Eiweißbestimmung mit Sprint™

Methodenerstellung und Validierung von Käse

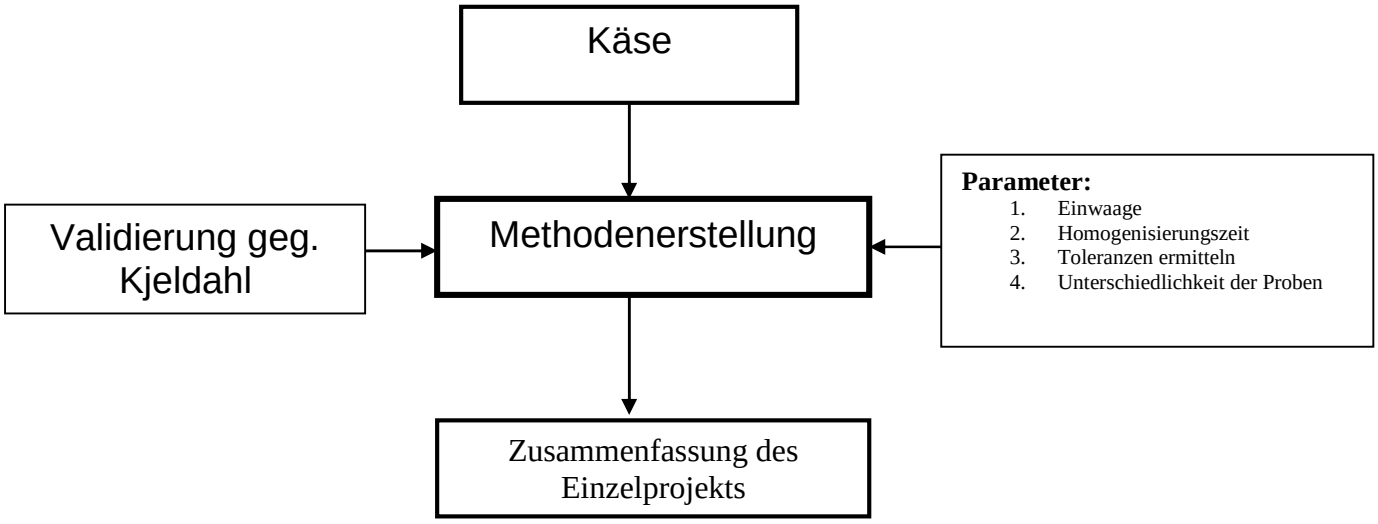
von Mag. Agnes Wolf

Inhaltsverzeichnis

1 Zielsetzung 3
1.1 Käse 4
2 Methoden 5
2.1 Bestimmung des Eiweißgehaltes in Fleisch- und Fleischerzeugnissen: 5
Kurzbeschreibung 5
2.1.1 Chemikalien 5
2.1.2 Geräte und Hilfsmittel 5
2.1.3 Probenahme und Probenvorbereitung 6
2.1.4 Auswertung 7
Berechnung 7
2.1.5 Literatur 7
2.2 Bestimmung des Eiweißgehaltes mit dem „Sprint“ 8
3 Ergebnisse: 9
3.1 Eiweißbestimmung anhand der Kjeldahl-Methode: 9
3.2 Optimierung der Einwaage: 10
3.3 Erstellen der Referenzgerade durch Aufnehmen von 4 Referenzen zur 10
3.4 Vergleich Eiweißbestimmung Kjeldahl mit Sprint: 11
4 Rohdaten: 12
4.1 Eiweißbestimmung anhand der Kjeldahl-Methode: 12
4.2 Erstellen der Referenzgerade durch Aufnehmen von 4 Referenzen zur 13
4.3 Eiweißbestimmung durch Sprint: 14

1 Zielsetzung

Im Rahmen dieses Projekts wird ein neues Verfahren zur Bestimmung des Proteingehalts angestrebt. Im Sprint™ wird für die Bestimmung des Proteingehaltes ein biochemische Methode genutzt (siehe unter Methoden). Es wird zunächst versucht die Proteinbestimmung von Brühwürsten zu optimieren und die Ergebnisse dieser Bestimmung mit jener der Standardmethode Kjeldahl zu vergleichen.



Darstellung 1: Zusammenfassung der Arbeitsschritte anhand eines Flußdiagramms.

1.1 Käse

.

