

Bestimmung des Molkenprotein- und Caseinanteils am Gesamtprotein von Milch und Milchprodukten

Elektrophoretisches Verfahren

DIN
10472

ICS 67.100.10

Deskriptoren: Milch, Milchprodukt, Casein, Molkenprotein, elektrophoretisches Verfahren

Determination of casein and whey protein contents
of milk and milk products — Electrophoretic method

Détermination de la teneur en caséines et en protéines
du sérum dans le lait et les produits laitiers — Méthode électrophorétique

Vorwort

Diese Norm wurde vom Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte, Arbeitsausschuß "Chemische und physikalische Milchuntersuchung", erarbeitet.

Anhang A und Anhang B sind informativ.

Die mit diesem elektrophoretischen Verfahren erhaltenen Ergebnisse sind mit den nach DIN 10464 (Casein-Phosphor-Verfahren) oder DIN 10466 (Polarographisches Verfahren) ermittelten Ergebnissen vergleichbar.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein elektrophoretisches Verfahren zur Bestimmung des Casein- und Molkenproteinanteils am Gesamtprotein fest.

Es ist für Milch, Speisequark, Milchpulver, Casein und Caseinat anwendbar.

2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation.

DIN 10327

Milch und Milchprodukte — Probenahmetechnik

DIN ISO 5725

Präzision von Meßverfahren — Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision von festgelegten Meßverfahren durch Ringversuche;
Identisch mit ISO 5725 : 1986

3 Definitionen

Für die Anwendung dieser Norm gelten folgende Definitionen:

3.1 Caseinanteil am Gesamtprotein

Der Caseinanteil am Gesamtprotein von Milch bzw. Milchprodukten ist der mit dem elektrophoretischen Verfahren bestimmte Massenanteil an Substanzen, angegeben in %.

3.2 Molkenproteinanteil am Gesamtprotein

Der Molkenproteinanteil am Gesamtprotein von Milch bzw. Milchprodukten ist der mit dem elektrophoretischen Verfahren bestimmte Massenanteil an Substanzen, angegeben in %.

4 Kurzbeschreibung des Verfahrens

Die Bestimmung des Molkenprotein- bzw. Caseinanteils am Gesamtprotein erfolgt mit einer Natriumdodecylsulfat(SDS)-Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Die Probe wird mit SDS-Lösung und Dithiothreitol-Lösung versetzt und in kochendem Wasser inkubiert. Dabei entstehen SDS-Protein-Komplexe, die sich im elektrischen Feld wie Anionen verhalten. Die Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel mit geringer Porengröße führt zu einem Molekularsiebeffekt, wobei die Proteine entsprechend der unterschiedlichen Molekülgröße voneinander getrennt werden. Aufgrund ihrer geringeren Molekülgröße wandern die Molkenproteine schneller als die Caseine. Durch Verwendung von Porengradientengelen werden nach Anfärbung des Elektropherogramms scharf voneinander abgegrenzte Proteinbanden erhalten. Diese Proteinbanden werden durch densitometrische Messung quantitativ ausgewertet, wobei sich der Molkenproteinanteil aus den Peakflächen der β -Lactoglobulin- und α -Lactalbumin-Bande im Verhältnis zu den Peakflächen von α -, β - und κ -Casein ergibt.

Fortsetzung Seite 2 bis 7

Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

5 Chemikalien

Es sind analysenreine Chemikalien zu verwenden. Das verwendete Wasser muß destilliert oder mindestens von entsprechender Reinheit sein.

ANMERKUNG: Bei Verwendung von geeigneten, im Handel erhältlichen, gebrauchsfertigen Gelträgerfolien¹⁾ mit Probeaufnahmekamern sowie gebrauchsfertigen Pufferstreifen für die Anode und die Kathode werden die unter 5.1, 5.2 und 5.4 bis 5.6 aufgeführten Chemikalien bzw. Lösungen nicht benötigt.

