

Lab. Zuivel

VERSLAG 81.52

Pr.nr. 505.6000

Project: Ontwikkeling en verbetering van  
onderzoekmethoden voor melk-  
en zuivelprodukten

Onderwerp: Fosfatase in melk en boter/kaas.

Verzendlijst: Directeur, sektorhoofd (3x), directie V.K.A., Venema,  
Oortwijn (3x), Normalisatie, Projectbeheer.

Lab. Zuivel

VERSLAG 81.52

Pr.nr. 505.6000

Project: Ontwikkeling en verbetering van onderzoekmethoden voor melk- en zuivelprodukten.

Onderwerp: Fosfatase in melk en boter/kaas.

---

Doel:

Doorlichten van de bepalingsmethoden voor melk NEN 3142  
boter NEN 3732  
kaas NEN 3774.

Samenvatting:

De normen fosfatase in boter NEN 3732 en kaas NEN 3774 zijn vrijwel gelijk. Tussen deze normen en de norm voor melk NEN 3142 bestaan enige verschillen in de reagentia. Bekeken werd of niet voor alle methoden dezelfde reagentia gebruikt kunnen worden.

Sanders (1949) beschrijft wat de optimale reaktie pH's zijn (zie bijgaand schema). De volgens de methoden verkregen pH's werden gecontroleerd en zonodig bijgesteld.

Conclusie:

Voor de bepaling van fosfatase in melk kan van dezelfde chemicaliën gebruik worden gemaakt als voor boter en kaas. Om de blanko zo laag mogelijk te houden moet de kleurreactie bij voorkeur in gedempt licht of in het donker plaatsvinden. Zijn de blanko's toch nog hoger dan ong. 0,100 Ext, dan moet er met butanol uitgeschud worden. De NaBO<sub>2</sub> buffer moet op pH 9,8 ingesteld worden.

---

Verantwoordelijk: ir H. Oortwijn

Medewerker/Samensteller: D.P. Venema

## 1. Inleiding

De fosfataseactiviteit in melk wijkt op enkele punten af van de bepaling in boter en kaas. Omdat vaak een serie bepalingen zowel melk- als boter- resp. kaasmonsters bevat, werd bekeken of niet volgens één voorschrift gewerkt kan worden.

Vaak zijn de blanco's duidelijk blauwbruin. Bij een Ext >0,100 moet er met butanol uitgeschud worden, dit vergt meer tijd. Sanders (1949) schrijft dat bij optimale pH waarden (zie reactieschema) het niet nodig is om uit te schudden. Bovendien is de pH belangrijk bij de enzymreactie. Alle pH-waarden tijdens de bepaling werden gecontroleerd. Bij afwijkingen werd gekeken naar het effect van een betere pH-instelling.