Es wurden folgende Käsesorten verwendet:

Käsesorten	Probennummer
Tilsiter	1
Holländer	2
Toastkäse	3
Schafskäse	4

Tabelle 1.1 Verwendete Käsesorten

2 Methoden

Die unten beschriebene Methode wurde nach LMBG § 35 modifiziert.

2.1 Bestimmung des Eiweißgehaltes in Fleisch- und Fleischerzeugnissen:

Unter dem **Rohproteingehalt** wird der nach dem hier beschriebenen Verfahren nach Kjeldahl ermittelte Stickstoffgehalt multipliziert mit dem Faktor 6,25 verstanden. Er wird in g/100g der Probe angegeben.

Kurzbeschreibung

Der organisch gebundene Stickstoff wird mit konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz eines Katalysatorgemisches oxidativ aufgeschlossen. Aus dem entstandenen Ammoniumsulfat wird der durch NaOH-Zusatz freigesetzte Ammoniak mit Hilfe einer Wasserdampfdestillation in eine borsäurehältige Vorlage übergetrieben und mit Salzsäure-Maßlösung titrimetrisch bestimmt.

2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, sind analysenreine Chemikalien zu verwenden.
Unter „Lösung“ ist immer eine wässrige Lösung zu verstehen.

Das Wasser muss entweder destilliert oder von entsprechender Reinheit sein.

Selen- und quecksilberfreier Titandioxid-Katalysator (Kjeldahl Tabletten)
Eine Tablette (5 g) bestehet aus 1,8% Titandioxid, 2,8% Kupfersulfat (wasserfrei) und 95,4% Kaliumsulfat, Merck

Schwefelsäure
(Massenanteil: w = etwa 98%) geeignet zur Stickstoffbestimmung, Merck

Natriumhydroxid-Lösung
stickstofffrei (Massenkonzentration: ρ = mind. 32 g/100 ml, Merck)

gesättigte Lösung von Borsäure (reinst), Merck

Mischindikator von Merck (Nr. 1.06130.0250)

Salzsäure-Maßlösung
(Stoffmengenkonzentration: c=0,1 mol/l; 0,1N), Merck

2.1.2 Geräte und Hilfsmittel

Wägeschiffchen
aus stickstofffreiem Pergamentpapier oder anderem zur Stickstoffbestimmung geeignetem Material, Schleicher und Schüll

Kjeldahl-Aufschlußkolben

entsprechend der verwendeten Apparatur, Büchi

Intensivheizgerät
Heizblock, Digestion Unit K-435, Büchi

Apparatur für die Stickstoffbestimmung
Büchi, Destillation Unit 324, Fa. Büchi

Bürette
Brand, 50ml

500 ml Standkolben

Präzisionswaage
AB204-S/M von Mettler-Toledo

2.1.3 Probenahme und Probenvorbereitung

Die Fleisch- und Fleischerzeugnisproben werden mechanisch homogenisiert.

2.1.3.1 Durchführung

Beim Arbeiten mit konzentrierter Schwefelsäure müssen Labormantel, Handschuhe und Schutzbrille getragen werden.

2.1.3.2 Vorbereitung der Probe

Vor der Analyse soll die Probe Zimmertemperatur haben. Ein vorheriges Durchrühren von Hand ist erforderlich.

2.1.3.3 Bestimmung

In ein Wägeschiffchen werden etwa 2 g der gut homogenisierten Probe auf 1 mg genau eingewogen. Das Schiffchen wird in einen Kjeldahl-Aufschlußkolben gegeben. Dann werden 20 ml Schwefelsäure und eine Kjeldahltablette zugesetzt und zur Oberflächenvergrößerung kräftig geschüttelt. Anschliessend wird der Kolbeninhalt zunächst vorsichtig (Stufe 5-6), dann kräftiger auf 400 bis 410°C erhitzt. (Anmerkung: ist erreichbar mit Stufe 8 bis 10.)
Der Aufschluss ist beendet, wenn die Lösung klar und grün geworden ist. Nachdem der Kolbeninhalt auf 50 bis 60°C abgekühlt ist, wird der Kolben in die Kjeldahlapparatur eingesetzt . In einen 500ml Standkolben werden 2 Tropfen Indikator gegeben. Der so beschickte Kolben wird unter den Kühlerauslauf der Apparatur für die Stickstoffbestimmung gestellt. Die Destillation wird mit der Methode 4 durchgeführt.
Zunächst wird die Probe mit 50 ml Wasser verdünnt, weiters werden in den Titrierkolben 60ml Borsäure vorgelegt, wobei darauf zu achten ist, dass der Auslauf in die Borsäure eintaucht. Anschließend wird die verdünnte Probenlösung mit Natronlauge im Überschuss (etwa 90 ml) versetzt. Nach der Durchmischung muss ein deutlicher Überschuss an Natronlauge, erkennbar