5.1 Dichlordimethylsilan-Lösung

2%ige Lösung in 1,1,1-Trichlorethan ($C_2H_3Cl_3$)

5.2 Polyacrylamidgele

Achtung:

Acrylamide sind als Monomere neurotoxisch. Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut muß vermieden werden. Die Aufnahme erfolgt auch durch unverletzte Haut, so daß unbedingt Einmalhandschuhe zu tragen sind.

Deshalb sollten anstelle der Einwaagen der Acrylamide kommerziell erhältliche Acrylamid-Fertiglösungen verwendet werden. Lösungen mit Massenanteilen von 30 % Acrylamiden (Massenverhältnis 97 % Acrylamid und 3 % N,N'-Methylen-bis-acrylamid(BIS)) sind geeignet.

Reste von Acrylamiden sind mit einem Überschuß von Ammoniumperoxydisulfat (siehe 5.5) zum Auspolymerisieren versetzt.

5.2.1 Gelstammlösung

29,1 g Acrylamid (C_3H_5NO) und 0,9 g N,N'-Methylenbis-acrylamid werden in einem 100-ml-Becherglas in etwa 80 ml Wasser unter Rühren (Magnetrührer, siehe 6.8) gelöst. Die Lösung wird in einen 100-ml-Meßkolben übergeführt, bis zur Marke aufgefüllt und nach dem Mischen über ein Faltenfilter filtriert.

5.2.2 Trenngel-Pufferlösung

9,8 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan ($C_4H_{11}NO_3$), 0,215 g Natriumdodecylsulfat ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) und 5 mg Natriumazid (NaN_3) werden in einem 100-ml-Becherglas in etwa 40 ml Wasser unter Rühren (Magnetrührer) gelöst und der pH-Wert mit verdünnter Salzsäure c (HCl) = 4 mol/l auf pH = 8,8 eingestellt. Anschließend wird die Lösung in einen 50-ml-Meßkolben übergeführt und mit Wasser aufgefüllt.

5.2.3 Glycerin-Wasser-Mischung

60 g Glycerin ($C_3H_8O_3$) werden mit 40 ml Wasser vermischt.

5.2.4 Schwere Gellösung, Gelkonzentration (Massenanteil der Acrylamide) = 4 %

In ein 50-ml-Becherglas werden nacheinander 2,0 ml Gelstammlösung (siehe 5.2.1), 3,5 ml Trenngel-Pufferlösung (siehe 5.2.2), 6 ml Glycerin-Wasser-Mischung (siehe 5.2.3) und 3,5 ml Wasser pipettiert und anschließend miteinander vermischt.

5.2.5 Leichte Gellösung, Gelkonzentration (Massenanteil der Acrylamide) = 23 %

In ein 50-ml-Becherglas werden nacheinander 9,2 ml Gelstammlösung (siehe 5.2.1) und 2,8 ml Trenngel-Pufferlösung (siehe 5.2.2) pipettiert und miteinander vermischt.

5.3 Proben-Pufferlösung

In einem 25-ml-Becherglas werden zu 0,6 g SDS und 20 mg Dithiothreitol (DTT) ($C_4H_{10}O_2S_2$) etwa 15 ml Wasser und genau 0,5 ml Trenngel-Pufferlösung (siehe 5.2.2) zugegeben und unter Rühren (Magnetrührer) gelöst.

Die Lösung wird in einen 20-ml-Meßkolben übergeführt und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Anschließend werden etwa 2 mg Bromphenolblau ($C_{19}H_9Br_4O_5S$) zur Sichtbarmachung der Front während der Elektrophorese zugegeben.

Die Pufferlösung ist bei Bedarf frisch herzustellen.

5.4 N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)-Lösung

5 g TEMED werden in 20 ml Wasser gelöst.

Achtung:

TEMED reizt die Augen, Atemorgane und die Haut.

