

Az o-krezoltaleinfoszfáttal végrehajtott lúgos foszfatáz próba a FIL – IDF 63:1971 tükrében III.*

WAGNER ATTILA, HORVÁTH LÓRÁND**, KISS TIBOR**,

GYETVAI JUDIT

Tejtermékek Ellenőrző Állomása, Budapest

Érkezett: 1980. január 10.

Bevezetés

Korábbi dolgozatunkban (1) beszámoltunk egy egyedileg új, de típusában ismert szubsztrát modellezéséről és tervezéséről, az o-krezoltalein-foszfátról, amelynek alkalmazásával optimálissá tehető a tej és tejtermékek hőkezeltségének ellenőrzése céljából alkalmazott lúgos foszfatáz próba. A tervezett és modellezett szubsztrátot azóta a *Gattermann* által felfedezett típus reakció alapján a fenoltaleinfoszfát analógiájára szintetizáltuk (2, 3, 4). A FIL – IDF 63:1971 (Nemzetközi Tejgazdasági Szövetség) által előírt klasszikus fenol – 2,6 dibróm-kinonklórimid reakció nem hasonlítható össze az o-krezoltalein-lúg reakcióval a korábbi dolgozatban ismertetett, optimalizált ammónium klorid-ammónium hidroxid pufferben, mert az ott ismertetett töménységű lúgos közegben a klasszikus szubsztrát a nátrium fenilfoszfát a reagens tárolása közben már hidrolizálódik, és az így felszabadult fenol és a túl nagy fenolreagens töménység egyaránt zavarja a reakciót. Ez a megállapítás szükségessé tette az o-krezoltaleinfoszfát, illetve a tej lúgos foszfatáz enzimjének hatására felszabadult o-krezoltaleinlúg reakcióinak párhuzamos összehasonlítását a nátrium fenilfoszfátról lehasadó fenolnak 2,6 dibrómkinonklórimid, 4-aminopiridin, a *Folin*-féle fenolreagenssel adott reakcióját aktivitás mérés alapján és szabad szemmel való értékelhetőség szempontjából, a FIL – IDF 63:1971 által előírt puffer és feltételek alkalmazása szerint (5, 6, 7, 8, 9).

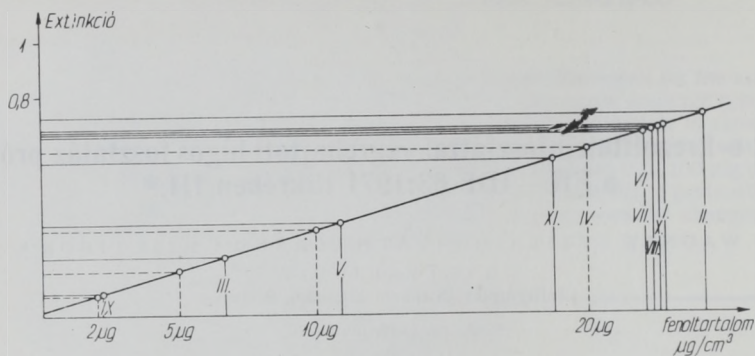
A vizsgálatok célja annak a megállapítása volt, hogy az általunk optimalizált próba és a nemzetközi szabvány feltételei között alkalmazott új szubsztrát jobb, vagy azonos értékű-e a klasszikus reakción alapuló eljárásnál.

Vizsgálati anyagok és módszerek

Az összehasonlító vizsgálatokhoz nyolc db 6,7 SH savasságú, üzembe érkező nyers elegyetejt, valamint három nyerstejből, illetve ennek felhasználásával készült tejpormintát használtunk.

* A MÉTE Mikrobiológiai Szakosztálya és Élelmiszeranalitikai Bizottsága, valamint a Magyar Kémikusok Egyesülete Biokémiai Szakosztálya rendezésében 1980. március 21-én a III. Enzimológiai Anketon tartott előadás.

** Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet Méréstechnikai és Automatizálási Osztálya, Budapest.



1. ábra

A FIL—IDF 63:1971. szabvány által előírt fenol — 2,6 dibromkinonklórimid reakción alapuló lúgos foszfátáz próba kalibrációs egyenesének és a vizsgált tej és tejporminták által felszabadított fenol mennyiség ábrázolása

Jelmagyarázat:

- _____ kalibrációs egyenes és a minták összekötő egyenesei
 a standardok összekötő egyenesei
 római számok: minták jelölései