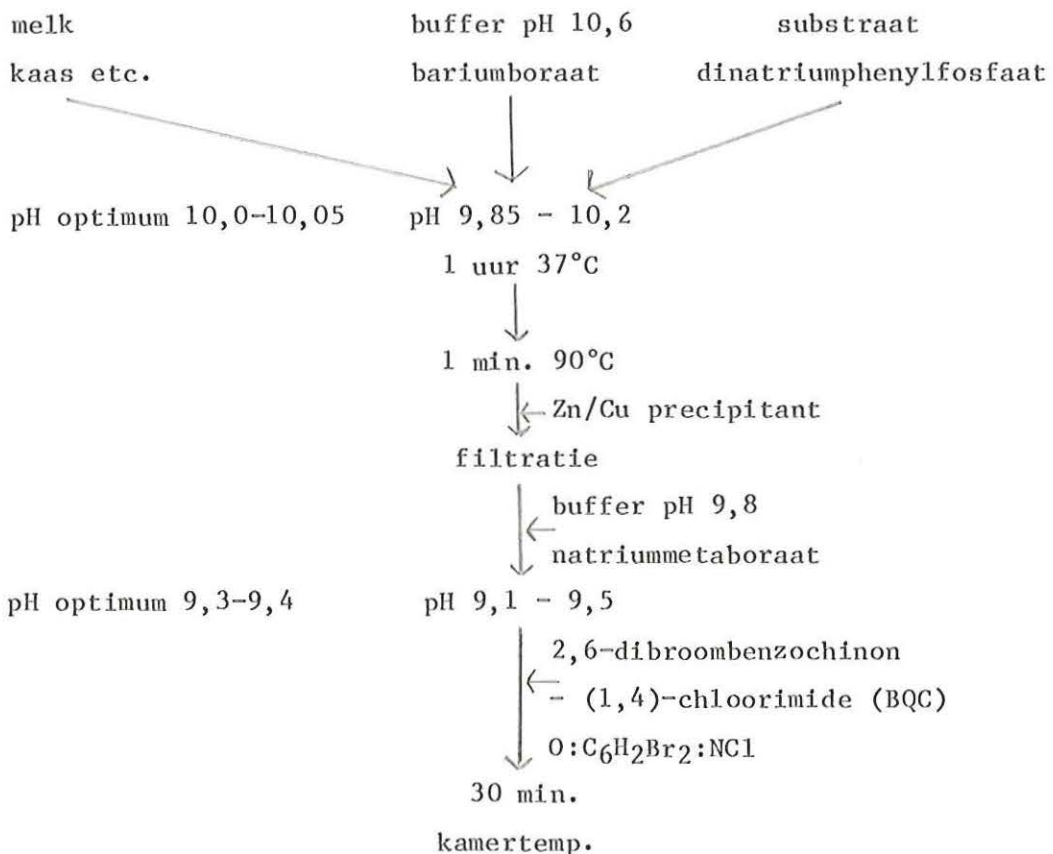
### Reaktieschema

#### Fosfatase bepaling

George P. Sanders: The phosphate test for pasteurisation of dairy products.

XIIth Int. Dairy Congress Stockholm 1949 Section II subject 5:

Monster:



Verschillen tussen de oplossingen van de boter/kaasnorm en de melknorm

Oplissing	conc. vlg. boter/kaas- norm	conc. vlg. melknorm	conc. voor ideale pH
bariumboraatbuffer			
Ba(OH) <sub>2</sub> ·8H <sub>2</sub> O	18 gr/1	12,5 gr/1	9 gr/1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	8 gr/1	5,5 gr/1	4 gr/1
	afgekort BaBO <sub>3</sub> 18/8	afgekort BaBO <sub>3</sub> 12,5/5,5	afgekort BaBO <sub>3</sub> 9/4
Zn/Cu precipitants			
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	6,0 gr/100 ml	3,0 gr/100 ml	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,1 gr/100 ml	0,6 gr/100 ml	
	afgekort 6,0/0,1 prec.	afgekort 3,0/0,6 prec.	

## 2. Resultaten

### 2.1 Zn/Cu precipitants:

De waardes zijn het gemiddelde van duplobepalingen

	Ext 650 nm	Blanko	µg fosfatase
Boter 6,0/0,1 prec.	0,928	0,056	62,2
	0,927	0,079	60,3
Boter 3,0/0,6 prec.	0,930	0,056	62,5*
	0,904	0,066	59,8
Melk 6,0/0,1 prec.	0,749	0,059	4884
	0,684	0,064	4444
Melk 3,0/0,6 prec.	0,741	0,062	4862
	0,724	0,075	4642

\* geeft vaak een zo fijn precipitaat dat het door het filter gaat, zodat een tweede maal gefiltreerd moet worden (het filter is dan dichtgeslibd).

## 2.2 De pH-waardes tijdens de bepaling

De natriummetaboraatbuffer bleek, volgens voorschrift gemaakt, een veel te hoge pH te hebben (pH 11,0 i.p.v. pH 9,8). Met 2n HCl werd de buffer op pH 9,8 gebracht. In de tabel zijn de beide buffers aangeduid als resp. NaBO<sub>2</sub> 9,8 en NaBO<sub>2</sub> 11,0.

	Boter pH	Melk pH		Boter pH	Melk pH
BaBO <sub>3</sub> 18/8	10,1	10,2	+NaBO <sub>2</sub> 11,0	9,7	9,7
BaBO <sub>3</sub> 18/8			+NaBO <sub>2</sub> 9,8	9,5	9,6
BaBO <sub>3</sub> 9/4	10,0	10,0*	+NaBO <sub>2</sub> 9,8	9,4	9,45

\* geeft vaak een zo fijn precipitaat dat het door het filter gaat, zodat een tweede maal gefiltreerd moet worden (het filter is dan dichtgeslibd).

		water	Bl Ext	µg	gem.	butanol	Bl Ext	µg	gem.
		Ext		fos-		Ext		fos-	
		610 nm		fatase		650 nm		fatase	
I									
BaBO <sub>3</sub> 18/8 NaBO <sub>2</sub> 11,0		0,606	0,126	55,9	56,1	0,905	0,060	56,3	57,6
0,5 gram boter		0,610	0,135	56,3		0,886	0,067	59,0	
BaBO <sub>3</sub> 18/8 NaBO <sub>2</sub> 9,8		0,592	0,102	57,2		0,852	0,069	56,3	
0,5 gram boter		0,620	0,110	59,4	58,2	0,898	0,074	59,0	58,1
		0,600		58,1		0,899		59,0	
II									
BaBO <sub>3</sub> 18/8 NaBO <sub>2</sub> 11,0		0,314	0,155	18,5	17,4	0,350	0,072	19,8	19,2
0,5 gram boter		0,293	0,156	16,3		0,330	0,073	18,5	
BaBO <sub>3</sub> 9/4 NaBO <sub>2</sub> 9,8		0,308	0,092	25,1		0,438	0,080	25,5	
				(troebel)				(troebel)	
0,5 gram boter			0,098				0,090		