5.5 Ammoniumperoxydisulfat (APS)-Lösung

80 mg APS [$(NH_4)_2S_2O_8$] werden in 1 ml Wasser gelöst.

Die Lösung ist bei Bedarf frisch herzustellen.

5.6 Elektroden-Pufferlösung (Gebrauchslösung)

In einem 1-l-Becherglas werden 144 g Glycin ($C_2H_5NO_2$), 10 g SDS und 0,1 g Natriumazid in etwa 900 ml Wasser unter Rühren (Magnetrührer etwa 1 h) gelöst. Anschließend wird der pH-Wert durch portionsweise Zugabe von etwa 30 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan auf pH = 8,3 eingestellt (etwa 2 h, bis ein konstanter pH-Wert erreicht wird). Danach wird die Lösung in einen 1-l-Meßkolben übergeführt und bis zur Marke aufgefüllt. 1 Volumenanteil dieser Stammlösung wird mit 9 Volumenanteilen Wasser zur Herstellung der Gebrauchslösung verdünnt.

5.7 Kerosin für Kühlzwecke

5.8 Fixierlösung

100 ml Essigsäure w ($C_2H_4O_2$) = 100 %²⁾ (Eisessig), 400 ml Ethanol w (CH_4O) = 96 %²⁾ und 500 ml Wasser werden miteinander vermischt.

5.9 Färbelösung

0,25 g Coomassie Brilliant Blau R 250 (C.I.42655)³⁾ werden in 250 ml Entfärbelösung (siehe 5.10) gelöst. Die Färbelösung wird anschließend durch einen Faltenfilter (mittlere Filtrationsgeschwindigkeit) filtriert.

¹⁾ Über Bezugsquellen gibt Auskunft: DIN-Bezugsquellen für normgerechte Erzeugnisse im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin, Postanschrift 10772 Berlin

²⁾ Massenanteil

³⁾ Colour Index, The Society of Dyers and Colorists, Bradford (England) and The American Association of textile Chemists and Colorists, North Carolina (USA), 1971

5.10 Entfärbelösung

80 ml Essigsäure, w ($C_2H_4O_2$) = 100%²), 250 ml Ethanol, w (CH_4O) = 96%²) und 670 ml Wasser werden miteinander vermischt.

5.11 Imprägnierlösung

25 ml Glycerin $w \geq 99\%$ ²) werden mit 250 ml Entfärbelösung (siehe 5.10) vermischt.

6 Geräte und Hilfsmittel

Übliche Laboratoriumsgeräte und insbesondere die folgenden:

6.1 Zentrifugengefäße aus Kunststoff, konische Maße etwa 10 mm × 40 mm, passend für die Tischzentrifuge (siehe 6.2)

6.2 Tischzentrifuge, einstellbar auf 3000 g

6.3 Gießkassette, bestehend aus einer Deckglasplatte (Maße etwa 260 mm × 125 mm × 3 mm) mit U-förmigem Abstandshalter (0,5 mm), einer Glasplatte (Maße wie Deckglasplatte) und 4 bis 8 Kammern, geeignet für das Zusammenklammern der beiden Glasplatten.

ANMERKUNG: Geeignete Gießkassetten sind bei den Elektrophorese-Geräteherstellern erhältlich.

6.4 Transparente Klebefolie aus Polypropylen

6.5 Handgummiroller, Walzenbreite etwa 20 cm

6.6 Gelträgerfolie¹⁾ (Maße etwa 260 mm × 125 mm × 0,2 mm) aus Polyester mit speziell behandelter hydrophiler Oberfläche zur Erhöhung der Haftfähigkeit des aufpolymerisierten Polyacrylamidgels.

ANMERKUNG: Geeignete Produkte sind im Fachhandel erhältlich. Folien verschiedener Hersteller besitzen jedoch unterschiedliche Haftfähigkeiten. Von den im Handel erhältlichen Gelträgerfolien haben sich nur wenige als geeignet erwiesen.