an der Farbkonstanz der Lösung, vorhanden sein. Der durch die NaOH freigesetze Ammoniak wird mittels Wasserdampf überdestilliert und in der borsäurehältigen Vorlage aufgefangen. Auf Kühlung ist zu achten, da sich die Vorlage bei der Destillation nicht erwärmen darf. Nach 5 Minuten ist die Destillation beendet und die Probe kann nach Ertönen eines akustischen Signals aus der Apparatur entnommen werden.
Nach Abspülen des Kühlerauslaufs mit Wasser in die Vorlage wird mit Salzsäure (0,1 mol/l entspricht 0,1 N) bis zum Farbumschlag über grün nach rosa titriert.

2.1.4 Auswertung

Berechnung

Der Gesamtstickstoffgehalt in % (entspricht g/100g Probe) wird nach folgender Gleichung berechnet:

% Stickstoff = (V * 0,0014007 * 100) / m

V Verbrauch an 0,1N HCl in ml
m Probeneinwaage in g

Das Ergebnis wird auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet angegeben.

Der Rohproteingehalt in % wird nach folgender Gleichung berechnet:

% Eiweiss = % Stickstoff * 6,25

Das Ergebnis wird auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet angegeben.

2.1.5 Literatur

1.Amtliche Methodensammlung von Untersuchungsverfahren nach Paragraph 35 LMBG, Herausgeber: Bundesgesundheitsamt, Beuth-Verlag, Loseblattsammlung, L 06.00-7

2.2 Bestimmung des Eiweißgehaltes mit dem „Sprint“

1. Erstellen einer neuen Methode:

- vom Hauptmenü ausgehend „**Service mode**“ aktivieren“
- in Edit/Create Method entsprechenden Ordner auswählen (ANALYTICUM)
- **Neue Methodenamen** über Tastatur eingeben, Buchstaben mit „Enter“ aktivieren;

- Methodennamen akzeptieren

- Entsprechende **Parameter** (entsprechend Material) eingeben:

Material	Solid
Homogenize Speed	30.000
Homogenize Time	90
Filter high	normal
Delay time	0
Settling time	90
Min Weight	0,7
Max Weight	0,8
Min Protein	16
Max Protein	30
Bias	0

- mit **ADD** (auf der rechten Seite) entsprechende Referenzen eingeben (üblich **2 bis 3** Standards mit unterschiedlichen Eiweißgehalt!)

- mit **ADD** (unterhalb) - Aufnehmen von Messungen der Referenzproben (üblich sind **3 Wiederholungen**!)

2. Messung des Proteingehaltes

- Filter einlegen
- Probenbecher auf die externe Waage stellen
- Tarieren des Probenbechers
- Entsprechendes Probenvolumen hineingeben (Vorsicht: Probenmaterial darf nicht am Rand des Bechers kleben – falsche Messung!)
  Weiters **WICHTIG**: für einen erwarteten Proteingehalt von 12 % sollten nicht mehr als 1 Gramm eingewogen werden!!
- Eine Eiweißbestimmung dauert in etwa 3 Minuten;
- Die Speicherung erfolgt automatisch

3 Ergebnisse:

3.1 Eiweißbestimmung anhand der Kjeldahl-Methode:

Die Durchführung erfolgte wie unter **Methoden** beschrieben.

Käse	Eiweißgehalt in %	
	MW [%]	StabW
Toastkäse	16,02	± 0,13
Schafskäse	20,41	± 0,11
Tilsiter	29,59	± 0,21
Holländer	29,94	± 0,15

Tabelle 3.1 Mittelwert und Standardabweichung der Eiweißbestimmung nach der Kjeldahlmethode.

