Bevezetés

Előző vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a vizsgálati anyag mennyiségének relatív növelésével, valamint a pufferek és a végső reakcióban résztvevő reagensek töménységének arányos növelésével, térfogatuk arányos csökkentésével a tej lúgos foszfatáz próbájának érzékenysége fokozható (1, 22, 23, 24, 25, 26).

Munkánk folytatása során azt kellett tisztázni, hogy a szakirodalomból, szabványokból legjobban ismert pufferek és szubstrátok mint modellek (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27) kö, zül melyik adja a lúgos foszfatáz próba alkalmazása során a legérzékenyebb, legértékeltetőbb reakciót.

Vizsgálati anyagok és módszerek

A vizsgálatokhoz ugyanazt a 6,7 °SH savasságú nyerstejet használtuk, amelyet a kontrol vizsgálat céljára felforralással tettünk alkalmassá.

A tejminta lúgos foszfatáz aktivitását az ISO 3356 – 1975 sz. (9) nemzetközi szabvány szerint határoztuk meg, amely Na-fenilfoszfát vonatkozásában 0,06 IE/cm³-nek bizonyult (28, 29).

A vizsgálataink körülményei a korábbi közleményünkben leirtakkal azonosak (1), azzal az eltéréssel, hogy a próba inkubációs ideje 38 °C hőmérsékleten mindössze 20 perc volt.

A szakirodalomban legjobban ismert pufferek közül az alábbiakat módosítottuk és jelöljük:

* A MÉTE Élelmiszeripari Mikrobiológiai Tudományos Ülésszakán a Kertészeti Egyetem Központi Épületében 1977. október 3-án elhangzott előadás felhasználásával (szerk.).

** Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet, Budapest

- I. sz. Na_2CO_3 -t (5 g/1000 cm^3) és NaHCO_3 -t (45 g/1000 cm^3) tartalmazó oldat,
- II. sz. KOH-t (5 g/1000 cm^3) és KHCO_3 -t (45 g/1000 cm^3) tartalmazó oldat,
- III. sz. $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ -t (62,5 g/1000 cm^3) és H_3BO_3 -t (27,5 g/1000 cm^3) tartalmazó elegy,
- IV. sz. Veronál-Na-t (51,5 g/1000 cm^3) és N NaOH-t (32,5 cm^3) tartalmazó oldat,
- V. sz. NH_4Cl -t (40 g/1000 cm^3) és NH_4OH -t (348 cm^3 25%-os/1000 cm^3) tartalmazó oldat,
- VI. sz. etanolamin-t (733,26 g) ccHCl -t (263,25 cm^3) diciklohexilamin-t (13,10 g) tartalmazó elegy.

A szubsztrátok közül 1 g/100 cm^3 puffer töménységben az alábbiakat használtuk:

Na-fenilfoszfát (Merck) amelyből felszabaduló fenol kimutatására 2,6 dibromkinonklórimid (Merck) alkoholos oldatát használtuk.

H-fenoltaleinfoszfát (ELTE),

H-P.-nitrofenilfoszfát (ELTE),

H-fluoresceinfoszfát (ELTE), amelyek lebomlásának kimutatása céljából 2,5 N NaOH oldatot használtunk.

α -naftilfoszfát (Merck), amelyből felszabaduló α -naftol kimutatására Fast Violet B (Merck, 3-amino-6-benzoil-4-metoxi-1-metilbenzol), Fast Red KL (Merck, 2,3-oxinaftoesav-3-klór-4,6 metoxianilid és 2,3-oxinalftoesav-4-klór-4,5 dime-toxianilid keveréke), Diazolblue 03927 (Chroma, p.-diazo-N,N-dietilanilinklorid) Fast Red 2 GL (Chroma, 4-kloro-2-nitrobenzolklorid) Fast Blue Salt BB (Merck, 4-benzoilamino-2,5-dietoianilin), Fast Garnet GBC (Merck, 2-amino-5-azotoluol) diazoszinezékek alkoholos-vizes oldatát használtuk.

A modellvizsgálatokhoz Merck-féle tropeolint, krezolvöröst, timolkéket, brómtimolkéket, timolftaleint, o-krezolftaleint, valamint Chemapol-féle o-naftolftaleint használtunk és 2,5 N NaOH-dal hajtottuk végre a végső reakciót.

