



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 249 974 A1

4(51) G 01 N 33/04

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP G 01 N / 291 301 5	(22)	16.06.86	(44)	23.09.87
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Forschungszentrum für Tierproduktion Dummerstorf-Rostock, 2551 Dummerstorf, DD
(72)	Reichardt, Werner, Dr. rer. nat.; Schüler, Erika, DD

(54)	Verfahren zur Bestimmung des Protein- und des Fettgehaltes, insbesondere von Milch
------	--

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Protein und Fett in biologischem Material, insbesondere in Milch. Dabei handelt es sich um eine für Serienuntersuchungen geeignete Schnellmethode, die besonders bei mikroprozessorgesteuerten Spektralphotometern effektiv angewandt werden kann. Das Verfahren beruht auf der Messung von Absorptionen im ultravioletten Spektralbereich. Hierzu ist es erforderlich, die Milch zuvor zu homogenisieren, mittels Detergenzlösung im Verhältnis 1:500 bis 1:50 zu verdünnen und Küvetten geringer Schichtdicke anzuwenden.



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 249 974 A1

4(51) G 01 N 33/04

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP G 01 N / 291 301 5	(22)	16.06.86	(44)	23.09.87
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Forschungszentrum für Tierproduktion Dummerstorf-Rostock, 2551 Dummerstorf, DD
(72)	Reichardt, Werner, Dr. rer. nat.; Schüler, Erika, DD

(54)	Verfahren zur Bestimmung des Protein- und des Fettgehaltes, insbesondere von Milch
------	--

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Protein und Fett in biologischem Material, insbesondere in Milch. Dabei handelt es sich um eine für Serienuntersuchungen geeignete Schnellmethode, die besonders bei mikroprozessorgesteuerten Spektralphotometern effektiv angewandt werden kann. Das Verfahren beruht auf der Messung von Absorptionen im ultravioletten Spektralbereich. Hierzu ist es erforderlich, die Milch zuvor zu homogenisieren, mittels Detergenzlösung im Verhältnis 1:500 bis 1:50 zu verdünnen und Küvetten geringer Schichtdicke anzuwenden.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

Zur PS Nr. 249 974

ist eine Zeitschrift erschienen.

(Teilweise bestätigt gem. § 18 Abs. 1 d. Änd.Ges.z.Pat.Ges.)

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Bestimmung des Protein- und Fettgehaltes, insbesondere von Milch aus homogenisierten Proben mit Hilfe der Spektralphotometrie, **gekennzeichnet dadurch**, daß Milchproben mit Detergenzlösungen, vorzugsweise mit Alkylsulfat, Alkylpolyglykoethersulfat und Polyoxyethylenmonodecylether verdünnt werden und die gleichzeitige Analyse von Protein und Fett aus einer detergenzhaltigen Lösung mittels Spektralphotometrie im ultravioletten oder im ultravioletten und sichtbaren Bereich erfolgt.
2. Verfahren zur Bestimmung des Protein- und Fettgehaltes nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Detergenzlösungen in einer Konzentration von 0,5–1,0 Ma.-% und einem Mischungsverhältnis von 1:50 bis 1:500 zugesetzt werden.
3. Verfahren zur Bestimmung des Protein- und Fettgehaltes nach Punkt 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß die gegen die reine Detergenzlösung gemessene Absorption im ultravioletten bzw. im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich vorzugsweise nach einer der folgenden Gleichungen ausgewertet wird:
 - % Protein = Faktor · $(A_x - A_y)$, $x = 160\text{--}240\text{ nm}$; $y = 220\text{--}310\text{ nm}$
 - % Protein = Faktor · A_x , x kleiner 240 nm
 - % Protein = Polynom mit Absorbanzwerten zwischen 160 u. 240 nm
 - % Fett = Faktor · A_y , y = Wert zwischen 260 u. 650 nm
 - % Fett = Faktor · $(A_y + A_z)$, y und z = Werte zwischen 260 und 650 nm
 - % Fett = Polynom mit Absorbanzwerten zwischen 260 und 650 nm