1. táblázat

A felhasznált tej és tejporminták lúgos foszfátáz aktivitásának mérése

Minták	Extinkciók	Fenoltartalom µg/cm ³
Tej	0,685 — 0,690 — 0,680 — 0,675 — 0,675	22,80
	II 0,720 — 0,730 — 0,710 — 0,730 — 0,720	24,30
	III 0,215 — 0,210 — 0,210 — 0,205 — 0,205	6,70
	IV 0,610 — 0,610 — 0,600 — 0,590 — 0,590	20,00
	V 0,325 — 0,335 — 0,330 — 0,330 — 0,325	10,90
	VI 0,670 — 0,660 — 0,660 — 0,655 — 0,655	22,10
	VII 0,660 — 0,670 — 0,660 — 0,650 — 0,650	22,10
	VIII 0,710 — 0,710 — 0,695 — 0,695 — 0,700	22,50
Tej-porok	IX 0,072 — 0,075 — 0,068 — 0,068 — 0,068	2,20
	X 0,750 — 0,750 — 0,760 — 0,745 — 0,750	22,60
	XI 0,550 — 0,560 — 0,570 — 0,570 — 0,550	18,75

Színreakciók objektív értékelhetősége ΔE_{ab}^* értékek alapján a FIL – IDF 63:1971 által előírt feltételek szerint

Színreakció	Minták sorszáma							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
orto-krezolftalein-lúg	49,00	48,19	42,57	47,48	43,41	46,86	46,89	45,82
fenol-2,6-dibróm-kinonklórimid	30,12	3,88	28,51	29,10	16,24	30,48	30,37	29,18
fenol-4-aminoantipirín	29,64	1,43	40,68	36,27	7,78	35,33	36,06	38,50
fenol-Folin reagens opálos oldat	41,96	28,52	25,13	41,07	29,17	38,80	41,39	41,42
fenol-Folin reagens áttetsző oldat	34,25	23,71	7,94	31,84	13,71	28,85	34,09	30,35
Előjelek	+	+	+	+	+	+	+	+

Ha az orto-krezolftalein-lúg reakció ΔE_{ab}^* értékeiből kivonva az azonos minta bármelyik színreakciójának ΔE_{ab}^* értékeit mindenütt egyértelműen pozitív számot kapunk, ezért a nullhipotézist mindenütt elvetjük és kimondjuk, hogy az orto-krezolftalein-lúg adja a legértékeltőbb reakciót.

A három tejpormintából a Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet kérésünkre készített 45 °C illetve 65 °C hőmérsékleten végrehajtott elősűrítéssel, mivel a szak^e irodalomból ismert, de nem ellenőrzött az a tény, hogy a nyerstejből készült tejpороk az elősűrítés, porítás során alkalmazott technológiai hőkezelés ellenére enzim-aktívak és ezen biokémiai tulajdonságukon alapszik hőkezeltőségük (a takarmány-tejporoké is) ellenőrzése.

A vizsgálatok feltételei megfeleltek a FIL – IDF 63:1971, az MSZ 9619/2 – 75 szabvány, a CIE 1976-os ajánlás követelményeinek a bevezetésben említett kiegészítésekkel.

A szabadszemmel való összehasonlítás, értékelhetőség objektív mérése MOM – COLOR-S műszerrel, szabványos „C” megvilágítás mellett 10 mm átmérőjű felületen mértük 5 mm rétegvastagság mellett. A mérések megbízhatóságának megállapítására a negatív reakciójú mintánál 10 párhuzamos mérésből meghatároztuk a színösszetevők tapasztalati szórását. A negatív reakciójú mintákhoz viszonyítottuk a színváltozásokat. A szinkronizációkat, valamint a tapasztalati szórásokat a CIE 1976-ban ajánlott ΔE_{ab}^* képletével számoltuk.

A tapasztalati szórás értéke $S_i \Delta E_{ab}^* = 0,62$.

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

($\Delta E_{ab}^* = 1$ = szabad szemmel épphogy észlelhető,

$\Delta E_{ab}^* > 1$ = szabad szemmel jól értékelhető,

$\Delta E_{ab}^* < 1$ = szabad szemmel nem értékelhető.)

Vizsgálati eredmények és értékelésük

A kalibrációs egyenes felvétele után (1. ábra) meghatároztuk a tejek és tejportok enzimaktivitását, amelyeket az 1. táblázatban összesítettünk, továbbá rávezettük a kalibrációs egyenest ábrázoló ábrára.

A tejeiken végrehajtott reakciók megbízhatóságának számszerű (ΔE_{ab}^*) értékeléséhez nem paraméteres eljárást, az előjel próbát alkalmaztuk, mivel párhuzamosan ugyanazon mintákkal (11) hajtottuk végre a vizsgálatokat (2. táblázat).

Az értékelés eredményeként megállapítottuk, hogy a FIL – IDF 63:1971 által előírt körülmények között is az o-krezoltfalein-lúg adja a legértékeltőbb reakciót (12), mivel az objektív színméréssel megállapítható, hogy kiemelkedően mindig ez a reakció adja a legnagyobb ΔE_{ab}^* értéket, azaz szabad szemmel ez értékelhető legjobban.

