

Juni 1977 / 59  
Herausgegeben von der  
Eidgenössischen Forschungsanstalt für Milchwirtschaft  
CH-3097 Liebefeld  
Direktor: Prof. Dr. B. Blanc

## Neue, einfache und wirtschaftliche Methode zur routinemässigen Bestimmung des Proteingehaltes der Milch und einiger Milchprodukte

J. O. BOSSET und B. H. BLANC

### Einleitung

In den letzten fünfzehn Jahren hat die Bestimmung des Proteingehalts der Milch eine beträchtliche Entwicklung durchlaufen, sowohl in bezug auf die Suche nach neuen Analysemethoden als auch auf deren praktische Anwendung. Die Literaturübersicht, die diesem Thema vor kurzem gewidmet wurde [1], lässt erkennen, dass drei Gruppen von Methoden im Vordergrund stehen: die Methoden nach Kjeldahl, die Methoden der Infrarot-Spektrophotometrie und die Methoden, welche auf der Bindung eines Farbstoffes beruhen (Amidoschwarz, Orange G, usw.). Die Methode nach Kjeldahl, auf die man sich noch heute bezieht, und ihre zahlreichen Varianten, erfordern eine nasse Veraschung mit konzentrierter Schwefelsäure in der Hitze, eine Neutralisierung mit Lauge, eventuell eine Wasserdampfdestillation und schliesslich eine Titration oder

eine photometrische Messung des anfallenden Ammoniaks, also eine Reihe von langwierigen, heiklen und nicht ungefährlichen Arbeitsprozessen. Die infrarot-spektrophotometrischen Methoden sind zwar weniger aufwendig und schneller in der Ausführung, benötigen aber teure und heikle Apparaturen, deren Anschaffung nur bei ganz grossen Analysenserien in Betracht gezogen werden kann. Die Methoden der Farbstoffbindung sind für ein kleines Labor noch am ehesten geeignet. Es sind jedoch mehrere Arbeitsvorgänge dazu nötig, nämlich, die Bildung eines unlöslichen Farbkomplexes zwischen dem verwendeten Farbstoff und den Proteinen, die Trennung dieses Komplexes durch Zentrifugation oder Filtration und schliesslich die eigentliche photometrische Messung des Farbstoffüberschusses.

In der vorliegenden Arbeit wird eine einfache, schnelle und billige kolorimetrische Methode vorgeschlagen. In der Tat handelt es sich um eine der Milch und einigen Milchprodukten angepasste Version der sogenannten «Biuretmethode», die in der klinischen Chemie schon lange zur Bestimmung der Gesamtproteine des Plasmas verwendet wird. Diese neue Methode kann zudem leicht automa-

tisiert werden, sowohl diskontinuierlich als auch als Durchflussanalyse [2].

### Prinzip

Die Milch wird zuerst geklärt, indem ihre sämtlichen kolloidalen Bestandteile gleichzeitig aufgelöst werden. Danach wird mit den Proteinen ein spezifischer, stabiler Farbkomplex gebildet. Dank der Verwendung ei-

nes sogenannten «kombinierten» Reagens können diese beiden Vorgänge in der Praxis miteinander verbunden werden. Dieses Reagens muss also ein Fett- und Proteinlösungsmittel, im vorliegenden Fall ein Gemisch von Wasser — Natriumhydroxyd — n-Butylamin [3], und einen «Proteinentwickler», im vorliegenden Fall das in alkalischem Milieu stabile Cu(II)komplexon, enthalten. Durch eine kurze Erhöhung der Temperatur kann der Auflösungsprozess der Milch erheblich beschleunigt werden, ohne dass irgendwelche unerwünschten Nebenreaktionen, wie etwa eine Reduktion des Cu(II) zu Cu(I), auftreten.