A vizsgálathoz felhasznált anyagok relatív mennyisége tejből, 5 cm^3 , a szubsztrát/puffer oldat, és a színreakcióhoz a 38 °C-on történő 20 perces inkubálás után a 2,5 N NaOH, illetve az alkoholos 2,6 dibromkinonklórimid, és az alkoholos-vizes diazoszinezékek oldataiból 0,2 cm^3 .

A 20 mm rétegvastagságú minták színét MOM-COLOR-S műszerrel, szabványos „C” megvilágítás mellett, 10 mm átmérőjű felületen mértük. A mérések megbízhatóságának megállapítására a negatív reakciójú mintánál, 10 párhuzamos mérésből meghatároztuk a színösszetevők tapasztalati szórását.

A negatív reakciójú mintához viszonyítottuk a színváltozásokat. A szinkülönbségeket, valamint a tapasztalati szórását a CIE 1976-ban ajánlott ΔE_{ab}^* képletével számoltuk. A tapasztalati szórás értéke $S|\Delta E_{ab}^* = 0,33$.

Az úgynevezett ΔE értékek és a statisztikai számítások TPA-i digitális kis számítógépen Basic nyelven készültek.

Vizsgálati eredmények és értékelésük

A vizsgálatok eredményeit és értékelésüket az 1. és 2. táblázat, valamint az oszlopgrafikonokat feltüntetető ábra mutatja.

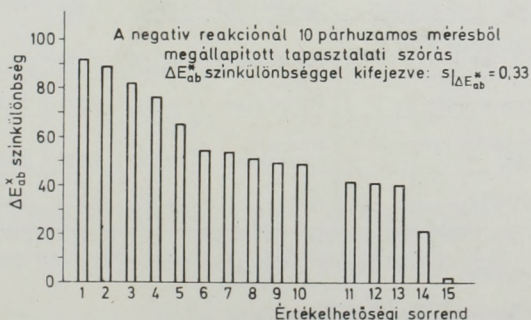
1. táblázat

Pufferek összehasonlítása
Szubsztráttöménység: 1 g H-fenoltaleinfoszfát/100 cm³

Pufferek száma	Színmérések adatai			
	x	y	Y	ΔE^*_{ab}
I., II., III.	0,310	0,343	32,38	—
V., VI.*	0,393	0,182	6,7	82,402
IV.	—	—	—	A rossz oldhatósági viszonyok miatt nem értékelhető

* A VI. sz. puffer néhány napon belül használhatatlanná válik, míg az V. sz. jól lezárt edényben korlátlanul tárolható

Az 1. táblázatból látható, hogy a vizsgált pufferek közül az NH₄Cl-t és az NH₄OH-t tartalmazó V. sz. vizes oldat a legtartósabb, és az összehasonlítás során azonos szubsztrát használata mellett a vele végrehajtott reakció értékelhető a legjobban.



A tej lúgos foszfátáz próbáinak színreakciónál megállapítható ΔE^*_{ab} színkülönbségek a negatív reakcióhoz viszonyítva

A 2. táblázat a vizsgált szubsztrátok bomlástermékeivel végrehajtott színreakciókat sorolja fel értékelhetőség alapján csökkenő sorrendben, amelyből megállapítható, hogy az o-krezoltaleinfoszfáttal végzett vizsgálat adja a legértékesebb reakciót.

A lúgos foszfátáz próbak színreakcióinak értékelése az V. sz. puffer alkalmazása során