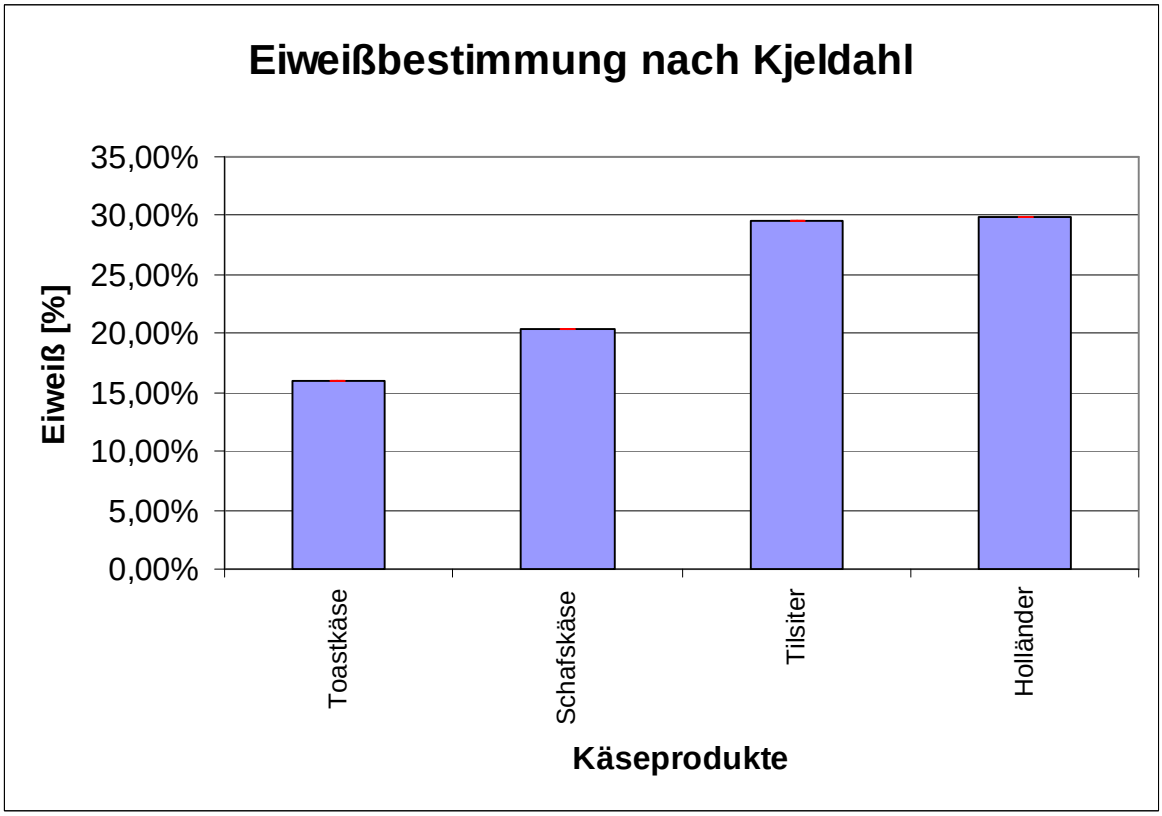


Diagramm 2: Eiweißbestimmung der verschiedenen Käsesorten.

3.2 Optimierung der Einwaage:

Als optimale Einwaage wurde zunächst 0,7 bis 0,9 Gramm angenommen. Es stellte sich im Rahmen der Messungen eine optimale Einwaage von **0,7** bis **0,8** Gramm dar.

3.3 Erstellen der Referenzgerade durch Aufnehmen von 4 Referenzen zur Eiweißbestimmung mit Sprint*:*

Für die Kalibrierung wurden 4 Referenzproben verwendet. Es wurden bei jeder Probe 3 Messungen durchgeführt. Weiters konnte durch Auswahl bestimmter Werte (Signal/Masse) ein r^2 von **0,9991** erzielt werden.

Wurstart	Probennummer	Eiweiß [%]	MW
Toastkäse	1	**16,02%**	0,8024
Schafskäse	2	**20,41%**	0,8971
Tilsiter	3	**29,57%**	1,2140
Holländer	4	**29,94%**	1,2440

Tabelle 3.6.1: Mittelwert der erhaltenen Signale um Kalibrierung zu erstellen.

