



GERMANY

Deutsches Nationalkomitee
im Internationalen
Milchwirtschaftsverband - IDF

Verband der Deutschen
Milchwirtschaft e. V. - VDM

Jägerstraße 51
10117 Berlin-Mitte

Tel.: +49-30-206-489-600
Fax: +49-30-206-489-620
info@idf-germany.com
www.idf-germany.com

Neues IDF-Faktenblatt zur Proteinbestimmung

Eiweiß gehört neben Fett, Laktose und Wasser zu den Hauptbestandteilen von Milch. Proteine setzen sich aus einzelnen Aminosäuren zusammen, die durch Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Es gibt 20 verschiedene Aminosäuren, die den meisten Lebewesen gemeinsam sind. Die verschiedenen Eiweißmoleküle sind zu komplexen Strukturen gefaltet und erfüllen in Trinkmilch eine Reihe von Funktionen.

Proteine sind ein wichtiger Bestandteil des Nährwertes von Milch, wobei Trinkmilch normalerweise einen Eiweißgehalt von 3,5% hat. Milchproteine werden auf der Grundlage ihrer relativen Löslichkeit in Casein (das in Form kolloidaler Partikel vorkommt) und Molkenproteine unterteilt.

Es gibt vier verschiedene Caseine (α 1-, α 2-, β - und κ -Casein), und diese machen rund 80% des Gesamtproteingehalts der Milch aus. Molkenprotein setzt sich im Wesentlichen aus den vier Proteinen α -Lactoalbumin, β -Lactoglobulin, Bovines Serumalbumin und Immunglobulinen zusammen, die insgesamt rund 20% des Gesamtproteingehalts der Milch betragen. Neben diesen Hauptproteinen gibt es noch zahlreiche Minorproteine.

Die Bestimmung des Proteingehalts in Milch und Milcherzeugnissen ist ein wichtiges Verfahren, auf das sich der internationale Handel mit Milch und Milcherzeugnissen stützt. Wichtig ist die Unterscheidung zwischen Methoden zur Bestimmung der Proteinqualität für Ernährungszwecke und chemisch definiertem Eiweiß. Das vorliegende Faktenblatt befasst sich ausschließlich mit Letztgenannten.

Die Methoden zur Eiweißbestimmung in Milch können weitgehend in drei Arten unterteilt werden:

1. Bestimmung des Gesamtstickstoffgehalts
2. Direkte Proteinbestimmung
3. Indirekte Proteinbestimmung¹

Jede dieser drei Methoden hat Vor- und Nachteile; alle Methoden werden derzeit routinemäßig eingesetzt.

Bestimmung von Gesamtstickstoff

Stickstoff ist ein wichtiger Bestandteil des Eiweißes und jedes Protein hat einen bestimmten Stickstoffgehalt. Seit mehr als 100 Jahren ermitteln die Lebensmittelchemiker den Eiweißgehalt in Lebensmitteln, indem sie den Gesamtstickstoffgehalt bestimmen und dann den Eiweißgehalt unter Anwendung eines geeigneten „Stickstoff-Umrechnungsfaktors“ errechnen. Dieser Faktor wird nach der Stickstoffmenge in der Aminosäuresequenz bestimmt.



Die Analysemethode zur Bestimmung des Gesamtstickstoffgehalts kann entweder durch Aufschluss oder alternativ durch Verbrennen der Probe erfolgen, um den Stickstoff als Messgröße aus den Proben zu extrahieren und zu bestimmen. Der Gesamt-Stickstoffgehalt wird in Rohprotein umgerechnet, wobei ein Stickstoff-Umrechnungsfaktor von 6,38 für Milcheiweiß und 6,25 für Säuglingsanfangsnahrung auf Milchbasis verwendet wird. Den

wahren Proteinstickstoff erhält man, wenn man vom Gesamt-Stickstoffgehalt den Stickstoffgehalt eines mit Trichloressigsäure behandelten Proben-Filtrats abzieht. Das Ergebnis (der wahre Proteinstickstoff) wird mit dem Umrechnungsfaktor (6,38) multipliziert und ergibt den wahren Proteingehalt.

Die so genannte Kjeldahl-Methode und die Dumas-Methode, die beide geltende internationale Standards sind, verwenden die Ansätze des chemischen Aufschlusses bzw. der Verbrennung. Die Vorteile dieser Methoden sind ihre hohe Zuverlässigkeit und Genauigkeit. Ein Nachteil ist, dass sie eine spezielle Laborausstattung und geschultes Laborpersonal erfordern und daher in der Durchführung teuer und zeitaufwändig sind. Bei der Anwendung dieser Methoden werden rund 95% des Stickstoffgehalts in Milch als Proteine nachgewiesen und der Rest als Nicht-Protein-Stickstoffquellen wie zum Beispiel Harnstoff-Stickstoff.