Reakciók értékelhetőségi sorrendje	Sztöchiometriailag azonos mennyiségű bomlástermékek és reakciók	Színreakciók	Színmérések adatai			
			x	y	Y	ΔE^*_{ab}
1	o-krezoltalein-lúg	lila	0,335	0,140	4,46	90,231
2	krezolvörös-lúg	lila	0,328	0,136	3,71	89,256
3	fenoltalein-lúg	kárminvörös	0,393	0,182	6,70	82,402
4	timoltalein-lúg	sötétkék	0,209	0,120	2,30	76,365
5	brómtimolkék-lúg timolkék-lúg	sötétkék	0,173	0,143	2,94	65,488
6	tropeolin-lúg	narancssárga	0,497	0,442	14,39	54,730
7	α -naftol-Fast Violet B	málnavörös	0,475	0,312	5,18	53,637
8	α -naftol-Fast Red K/L	málnavörös	0,435	0,291	7,06	51,635
9	α -naftol-Diazolblue	barna	0,489	0,396	4,39	49,306
10	o-naftoltalein-lúg	kék	0,183	0,212	4,91	49,051
11	p-nitrofenol-lúg	sárga	0,399	0,469	24,65	41,428
12	α -naftol-Fast Red 2GL	narancssárga	0,459	0,381	12,44	41,627
13	α -naftol-Fast Blue Salt BB	barnás-vörös	0,394	0,329	6,73	40,048
14	fluoreszcein-lúg	citromsárga	0,319	0,301	29,56	21,039
15	α -naftol-Fast Garnet GBC	rózsaszín árnyalatú	0,346	0,346	23,50	14,887
16	Kontroll	fehér	0,310	0,343	32,38	—

Megjegyzés: A fenol-2,6-dibromkinonklórimid reakció az általunk alkalmazott körülmények között értékelhetetlen.

Megbízhatóság (95%): (X) 0,69 (x) 0,006
(Y) 0,61 (y) 0,006
(Z) 0,78

- (1) Wagner, A., Horváth, L., Kiss, T., Borsi, M.-né.: ÉVIKE, 22, 295, 1976.
- (2) Schönherr, W.: Standardmethoden der tierärztlichen Milchuntersuchung. VEB Gustav Fischer Verlag. Jena 1960.
- (3) Görner, F.: Die Hygiene in der Milchwirtschaft. Bratislava. 1954.
- (4) Schönherr, W.: Leitfaden der Milchuntersuchung für Tierärzte und Studierende der Veterinärmedizin. S Hirzel Verlag. Leipzig. 1956.
- (5) Milk Hygiene, Hygiene in Milkproduction, Processing and Distribution. World Health Organisation, Monograph Series N° 48 Geneva. 1962.
- (6) FIL - IDF 53- 1969.
- (7) ISO TC 34/SC 140E - 1971.
- (8) IDF(ISO)AQAC E - DOC 17 - 1971.
- (9) ISO 3356 - 1975.
- (10) Achterrath, U.: Zur Regulation der alkalisch Leucozytenphosphatase-Aktivität bei der Rette in Abhängigkeit von weiblichen Keimdrüsenhormonen und vom allgemeinen Stoffwechselfesgeschen. Dissertation. Justus Liebig Universität, Giessen, 1970.
- (11) Okamoto, K.: Journal of hygienical Chemistry 15(1), 37 - 39, 1969.
- (12) BDSz 1113 - 71
- (13) STAS 6348 - 76.
- (14) NFV 04 - 151 - 1974
- (15) Sidney, P., Stetter, H.: Enzymatische Analyse. Verlag Chemie G.M.B.H. Weinheim. 1951.
- (16) Preisch, M.: Vegyszék Zsebkönyve. Műszaki Kiadó. Budapest, 1959.
- (17) Bányai, É.: Kémiai Indikátorok. Műszaki Kiadó. Budapest, 1961.
- (18) Sparhoff, L.: Einführung in die Praxis der Histochemie. VEB Gustav Fischer Verlag. Jena. 1964.
- (19) Paschke, B.: Milchwissenschaft 15, 519, 1960.
- (20) Bergmeier, H., U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie. G.M.B.H. Weinheim. 1962.
- (21) Kleyn, D., H., Huang, C. L.: Journal of the AOAC 55, 498, 1972.
- (22) Kleyn, D., H.: Journal of Milk Food Technology 35, 405, 1972.
- (23) Kleyn, D., H., Jakubowski, J.: Journal of the AOAC 57, 710, 1974.
- (24) Babson, A., L., Greeley, S., J.: Journal of the AOAC, 50, 555, 1967.
- (25) Kleyn, D., H., Lin, H., C.: Journal of the AOAC. 51, 802, 1968.
- (26) Haung, C., L., Kleyn, D., H.: Journal of the AOAC. 54, 857, 1971.
- (27) Socma Handbook Commercial Organic Chemical Names. Second Printing. Synthetic Organic Chemical. Manufacturers Association. American Chemical Society. 1966.
- (28) Karson P.: Biokémia. Medicina. Budapest, 1972.
- (29) Görög, J.: Ipari mikrobiológia és enzimológia. BME Vegyészmérnöki Kar. Tankönyvkiadó. Budapest. 1976.
- (30) László, R.: Korszerű élelmiszervizsgálat és minősítési módszerek. BME Vegyészmérnöki Kar. Tankönyvkiadó, Budapest. 1975