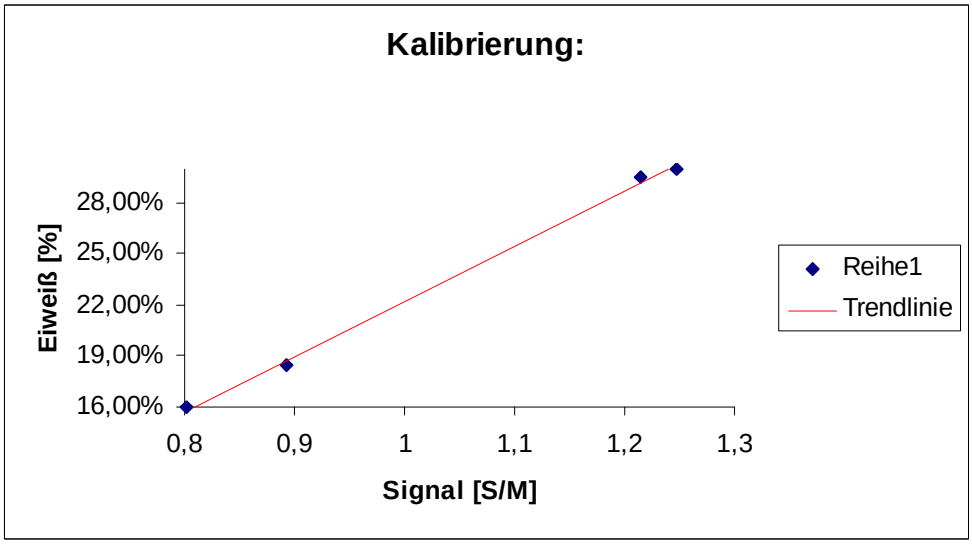


Diagramm 4: Kalibrierung für die Eiweißbestimmung.

3.4 Vergleich Eiweißbestimmung Kjeldahl mit Sprint:

Käseart	Kjeldahl Eiweiß MW [%]	StabW	Sprint Eiweiß MW [%]	StabW
Toastkäse	**16,02**	± 0,13	**16,13**	± 0,01
Schafskäse	**20,41**	± 0,11	**20,60**	± 0,19
Tilsiter	**29,59**	± 0,21	**29,36**	± 0,04
Sorte 4	**29,94**	± 0,15	**29,83**	± 0,14

Tabelle 3.7.1: Vergleich der Mittelwerte der Eiweißbestimmung Sprint mit Kjeldahl.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, konnten vergleichbare Werte erzielt werden.

4 Rohdaten:

4.1 Eiweißbestimmung anhand der Kjeldahl-Methode:

Käseart	Probennummer	Messung	Eiweißgehalt [%]
Toastkäse	Probe 3	1	16,15
		2	15,89
		MW [%]	**16,02**
		s [%]	**± 0,13**
Tilsiter	Probe 1	1	29,8
		2	29,37
		MW [%]	**29,59**
		s [%]	**± 0,21**
Schafskäse	Probe 4	1	20,25
		2	20,57
		MW [%]	**20,41**
		s [%]	**± 0,11**
Holländer	Probe 2	1	29,79
		2	30,08
		MW [%]	**29,94**
		s [%]	**± 0,15**

Tabelle 4.1: In dieser Tabelle sind die Rohdaten der Eiweißbestimmung durch die Kjeldahl-Methode angeführt.

4.2 Erstellen der Referenzgerade durch Aufnehmen von 4 Referenzen zur Eiweißbestimmung mit Sprint:

Erstellen der Referenzwerte:

Käseart	Probennummer	Eiweiß[%]	Signal/Masse	Einwaage
Schafskäse	Probe 4	**20,41%**	*0,8852	0,6992
			*0,9090	0,7148
Toastkäse	Probe3	**16,02%**	*0,7897	0,7586
			*0,8012	0,7658
			*0,8163	0,7851
Tilsiter	Probe1	**29,59%**	*1,2176	0,7292
			*1,2134	0,7372
			*1,2103	0,7299
Holländer	Probe 2	**26,94%**	*1,2686	0,7709
			*1,2214	0,7122
			*1,2413	0,7352

Tabelle 4.2: Erstellung der Referenzwerte für die Eiweißbestimmung

4.3 Eiweißbestimmung durch Sprint:

Käseart	Probennummer	Messung	Eiweißgehalt [%]
Toastkäse	Probe 3	1	16,14
		2	16,13
		3	16,12
		MW [%]	**16,13**
		s [%]	**± 0,01**
Schafskäse	Probe 4	1	20,87
		2	20,46
		3	20,46
		MW [%]	**20,60**
		s [%]	**± 0,19**
Tilsiter	Probe 1	1	29,31
		2	29,39
		3	29,39
		MW [%]	**29,36**
		s [%]	**± 0,16**
Holländer	Probe 2	1	29,86
		2	29,80
		3	29,63
		MW [%]	**29,83**
		s [%]	**± 0,14**

Tabelle 4.3: In dieser Tabelle sind die Rohdaten der Eiweißbestimmung durch Sprint angeführt.