Ezek után azt kellett megállapítani, hogy az élettani körülmények között termelt maximális szárazanyagtartalmú (12,60%) tejnek (*Fleischmann W.* (13) és mások) az előző közleményünk (1) alapján készült szabvány (12) szerinti vizsgálata esetén értékelhető-e a FIL – IDF 63:1971 szerint a kimutatás határán levő $2 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ fenolra vonatkozó aktivitás?

Modellvizsgálat alapján megállapítottuk, hogy igen, mert az ennek megfelelő aktivitású tejjel végrehajtott próba értékelhetősége a FIL – IDF 63:1971 által kimondott 2,4-s faktort is figyelembe véve az o-krezoltfaleinfoszfát alkalmazása esetén $17,9276 \Delta E_{ab}^*$ (10 db párhuzamos mérésből meghatározott tapasztalati szórással $S_{\Delta E_{ab}^*} = 0,14$) értéket képvisel, ami azt jelenti, hogy az üzemi próba a nemzetközi szabvánnyal egyenértékű, gyakorlatias, mivel különösebb előkészítés, és igény nélkül alkalmazható. Időigénye a Schütz-féle szabály alkalmazása mellett 13,5 perc (14, 15).

IRODALOM

- (1) Wagner, A., Horváth L., Kiss T., Gyelvai, J.: ÉVIKE 24, 47, 1978.
- (2) Gattermann, L., Wieland, H.: Laboratory Methods of Organic Chemistry. Macmillan and Co LTD ST. London, 1948.
- (3) Gattermann, L., Wieland, H.: Die Praxis des Organischen Chemikers. 28. Auflage. Walter de Guyter und Co. Berlin, 1941.
- (4) Huggins M, Talalay P.: Journal of Biochemical Chemistry. 1959, 400, 1945.
- (5) MSZ 3710 – 74
- (6) GOSZT 3623 – 73
- (7) ISO 3356 – 1975.
- (8) FIL – IDF 63:1971
- (9) László R.: Korszerű élelmiszevizsgálati módszerek. Tankönyvkiadó, Budapest, 1975.
- (10) Whittier, Earle O., Byron, Webb, H.: Byproducts from Milk. Reinhold Publishing Corporation. 330. West Forty-Second St. New-York 18, USA 1950.
- (11) Deák T., Novák E., Zukál E., Fényes T., Körmeny L.: Kísérletek tervezése és értékelése. Magyar Kémikusok Egyesülete Biokémiai Szakosztálya, Budapest, 1969.
- (12) MSZ 3710 – 79.
- (13) Fleischmann W.: Lehrbuch der Milchwirtschaft. M. Heinfins, Leipzig, 1908.
- (14) Tolnay P.: Ipari enzimológia. Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1963.
- (15) Haldane J. B. S., Stern K. G., Michaelis L.: Allgemeine Chemie der Enzyme. Theodor Steinkopff. Dresden und Leipzig, 1932.

ЩЕЛОЧНО-ФОСФАТАЗНАЯ ПРОБА ПРОВЕДЕННАЯ С О-КРЕЗОЛФТАЛЕИНФОСФАТОМ В СВЕТЕ FIL-IDF 63:1971. III.

A. Вагнер, Л. Хорват, Т. Киши и Й. Дьетвай

Авторы синтезировали моделированный и проектированный ими о-крезолфталейнофосфат.

Проводили сравнения способствующие установления оценки щелочи-о-крезолфталейна и реакции фенола (фенол-2,6-дибромхинонхлоримид, фенол-4-аминоантипирин, фенол - Фолин) измерение активности согласно FIL-IDF 68:1971 и согласно стандарта МС 9619/2, на основании рекомендации CIE 1976 по объективному измерению цвета.

На основании сранений установили, что и в условиях FIL-IDF 63:1971 щелоч-о-крезолфталейн дает лучше всего оценимые на глаз реакции в случае использования пробы щелочной фосфатазы.

Дальнейшим преимуществом пробы является то, что без предварительной подготовки, без требований прибором метод является эквивалентным, оптимизированным пробе FIL-IDF 63 - 1971, которая и в производственных условиях хорошо применима. Потребность времени место 30 минут составляет 13,5 минут (20, 21).

ДIE MIT O-KRESOLPHTHALEINPHOSPHAT DURCHGEFÜHRTE ALKALISCHE PHOSPHATPROBE HINSICHTLICH DER FIL - IDF 63:1971

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

Die Verfasser synthetisierten die durch sie modellisierte und geplante Verbindung: o-Kresolphthaleinphosphat.

Vergleichende Untersuchungen ermöglichten die Feststellung der Bewertbarkeit der Reaktionen von o-Kresolphthalein-Lauge und Phenol (Phenol-2,6-dibromchinonchlorimid, Phenol-4-aminoantipyrin, Phenol-Folin) auf Grund der durch FIL - IDF 63:1971 vorgeschriebenen Aktivitätsmessung und auf Grund der Empfehlung der ungarischen Norm MSZ 9619/2, der objektiven Farbmessung von CIE 1976.