СОПОСТАВЛЕНИЕ ШЕЛОЧНО - ФОСФАТАЗНЫХ ПРОБ МОЛОКА СООТВЕТСТВЕННО ИЗМЕРЕНИЯМ ЦВЕТА II.

A. Вагнер, Л. Хорват, Т. Кушш, Ю. Детваи

Авторы продолжая работы сообщенных в предыдущих публикациях, изучали оптимальные условия реакции щелочной фосфатазы. Для определения цвета применяли тристимульный колориметрический прибор МОМ-КОЛЮР-С, которым на основании величин ΔE_{ab}^* из среди вариантов проб и субстратов можно отобрать в исследованиях, применяемых лучше всего оценимых буферов. В идентичных условиях наилучше оценимую реакцию получили буфером содержащим NH_4Cl (40 г/1000 cm^3) и 25%-ым (1000 cm^3 NH_4OH) 348 cm^3 и испытание проведенное в настоящее время в форме модели имеющим о-крезолф-талеин-фосфатом. Количество использованного материала: из молока 5 cm^3 , из раствора субстрата/буфера (г/100 cm^3) 0,2 cm^3 и при температуре 38°C после 20 минутной инкубации из раствора необходимого для цветной реакции 2,5 N NaOH.

VERGLEICH DER ALKALISCHEN PHOSPHATASEPROBEN VON MILCH MITTELS FARBENMESSUNG II.

A. Wágner, L. Horváth, T. Kiss und J. Gyetvai

Als Fortsetzung früherer Untersuchungen wurden die optimalen Umstände der alkalischen Phosphatasereaktion weiter studiert. Zur Feststellung der Farbe ein Tristimulus-Colorimeter vom MOM-COLOR-S-Typ verwendet, die Auswahl der best geeigneten Variante der Probe, des zur Untersuchung angewendeten Puffers und des Substrats auf Grund des ΔE_{ab}^* -Wertes ermöglicht.

Unter den selben Umständen ergab eine mit einem Ammoniumchlorid (40g/1000 cm³) und Ammoniumhydroxid (348 cm³ 25% NH₄OH in 1000 cm³) enthaltenden Puffer und mit zur Zeit als Modell zur Verfügung stehenden o-Cresolphthaleinphosphat durchgeführte Untersuchung die bestens auswertbare Reaktion. Die angewendeten Mengen waren: 5 cm³ Milch, 0,2 cm³ der Substrat/Pufferlösung (1 g/100 cm³) und nach einer Inkubation für 20 Minuten bei einer Temperatur von 38 °C 0,2 cm³ einer 2,5n Natriumhydroxidlösung zur Farbenbildung.

COMPARISON OF THE ALKALINE PHOSPHATASE TESTS OF MILK AS REFLECTED BY COLOUR MEASUREMENTS II.

A. Wágner, L. Horváth, T. Kiss and J. Gyetvai

In continuation of their earlier investigations the optimum conditions of the alkaline phosphatase test were studied. A tristimulus colorimeter of MOM-COLOR-S type was used for the colour measurement. This instrument ensures, on the basis of the value ΔE_{ab}^* , the choice of the most suitable variants of the sample, of the applied buffers and of the substrates. Under identical conditions the best evaluable reaction was obtained with the use of a buffer containing ammonium chloride (40 g in 1000 cm³) and ammonium hydroxide (348 cm³ of 25% NH₄OH in 1000 cm³), carried out with o-cresolphthalein phosphate which latter exists at present in form of a model. The amount of substances required for test is 5 cm³ of milk, and 0,2 cm³ of the substrate/buffer solution (containing 1 g of substrate in 100 cm³ of buffer), and after incubation for 20 minutes at 38 °C 0,2 cm³ of a 2,5 N solution of sodium hydroxide.