### Material und Apparaturen

- Reagenzgläser mit Polyäthylen- oder Polypropylenstopfen (eventuell auch ganz neue Gummistopfen) zu 20 ml, Reagenzglasgestell;
- Konstriktionspipette zu 100  $\mu$ l oder automatische Pipetten mit Wegwerfspitze, vom Typ «Eppendorf»<sup>®</sup>, «Oxford»<sup>®</sup>, oder gleichartige;
- Pipettierautomat, von 0 bis 5 ml oder von 0 bis 10 ml regulierbar, vom Typ «Oxford» (S.A. Pipettor<sup>®</sup>) oder «Brand» (Brand-Dispensor<sup>®</sup>) oder gleichartige, versehen mit einer Atemkalkpatrone (zum Beispiel Siegfried, Artikel-Nr. 180300);
- Wasserbad (60 °C);

- Photometer mit Filter oder Monochromator (auf 540 nm eingestellt) mit zwei Küvetten von mindestens 1 cm optischem Weg;
- eventuell: elektrischer Mixer vom Typ «Vortex»<sup>®</sup> oder gleichartig.

### Kombiniertes Reagens

Das einzig erforderliche Reagens besteht aus einer Mischung von:

- 1 Volumen wässriger 0,6 M-Natriumhydroxid-Lösung, puriss. (das heisst 24 g/l);
- 1 Volumen wässriger 0,092 M-Kupfer(II)komplexonatlösung  $\text{Cu}(\text{EDTA})\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (zum Beispiel Siegfried, Artikel-Nr. 165217) (das heisst 40 g/l);
- 3 Volumen n-Butylamin, puriss.

Durch Atemkalk vor der Kohlensäure der Luft geschützt, ist dieses kombinierte Reagens während mehrerer Monate bei Zimmertemperatur haltbar. Es ist zu empfehlen, das Reagens bei der Zubereitung zu filtrieren, sowie regelmässig (mindestens einmal pro Woche), falls es über längere Zeit verwendet werden soll.

### Arbeitsmethode

Einer Milchprobe von 100  $\mu\text{l}$  (Mikropipette) 5 ml des kombinierten Reagens (Pipettierautomat) zugeben. Reaktionsgemisch während zwei Minuten auf 60°C im Wasserbad stehen lassen. Anschliessend 30 Minuten bei Zimmertemperatur warten, bis die Farbreaktion sich vollständig entwickelt hat. Schliesslich Extinktion  $E$  bei 540 nm gegen Wasser messen. Die Blindwerte, bei welchen die 100  $\mu\text{l}$  Milch durch 100  $\mu\text{l}$  destilliertes Wasser ersetzt werden, sind auf dieselbe Art zuzubereiten und zu behandeln. Die Bestimmungen müssen für die Milchproben mindestens im Doppel, für den Blindwert und die Eichlösungen mindestens dreifach ausgeführt werden.

### Eichung und Auswertung der Resultate

Bei der sogenannten Biuretmethode handelt es sich um eine relative Methode, bei der also eine Eichung nötig ist, zum Beispiel eine Bestimmung des Proteinstickstoffes PN nach Kjeldahl (PN = Totalstickstoff TN — Nichtprotein-Stickstoff NPN). Wird für diese Eichung Frischmilch

verwendet, werden gleichzeitig folgende Faktoren berücksichtigt:

- Der Gehalt an Milchzucker und Milchfett trägt teilweise — auf praktisch konstante aber doch zu berücksichtigende Art — zu der bei 540 nm gemessenen Extinktion  $E$  bei (systematischer, dem Matrixeffekt zuzuschreibender Fehler).
- Der Extinktionskoeffizient ist von einem Protein zum anderen unterschiedlich; der für Milch zu verwendende Koeffizient entspricht der mittleren natürlichen Mischung der Caseine und Molkenproteine.

In der Praxis bestehen drei Möglichkeiten, die Eichung mit einer (oder mehreren) Standardmilch(en) durchzuführen:

- a) Eichung mit einer aus möglichst vielen Einzelmilchen bestehenden Mischmilch\*, unverdünnt, mit bekanntem PN-Gehalt, nach dem Dreisatz:

$$\begin{aligned} \text{\% Proteingehalt der Probe} &= \\ &= \frac{E \text{ Probe} - E \text{ Blindwert}}{E \text{ Standard} - E \text{ Blindwert}} \times \\ &\quad \times \text{\% Proteingehalt des Standards} \end{aligned}$$

- b) Eichung mit einer aus möglichst vielen Einzelmilchen bestehenden Mischmilch\* mit bekanntem, möglichst hohem PN-Gehalt in verschiedenen Konzentrationen, zum Beispiel 80% (gemischt mit 20% Wasser), 90% (gemischt mit 10% Wasser) und 100% (ohne Wasser). Die Bestimmung erfolgt sodann durch Interpolation oder Extrapolation.

