



(12) Wirtschaftspatent

Teilweise bestätigt gemäß § 18 Absatz 1
Patentgesetz

(19) **DD** (11) **249 974 B1**

5(51) **G 01 N 33/04**
G 01 N 21/17
G 01 J 3/42

PATENTAMT der DDR

(21) WP G 01 N / 291 301 5 (22) 16.06.86 (45) 15.08.90
(44) 23.09.87

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

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

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Bestimmung des Protein- und Fettgehaltes, insbesondere von Milch, aus homogenisierten und mit Detergenzlösungen verdünnten Proben mit Hilfe der Spektralphotometrie, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Milchproben mit Detergenzien von geringer Eigenabsorbanz verdünnt werden und die gleichzeitige Analyse von Protein und Fett aus nur einer Lösung in nur einer Durchflußküvette mit einer Schichtdicke ≤ 1 mm im ultravioletten Bereich erfolgt.
2. Verfahren zur Bestimmung des Protein- und Fettgehaltes nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Detergenzlösungen in einer Konzentration von 0,15–1,0 Ma.-% und einem Mischungsverhältnis von 1:50 bis 1:500 zugesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Berechnung des Proteingehaltes, die gegen die reine Detergenzlösung gemessene Absorption nach einer der folgenden Gleichungen ausgewertet wird:
% Protein = Faktor \cdot (Ax – Ay), x = 160–240 nm, y = 220–310 nm
% Protein = Polynom mit Absorbanzwerten zwischen 160 u. 240 nm.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Berechnung des Fettgehaltes, die gegen die reine Detergenzlösung gemessene Absorbanz nach einer der folgenden Gleichungen berechnet wird:
% Fett = Faktor \cdot Ay; y = 260–360 nm
% Fett = Faktor \cdot (Ay + Az), y u. z. = 260–360 nm
% Fett = Polynom mit Absorbanzwerten zwischen 260 u. 360 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 572213, G 01 N 33/04; DD-PS 61640, G 01 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 etwa 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, G 01 N 33/06) oder Ultraschallmessungen bekannt.

Eine gleichzeitige Bestimmung beider Milchinhaltstoffe aus einer Lösung bzw. Probe ist 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 Ultraspektralphotometrie 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 255 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.

Eine Vorrichtung zur simultanen Bestimmung des Eiweiß- und Fettgehaltes von Milch auf der Basis spektralphotometrischer Untersuchungen wird in der SU-PS 1099281 (G 01 N 33/04) vorgestellt. Für die Milchanalyse aus einer gemeinsamen Milchprobe sind jedoch zwei separate Küvetten unterschiedlicher Schichtdicke vorgesehen. Während für die Fettbestimmung eine Meßwellenlänge im sichtbaren Spektralbereich (400–430 nm) vorgesehen ist, erfolgt die Proteinbestimmung aus der homogenisierten und mit Detergenzlösung verdünnten Milchprobe bei einer Wellenlänge im UV-Bereich (200–210 nm). Die unter diesen Bedingungen ablaufenden Messungen sind apparativ aufwendig und ungenau.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, eine kostengünstige Alternative zur finanziell und technisch aufwendigen Infrarotuntersuchung zu schaffen und im Vergleich zur getrennten herkömmlichen Bestimmung beider Milch Inhaltsstoffe 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 Ultraviolettspektrophotometern zu ermöglichen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß homogenisierte Milchproben mit einer 0,5- bis 1%igen Alkylsulfat-, Alkylpolyglykolethersulfat-, 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 dem nach Kjeldahl erfaßten Roh- oder Reinproteingehalt von Einzelmilchproben zu kalibrieren. Der Fettgehalt kann aus dem Spektralbereich zwischen 260 nm und 360 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 Spektralbereich wird vorzugsweise nach einer der folgenden Gleichungen ausgewertet:

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

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

$$\% \text{ Fett} = \text{Faktor} \cdot A_y, y = \text{Wert zwischen 260 und 360 nm}$$

$$\% \text{ Fett} = \text{Faktor} \cdot (A_y + A_z), y \text{ und } z = \text{Werte zwischen 260 und 360 nm}$$

$$\% \text{ Fett} = \text{Polynom mit Absorbanzwerten zwischen 260 und 360 nm}$$

Die technisch-ökonomischen Vorteile der Erfindung, die sich aus der gemeinsamen Analyse von Protein und Fett aus einer Probe ergeben, sind ein höherer Nutzungsgrad der herkömmlichen Analysetechnik, eine höhere Produktivität gegenüber der getrennten Bestimmung der Milch Inhaltsstoffe und die genauere, von der Aminosäurezusammensetzung des Proteins unbeeinflusste UltraviolettabSORPTIONSMESSUNG sowie die 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 Ultraviolettspektrophotometers 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 definierter Absorbanz bleiben die Faktoren konstant. Die Messungen gegen die Detergenzlösung als Leer- oder Blindwert.

Die Homogenisation kann auch nach dem Verdünnen der Milch mit Detergenzlösung erfolgen.

Ausführungsbeispiel 2

50 μl frisch homogenisierte und auf 20°C temperierte Milch werden mit 10 ml 0,7%iger Natriumalkylpolyglykolethersulfatlösung verdünnt und geschüttelt. Die Absorbanz bei 205 nm und bei 280 nm wird unter Einsatz eines Ultraviolettspektrophotometers 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 stengelassen. 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 gewolfen oder homogenisierten Proben von Fleisch und Wurstwaren anzuwenden, die in 0,1 M Kaliumhydroxid oder in 0,05 M Natriumperoxidlösungen aufgelöst wurden.