Direkte Proteinbestimmung

Neben der Ermittlung des Gesamt-Stickstoffgehalts ist es auch möglich, bestimmte Proteinbestandteile quantitativ zu bestimmen. Es stehen verschiedene Methoden für die Bestimmung von Proteinbestandteilen zur Verfügung.

- a) Bei Farbstoffbindungsassays werden Farbstoffe verwendet, die sich spezifisch an Proteine binden. Der Proteingehalt wird bestimmt, indem man die Farbintensität des Farbstoffs misst, die von der Proteinkonzentration abhängt.
- b) Chromatographische Methoden beinhalten die Trennung der intakten Proteine nach ihren physikalischen Eigenschaften wie Größe, elektrische Ladung oder ihren hydrophoben/hydrophilen Eigenschaften um danach die entsprechenden relativen Mengen zu messen. Es steht eine Reihe von verschiedenen Arten von chromatographischen Methoden zur Verfügung, wie zum Beispiel die Größenausschlusschromatographie, die Ionenaustauschchromatographie und die Reversed-Phase-Chromatographie. Sobald die Proteine getrennt sind, kann man sie auf unterschiedliche Art und Weise bestimmen, z.B. indem UV-Detektoren, Fluoreszenz-Detektoren oder Detektoren bei der Massenspektroskopie verwendet werden. Die Kalibrierung mit geeigneten, am Markt verfügbaren Proteinstandards ermöglicht die Quantifizierung.

Es besteht auch die Möglichkeit, einzelne Aminosäuren mit Hilfe der Chromatographie nach einem gründlichen chemischen Aufschluss der intakten Proteine zu quantifizieren. Wenn man den Anteil von ausgewählten Marker-Aminosäuren verwendet, die nachweislich häufiger in Casein oder Molkeneiweiß vorkommen, kann der Gehalt an Molke und Casein von Milch und Milcherzeugnissen geschätzt werden.



- c) Die Elektrophorese ist die Auftrennung von Proteinen durch Ladung, die in einem elektrischen Feld erfolgt. Um sicherzustellen, dass basische und saure Proteine im elektrischen Feld in die gleiche Richtung wandern, werden die Proteine in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) hitzedenaturiert. SDS bindet an die hydrophoben Teile des Proteins, die der Denaturierung ausgesetzt sind, und dies führt im Prinzip bei jedem Protein zu einem weitgehend gleichen Verhältnis zwischen negativer Ladung und Molekularmasse. In einem Polyacrylamidgel legt also jedes Protein nach dem Anlegen eines elektrischen Feldes eine Strecke zurück, die durch seine Molekularmasse bestimmt ist. Nach der Trennung werden die einzelnen Proteinbande durch Farbstoffbindungen quantifiziert.
- d) Die Immunologie beruht auf der Verwendung der Wechselwirkung zwischen einem Antigen und seinem entsprechenden Antikörper. Diese Methodik eignet sich sehr gut für die Quantifizierung von Minorproteinen. Damit die Genauigkeit für jede von diesen Methoden sichergestellt ist, sind geeignete stabile Proteinstandards wichtig. Diese sind am Markt verfügbar und ein robustes Qualitätssicherungsverfahren ist wesentlich, um die Genauigkeit bei jeder Analysenmethodik für Proteine dauerhaft zu gewährleisten.

Indirekte Methoden zur Bestimmung des Proteingehalts

Spektroskopische Methoden können schnell und kostengünstig in einer Produktionsumgebung durchgeführt werden; zur Sicherstellung der Einheitlichkeit sollte die Kalibrierung allerdings auf ein chemisches Verfahren oder eine Referenzmethode gestützt sein. Dank robuster und gut validierter ISO/IDF-Standardverfahren, wie sie im Quellenverzeichnis aufgeführt sind, ist ihre Verankerung in validierten Referenzassays bei bestimmten Produkten möglich. Die Nah-Infrarot und Mittel-Infrarot-Spektroskopie werden weithin sowohl bei flüssigen als auch festen Milcherzeugnissen gleichermaßen in Produktionslaboren und unabhängigen Prüflaboren eingesetzt.

Quelle: IDF Fact Sheet, Mai 2013

Quellenverzeichnis:

1. ISO 8968-1/2|IDF 020-1/2- Milk - Determination of nitrogen content - Part 1/2: Determination of nitrogen content using the Kjeldahl method.
2. ISO 17997-2|IDF 029-2:2004 - Milk - Determination of the casein-nitrogen content - Part 2: Direct method
3. ISO 8968-4|IDF 020-4:2001 - Milk - Determination of nitrogen content - Part 4: Determination of non-protein-nitrogen content.
4. ISO 17997-1|IDF 029-1:2004 - Milk - Determination of the casein-nitrogen content - Part 1: Indirect method
5. IDF Standard 185: 2002(E), ISO 14891:2002(E). Milk and Milk Products. Determination of Nitrogen Content Routine Method by Combustion According to the Dumas Principle.