- c) Eichung mit einer Serie individueller, unverdünnter Milchen, mit bekannten, möglichst unterschiedlichen PN-Gehalten. Die Berechnung geschieht in diesem Falle durch lineare Regression. Für diese letzte Methode sind Zeit- und Arbeitsaufwand etwas grösser, dafür erzielt man genauere Resultate.

Um den PN-Gehalt der zur Eichung verwendeten Milchen nicht bei jeder Analysenserie neu bestimmen zu müssen, werden diese tiefgekühlt aufbewahrt.

### Anwendungen

Die in vorliegender Arbeit vorgeschlagene Methode zur Gesamtpro-

\* z. B. uperisierte Milch aus dem Handel

teinbestimmung kann verwendet werden für:

- Rohmilch, frisch oder tiefgekühlt
- homogenisierte Vollmilch (pasteurisiert oder UHT)
- teilweise entrahmte Milch (Typ «Drink») oder ganz entrahmte Milch (ungeachtet eventueller Homogenisierungen oder Hitzebehandlungen).

Voruntersuchungen deuten darauf hin, dass diese Methode wahrscheinlich auch auf folgende Produkte anwendbar ist:

- Kondensmilch ungezuckert, auf die ursprüngliche Konzentration von Milch verdünnt;
- Vollmilchpulver und Magermilchpulver, aufgelöst und auf die ursprüngliche Konzentration von Milch verdünnt.

Für die Zubereitung der Eichlösungen verwendet man ungezuckerte Kondensmilch, respektive ein analoges Milchpulver.

Auch andere Milchprodukte könnten in Frage kommen, sofern sie keine Zusätze enthalten, die die Färbungsreaktion der Proteine verfälschen könnten.

### Konservierungsmittel

Der Einfluss von Konservierungsmitteln wurde nicht geprüft, da die verwendeten Proben immer im Tiefkühlschrank aufbewahrt wurden. Auf jeden Fall müssen Konservierungsmittel mit Farbzusätzen (zum Beispiel Kaliumbichromat) und solche, die in einem alkalischen Milieu hydrolysierten (zum Beispiel Sublimat) vermieden werden. Natriumazid könnte in Betracht gezogen werden.

### Statistische Auswertung der Methode

Reproduzierbarkeit (Präzision der Messungen): gleich oder besser als 1% relativ; Genauigkeit: hängt von der Qualität der Eichung ab (gleich oder besser als 2,5% relativ);

Korrelationskoeffizient mit der Kjeldahl-Methode (PN = TN — NPN):  $r = 0,95$  (errechnet für eine Serie von Parallelanalysen mit 120 verschiedenen Milchen)

### Verdankungen

Die Autoren möchten Herrn Professor Dr. E. Plattner («Institut de génie

chimique de l'école polytechnique fédérale de Lausanne») für seine aktive Beteiligung am Studium, an der Entwicklung und der endgültigen Ausarbeitung dieser Methode bestens danken. Fr. Y. Sieber sei an dieser Stelle für ihre wertvolle Hilfe bei der Bearbeitung der deutschen Übersetzung ebenfalls gedankt.

#### Literaturverzeichnis

- [1] Bosset, J. O., Blanc, B. et Plattner, E.: Le dosage des protéines du lait et de ses principaux dérivés: méthodes et appareillages tirés de la littérature parue entre 1964 et 1974 (revue analytique). *Trav. chim. aliment. hyg.* **67**, 226—261 (1976).
- [2] Bosset, J. O., Blanc, B. et Plattner, E.: Nouvelle méthode de dosage photométrique automatique des protéines dans le lait entier.
- Part. I Bases théoriques et optimisation des principaux paramètres de la réaction. *Anal. Chim. Acta* **70**, 327—339 (1974)
- Part. II Linéarité, sélectivité, spécificité. *Ibidem* **71**, 97—105 (1974)
- Part. III Application à l'analyse en flux continu. *Ibidem* **77**, 343—354 (1975).
- [3] Bosset, J. O., Blanc, B. et Plattner, E.: La dissolution intégrale du lait entier au moyen de solvants mixtes.
- I. Etude du mélange dissolvant: eau — hydroxyde de sodium — n-butylamine
- Trav. chim. aliment. hyg.* **68**, 225—239 (1977)

#### Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird eine Anpassung der sogenannten «Biuret-Methode» zur routinemässigen Bestimmung des Gesamtproteingehaltes von Milch und einigen Milchprodukten beschrieben. Die neuartige Methode basiert auf der gleichzeitigen Auflösung aller für die Trübung der Milch verantwortlichen, kolloidalen Bestandteile und auf der Bildung eines für die Peptidbindung der Proteine spezifischen, stabilen und löslichen Farbkomplexes. Die vollständige Auflösung der kolloida-

len Bestandteile wird durch einen Zusatz eines Lösungsmittelgemisches, bestehend aus wässriger Natronlauge und n-Butylamin, erreicht. Die Farbreaktion erfolgt mit dem im Lösungsmittelgemisch enthaltenen Kupfer(II)komplexonate. Die vorgeschlagene Methode ist einfach und rasch durchführbar, da alle notwendigen Reagenzien auf einmal, in Form eines «kombinierten» Reagens beigefügt werden können. Die Färbung wird photometrisch nach einer gewissen Reaktionszeit bei 540 nm gemessen. Diese vor allem für kleine und mittlere Laboratorien und Betriebe (Molkereien, Käsereien usw.) geeignete Methode erfordert keine kostspielige Ausrüstung. Sie ist präzise und liefert mit der Kjeldahl-Methode gut übereinstimmende Resultate: Der relative Fehler ist kleiner als 1% und der Korrelationskoeffizient mit der Kjeldahl-Methode beträgt 0,95. Die beschriebene Methode eignet sich gut zur Mechanisierung oder Automatisierung.

#### Résumé

#### Nouvelle méthode simple et économique destinée au dosage de routine des protéines du lait et de quelques produits laitiers

Le présent travail propose une adaptation de la méthode dite «du biuret» au dosage de routine des protéines totales du lait et de quelques produits laitiers. Cette nouvelle méthode est basée sur une dissolution simultanée de tous les composants colloïdaux responsables de l'opacité de ces produits et sur la formation d'un complexe coloré soluble, spécifique et stable avec les liaisons peptidiques des protéines; la clarification de ces milieux est obtenue par l'emploi d'un mélange d'une solution aqueuse de soude caustique et de n-butylamine, la réaction de coloration, par l'emploi de complexonate de Cu(II) en milieu fortement alcalin. La méthode de dosage proposée est simple et rapide, puisque tous les réactifs nécessaires peuvent être ajoutés en

une seule fois sous la forme d'un «réactif combiné». Après un certain temps de réaction, il suffit de mesurer l'extinction obtenue à 540 nm. Destinée tout particulièrement aux petits et moyens laboratoires (laiteries, fromageries, etc.), cette méthode ne nécessite aucun appareillage coûteux, mais uniquement du matériel courant. Elle est précise (erreur relative <1%) et concorde bien avec la méthode de Kjeldahl (coefficient de corrélation = 0,95). Elle est en outre aisée à mécaniser ou à automatiser.

#### Summary

#### A new, simple and economic method for routine determination of protein content of milk and some milk products

An adaptation of the so called biuret method for the routine determination of total protein content of milk and of some milk products is described. This new method is based on the simultaneous solubilisation of all the colloidal components responsible for the opacity of these products and on the formation of a coloured, specific, soluble and stable complex with the peptide bonds of proteins. The clarification of the products is achieved by the use of a mixture of an aqueous solution of sodium hydroxyde and n-butylamine; the color reaction is obtained by the use of Cu(II) · EDTA · Na<sub>2</sub> in strongly alkaline solution. The proposed method is simple and rapid, since all the necessary reagents may be added together in the form of a «combined reagent». After a defined reaction time, the optical density of the solution is measured at 540 nm. This method does not need any expensive equipment; it is thus of particular interest to small dairies and cheese factories. The results obtained are reproducible (relative error <1%) and agree well with those obtained using the Kjeldahl method (correlation coefficient = 0,95). It can easily be mechanised or automated.