6.7 Gradientenmischer, bestehend aus zwei zylindrischen Kammern (Nennvolumen jeweils etwa 40 ml), Schiebeventil zwischen den Kammern, Magnetrührstab für die vordere Kammer und Kompensationsstab (Glas oder Kunststoff) für den Volumenausgleich in der hinteren Kammer. Das Auslaufrohr der vorderen Kammer ist mit einem etwa 20 cm langen Silikonschlauch (Innendurchmesser 1,3 mm) versehen; in das vordere freie Ende des Schlauches wird eine Kunststoffspitze (hergestellt durch Abschneiden des vorderen Drittels einer gelben Pipettenspitze, passend für 100- μ l-Kolbenhubpipetten) gesteckt.

6.8 Magnetrührer

6.9 Höhenverstellbare Laborplattform, etwa 140 mm × 120 mm

6.10 Verstellbare Kolbenhubpipette zum Abmessen von Volumina zwischen 10 μ l und 100 μ l

6.11 Mikroliterspritze oder verstellbare Kolbenhubpipette zum Abmessen von 3 μ l

6.12 Elektrodenbrücken

Chromatographiepapier, sehr schnell saugend, mit einem Flächengewicht von 320 g/m²

Dicke: 0,9 mm; zurechtgeschnitten auf die Maße von etwa 25 cm × etwa 12 cm.

6.13 Färbe- und Entfärbeschalen (z. B. Instrumentenschalen), Maße etwa 300 mm × 150 mm.

6.14 pH-Meter

6.15 Kryostat, einstellbar auf 15°C ± 1°C.

6.16 Stromversorgungsgerät, einstellbar auf 600 V, 30 mA, 30 W.

6.17 Geschlossene Horizontal-Elektrophoresekammer mit Kühlblock zur Aufnahme von Gelträgerfolien nach 6.6.

WARNHINWEIS:

Beim Öffnen des Kammerdeckels muß eine Unterbrechung des Stromkreises sichergestellt sein.

6.18 Densitometer zur Transmissions-Messung der gefärbten Proteinbanden mit einer computergestützten Auswertung (automatisch und manuell) der gemessenen Peakflächenwerte.

6.19 Skalpell

7 Probenahme

Nach DIN 10327

8 Durchführung

ANMERKUNG: Bei Verwendung von geeigneten, im Handel erhältlichen, gebrauchsfertigen Gelträgerfolien mit dazugehörigen Pufferstreifen (siehe Anmerkung zu 5) sind die Arbeitsschritte 8.2 bis 8.4 nicht erforderlich.

8.1 Herstellung der Probenlösung

Der Proteinanteil der Probenlösung sollte 3 mg Protein/ml bis 5 mg Protein/ml betragen.

Etwa 40 mg Speisequark bzw. 12 mg Milchpulver bzw. 5 mg Casein bzw. Caseinat werden in ein Zentrifugengefäß nach 6.1 eingewogen, mit 1 ml Proben-Pufferlösung (siehe 5.3) versetzt und gründlich durchmischt. Bei der Untersuchung von Milch werden 100 μ l Probe mit 900 μ l Proben-Pufferlösung versetzt. Die in der Proben-Pufferlösung aufgenommene Probe wird 3 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Vor der Entnahme zur Elektrophorese werden eventuell vorhandene unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (siehe 6.2) abgetrennt.

ANMERKUNG: Zur Kontrolle der elektrophoretischen Trennbedingungen bzw. Bandenzuordnung kann eine milchproteinhaltige Kontrollprobe mitgeführt werden. Als Kontrollprobe eignet sich z. B. ein Magermilchpulver, das über eine längere Zeitspanne bei -20°C ohne elektrophoretisch meßbare Veränderungen gelagert werden kann.

¹⁾ Siehe Seite 2

²⁾ Siehe Seite 2