Anwendungsgebiet der Erfindung:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur gleichzeitigen quantitativen Analyse des Protein- und des Fettgehaltes von Milch und Molkereiprodukten, welches sowohl für die Milchleistungsprüfung als auch in der milchverarbeitenden Industrie unmittelbar angewendet werden kann.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Für die quantitative Bestimmung des Proteingehaltes von biologischen Flüssigkeiten, wie Milch, sind verschiedene Methoden bekannt wie z. B. die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl, die alkalische Wasserdampfdestillation, die Formoltitration, das Farbstoffbindungsverfahren (DD-PS 57213, G01 N 33/04; DD-PS 61640, G01 N 33/02), Kopplungen von Kjeldahl-Naßaufschluß mit chemischen, elektrochemischen und photometrischen Ammoniak-Nachweisverfahren, die Analyse der Infrarotabsorption bei 1548 cm^{-1} , die Fluoreszenzmessung und die Untersuchung der Absorption verdünnter Lösungen im ultravioletten Spektralbereich bei 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235 oder um ca. 280 nm. Für die Erfassung des Fettgehaltes von Flüssigkeiten, wie Milch, sind das acidbutyrometrische Verfahren, das gravimetrische Verfahren, die Trübungsmessung im sichtbaren Spektralbereich zwischen 400 bis 800 nm, die Analyse der Infrarotabsorption bei 1750 oder 2860 cm^{-1} , die Reflexionsmessung im nahen und mittleren Infrarotbereich (DD-PS 73668, G01 N 33/06) oder Ultraschallmessungen bekannt.

Eine gleichzeitige Bestimmung beider Milchinhaltstoffe aus einer Lösung bzw. Probe ist bisher nur mit Hilfe der Infrarotspektralphotometrie möglich. Hierzu sind jedoch speziell konstruierte Analysengeräte erforderlich, so daß die Anwendung dieser Methode in der Praxis in breitem Umfange nicht möglich ist.

Die Ultraviolett-spektralphotometrie wird überwiegend zur Untersuchung von entfetteten biologischen Flüssigkeiten eingesetzt, da die Fettkügelchen die Absorption durch Streulichte effekte um so mehr verfälscht, je kleiner die zur Untersuchung verwendete Wellenlänge ist.

Für nicht entfettetes Blutserum wurde die Doppelwellenlängenmessung bei 215 und 225 nm und für Rohmilch die Kombination 210 und 220 nm vorgeschlagen.

Beide UV-Verfahren sind jedoch auf die Analyse des Proteingehaltes beschränkt. Die von Nakai und Le (J. Dairy Sci. 53 [1970] 3, 276) empfohlene simultane Bestimmung von Milchprotein und Milchfett aus unhomogenisierter Rohmilch einer Probe erfordert nach der Proteinbestimmung bei 280 nm eine erneute Chemikalienzugabe, um bei 400 nm im sichtbaren Spektralbereich danach das Fett bestimmen zu können. Außerdem ist eine runde Küvette notwendig.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, eine kostengünstige Alternative zur finanziell und technisch aufwendigeren Infrarotuntersuchung zu schaffen und im Vergleich zur getrennten herkömmlichen Bestimmung beider Milchinhaltsstoffe den Analysendurchsatz zu erhöhen, die Analysengenauigkeit zu verbessern und die Anwendung aggressiver und giftiger Chemikalien zu eliminieren.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die gemeinsame Bestimmung von Protein und Fett aus einer homogenisierten und anschließend mit einer Detergenzlösung verdünnten Milchprobe auf der Basis von handelsüblichen Ultraviolett Spektralphotometern zu ermöglichen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß homogenisierte Milchproben mit einer 0,5 bis 1%igen Alkylsulfat-, Alkylpolyglykoethersulfat-, Polyoxyethylenmonododecylether- oder anderen Detergenzlösungen geringer Eigenabsorbanz im Verhältnis 1:50 bis 1:500 verdünnt werden. Für die Bestimmung des Proteingehaltes eignen sich die Absorption der Peptidbindung von etwa 160 nm bis 235 nm oder Absorptionsdifferenzen

$$A_{160 \text{ bis } 240 \text{ nm}} - A_{220 \text{ bis } 310 \text{ nm}}$$

Die Ultraviolettmeßdaten sind gegen den nach Kjeldahl erfaßten Roh- oder Reinproteingehalt von Einzelmilchproben zu kalibrieren. Der Fettgehalt kann aus dem Spektralbereich zwischen 260 nm und 650 nm anhand der Absorbanz bei einer definierten Wellenlänge analysiert werden. Die Extinktionswerte werden mit Hilfe der nach Gerber oder Röse-Gottlieb ermittelten Fettgehaltswerte kalibriert. Für das Bestimmungsverfahren soll der Fettkügelchendurchmesser $d \leq 1,3 \mu\text{m}$ betragen. Die Untersuchungen erfordern eine Durchflußküvette mit einer Schichtdicke $\leq 1 \text{ mm}$.