Auf Grund dieser Vergleichung wurde festgestellt, dass auch unter den von FIL - IDF 63:1971 vorgeschriebenen Umständen die Kombination o-kresolphthalein-Lauge die sogar mit freiem Auge am besten wahrnehmbare Reaktion bei der alkalischen Phosphataseprobe ergibt.

Ein weiterer Vorteil dieser Probe ist, dass sie keine Vorbereitung und kein Instrument erfordert, und eine mit der von FIL - IDF 63:1971 vorgeschriebenen Probe gleichwertige optimierte Methode darstellt, die auch unter Betriebsumständen gut anwendbar ist. Der Zeitaufwand dieser Methode ist statt 30 Minuten nur 13,5 Minuten (20, 21).

THE ALKALINE PHOSPHATASE TEST CARRIED OUT WITH O-CRESOLPHTHALEIN PHOSPHATE FROM THE ASPECT OF FIL - IDF 63:1971

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

The authors synthesized o-cresol phthalein phosphate modelled and developed by them. Comparisons were carried out in order to establish the suitability for evaluation of the reactions of o-cresol phthalein-alkali and phenol (phenol-2,6-dibromoquinone-chloroimide, phenol-4-aminoantipyrin, phenol-Folin) on the

basis of the measurement of activity prescribed by FIL – IDF 63:1971 and of the Hungarian standard MSZ 9619/2, of the objective colour measuring procedure suggested by CIE in 1976.

On the basis of comparison tests it was found that even under the conditions prescribed by FIL – IDF 63:1971 o-cresol phthalein alkali gives at the alkaline phosphatase test the reaction which can be best evaluated even by the naked eye. A further advantage of the test is that it represents an optimized method equivalent to that prescribed by FIL – IDF 63:1971 and that it can be used also under conditions prevailing in plants. Its time requirement is 13.5 minutes instead of 30 minutes (20, 21).

HAZAI LAPSZEMLE

Összeállította: Kacs Kovics Miklós

Csóka S., Nagy S.-né: Különböző ivarú sertések húsmínőségének vizsgálata. Húsipar. 29, 30, 1980.

Valyon M. Bancsik L.: Az érzékszervi bírálat jelentősége és helyzete az élelmiszerek minőségében. Szabványosítás. 32, 75, 1980.

Ferenczi S., Kállay M., Bárdi Gy.: Enzimes módszerek a boranalitikában. I. Az enzimes vizsgálatok elve és gyakorlati kivitele. Magyar pezsgők savösszetételének vizsgálata enzimes módszerek segítségével. Borgazdaság. 28, 12, 1980.

Diófási L.: A mennyiség és a minőség összefüggései az Oportó, Kékfrankos és a Cabernet franc szőlőfajtáknál. Borgazdaság. 28, 20, 1980.

Krieger Ö.: A cukortartalom szerinti répaátvétel. Élelmezési Ipar. 34, 49, 1980.

Zetelakiné Horváth K.: A pektinbontó enzimek szerepe a növényi szövetek bontásában. I. Élelmezési Ipar. 34, 72, 1980.

Nagy J., Musulin K.: A zöldborsó- és zöldbabfeldolgozás mikrobiológiai vizsgálatának értékelése. Konzerv- és Paprikaipar. 27, 178, 1979.

Bujna F.: Hökezelte karfiol gyártásánál jelentkező káros elváltozások kiküszöbölése citromsav alkalmazásával. Konzerv- és Paprikaipar. 27, 185, 1979.

Nagel V., Zalavári Gy.-né, Fekete T.-né, Fábri I.: Fűszerek termékspecifikus spóraszámának vizsgálata. Konzerv- és Paprikaipar. 27, 197, 1979.

Eleftheriades P., Perédi J., Jerenek M., Szungyi M.: A sertézsír átészterezése II. Olaj, Szappan, Kozmetika. 29, 11, 1980.

Szladecskó Gy.-né, Szép I.-né, Szabó J.-né: A sütőlesztő koliformbaktériumos fertőzéséről I. 28, 9, 1980.

Hangyál K., Lásztity R.: A cukorrépa tárolás alatti változásainak vizsgálata I. A cukorrépa szénhidrát anyagcseréjének általános kérdései. Cukoripar. 32, 207, 1979.

Fügediné Németh M.: 3,4-benzpirén meghatározása a cigarettafüstben spektrofotometriás módszerrel. Dohányipar. 27, 41, 1980.

Hangyál K., Lásztity R.: A cukorrépa tárolás alatti változásainak vizsgálata. II. A nitrogéntartalmú nemcukoranyagok anyagcseréje. Cukoripar. 33, 9, 1980.