	water Ext 610 nm	Bl Ext	µg fos- fatase	gem.	butanol Ext 650 nm	Bl Ext	µg fos- fatase	gem.	
III									
BaBO <sub>3</sub> 18/8 NaBO <sub>2</sub> 9,8	0,420	0,139	17,4		0,529	0,077	16,5		
1,0 gram boter	0,432	0,109	18,0	17,5	0,544	0,063	16,9	16,6	
	0,431		18,0		0,543		16,9		
	0,409		18,7		0,522		16,3		
BaBO <sub>3</sub> 9/4 NaBO <sub>2</sub> 9,8	0,424	0,088	19,1		0,613	0,078	19,4		
1,0 gram boter	0,425	0,108	19,1	19,0	0,622	0,062	19,8	19,2	
	0,421		18,9		0,601		18,9		
	0,418		18,7		0,599		18,9		
IV									
BaBO <sub>3</sub> 18/8 NaBO <sub>2</sub> 11,0	0,387	0,104	16,7	16,8	0,508	0,046	18,9	19,2	
1,0 gram boter	0,396	0,107	16,9		0,529	0,040	19,6		
BaBO <sub>3</sub> 9/4 NaBO <sub>2</sub> 11,0	0,417	0,087	19,6	19,6	0,642	0,049	21,1	21,1	
			(iets troebel)				(iets troebel)		
1,0 gram boter		0,084				0,050			
BaBO <sub>3</sub> 9/4 NaBO <sub>2</sub> 9,8	0,392	0,039	20,5	19,8	0,612	0,038	20,5	19,7	
1,0 gram boter	0,365	0,045	19,1		0,569	0,043	18,9		

De onder punt II, III en IV uitgevoerde bepalingen betreffen steeds hetzelfde monster boter.

### 3. Discussie

De bepaling werd op de volgende punten nader bekeken.

#### 3.1 Zn/Cu precipitans:

Alle combinaties geven dezelfde resultaten. Het melkprecipitans, gebruikt bij boter, geeft een moeilijk filtreerbaar neerslag, zodat het beste het boterprecipitans (Zn/Cu: 6,0/0,1) voor boter en melk gebruikt kan worden.

### 3.2 De pH-waardes tijdens de bepaling:

De  $\text{BaBO}_3$  18/8 blijkt tijdens de enzymreactie een te hoge pH te geven. Een probleem is verder dat de bufferende werking van de  $\text{BaBO}_3$  oplossing niet zo groot is. Samen met het monster hoort de buffer van pH 10,6 een pH 10,0 waarde te geven. Is het monster te zuur (bijv. karnemelk) dan moet er eerst geneutraliseerd worden. Is het monster niet zuur genoeg dan blijft de pH-waarde te hoog. Geprobeerd is door verdunnen van de  $\text{BaBO}_3$  buffer een betere reactie pH-te krijgen. Een nadeel is dan, dat het Zn/Cu precipitaats soms een zo fijn neerslag geeft, dat het niet of moeilijk uit te filtreren is. Makkelijker is om de concentratie maar op 18/8 te houden, de pH 10,1-10,2 valt immers nog binnen de door Sanders gegeven waardes. De gevonden activiteit verschilt ook niet veel. Anders is het met de natriummetaboraatbuffer. De NEN-norm geeft hiervoor geen pH waarde aan. Sanders zegt dat de pH 9,8 is. Volgens voorschrift gemaakt heeft de buffer echter een pH 11,0. Met 2n HCl werd de buffer op pH 9,8 ingesteld. De buffers met pH 11,0 en pH 9,8 werden vergeleken. De buffer van pH 9,8 geeft een betere pH tijdens de kleuring, wat o.a. een lagere blanko tot gevolg heeft (ook volgens Sanders).

### 3.3 De blankobepaling:

Bij een te hoge blanko, wordt er een te lage fosfataseactiviteit gevonden. Daarom moet er bij een Ext  $>0,100$  of zelfs al eerder met butanol uitgeschud worden. De storende kleur blijft dan in de waterfase. Van invloed op de blanko zijn o.a. de volgende factoren:

- a. Een juiste pH tijdens de kleurreactie, te bereiken door gebruik van de  $\text{NaBO}_2$  buffer pH 9,8.
- b. De verhitting boven  $85^\circ\text{C}$  om de enzymreactie te stoppen, die zo kort mogelijk moet zijn.
- c. De lichtintensiteit tijdens de kleurreactie, die laag moet zijn. De kleurreactie bij voorkeur in het donker of bij gedempt licht laten plaatsvinden.