Die punktuell oder kontinuierlich gegen die reine Detergenzlösung gemessene Absorption im ultravioletten bzw. ultra-violetten und sichtbaren Spektralbereich wird vorzugsweise nach einer der folgenden Gleichungen ausgewertet:

$$\% \text{ Protein} = \text{Faktor} \cdot (A_x - A_y), x = 160-240 \text{ nm}, y = 220-310 \text{ nm}$$

$$\% \text{ Protein} = \text{Faktor} \cdot A_x, x \text{ kleiner } 240 \text{ nm}$$

$$\% \text{ Protein} = \text{Polynom mit Absorbanzwerten zwischen } 160 \text{ und } 240 \text{ nm}$$

$$\% \text{ Fett} = \text{Faktor} \cdot A_y, y = \text{Wert zwischen } 260 \text{ und } 650 \text{ nm}$$

$$\% \text{ Fett} = \text{Faktor} \cdot (A_y + A_z), y \text{ und } z = \text{Werte zwischen } 260 \text{ und } 650 \text{ nm}$$

$$\% \text{ Fett} = \text{Polynom mit Absorbanzwerten zwischen } 260 \text{ und } 650 \text{ nm}$$

Die technisch-ökonomischen Vorteile der Erfindung durch die gemeinsame Analyse von Protein und Fett aus einer Probe ergeben sich aus dem höheren Nutzungsgrad der herkömmlichen Analysetechnik, der höheren Produktivität gegenüber der getrennten Bestimmung der Milchinhaltsstoffe, der genaueren, von der Aminosäurezusammensetzung des Proteins unbeeinflussten Ultraviolettabsorptionsmessung sowie der Unabhängigkeit von aggressiven und giftigen Chemikalien.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll nachstehend anhand von drei Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel 1:

200 μl einer homogenisierten Rohmilchprobe werden unmittelbar nach dem Homogenisieren und Temperieren auf 20°C mit 50 ml 0,5%iger Lösung von Natriumdodecylsulfat in Wasser versetzt und geschüttelt.

Innerhalb von drei Stunden wird mit Hilfe eines Ultraviolett Spektralphotometers mit einer 1 mm starken Durchflußküvette die Absorbanz bei 205, 233 und 295 nm bestimmt. Die Errechnung des Proteingehaltes erfolgt nach: $(A_{205} - A_{233}) \cdot \text{Faktor} = \% \text{ Protein}$.

Der Fettgehalt wird nach: $A_{295} \cdot \text{Faktor} = \% \text{ Fett}$ ermittelt.

Bei täglicher Justierung des Spektralphotometers mit Hilfe von Filtern von definierter Absorbanz bleiben die Faktoren konstant. Die Messungen erfolgen gegen die Detergenzlösung als Leer- oder Blindwert.

Ausführungsbeispiel 2:

50 μl frisch homogenisierte und auf 20°C temperierte Milch werden mit 10 ml 0,7%iger Natriumalkylpolyglykoethersulfatlösung verdünnt und geschüttelt. Die Absorbanz bei 205 nm und bei 280 nm wird unter Einsatz eines Ultraviolett Spektralphotometers mit einer Schichtdicke von 1 mm innerhalb von drei Stunden bei 40°C bestimmt. Der Proteingehalt errechnet sich nach:

$$A_{205} \cdot \text{Faktor} = \% \text{ Protein. Der Fettgehalt ergibt sich aus:}$$

$$A_{280} \cdot \text{Faktor} = \% \text{ Fett.}$$

Ausführungsbeispiel 3:

100–200 mg Käse oder Quark werden eingewogen und mit 4 ml 0,1 M Kaliumhydroxidlösung über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Rühren und Filtration von den unlöslichen Bestandteilen (Fett u. a.) ist es möglich, den Proteingehalt durch Differenzmessung bei 205 und 233 nm zu bestimmen, nachdem 50 ml der proteinhaltigen Lösung mit 10 ml 0,5–1%iger Detergenzlösung verdünnt wurden. Die Absorptionsdifferenz ist an dem nach KJELDAHL ermittelten Rohproteingehalt von Käse zu kalibrieren.

Bei Beschleunigung der Auflösung des Käseproduktes durch Rühren und nach Homogenisieren von bis zu 5 Stunden alten Lösungen von Käse in 0,1 M KOM ist auch die gemeinsame Bestimmung von Protein und Fett in der beschriebenen Weise durchführbar.

Sinngemäß ist die Bestimmung auch bei gewolften oder homogenisierten Proben von Fleisch und Wurstwaren anzuwenden, die in 0,1 M Kaliumhydroxid oder in 0,05 M Natriumperoxidlösungen aufgelöst wurden.