

Bestemmelse af protein-indhold

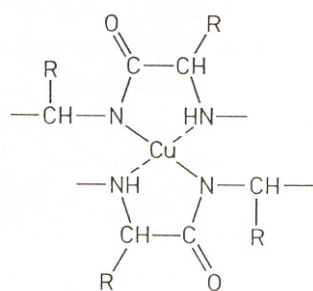
Eksperimentets formål er at foretage en spektrofotometrisk bestemmelse af protein-indholdet i skummetmælk med *Biuretmethode*. Metoden beror på en kompleksdannelse mellem Cu^{2+} og proteinstoffet..

UDSTYR OG KEMIKALIER

proteinopløsning (casein) med kendt koncentration
0,02 M NaOH
0,1 M NaOH
skummetmælk
Biuretreagens
3 stk. 100 mL koniske kolber
1 stk. 50 mL målekolbe
2 stk. 5 mL pipetter
transferpette, 1 mL (1000 μL) – brugen demonstreres
6 stk. reagensglas i stativ
lommeregner, CBL-2, adapter, colorimeter

TEORI

Proteiner er som bekendt opbygget af aminosyrer, der er bundet sammen med peptidbindinger, karakteriseret ved gruppen $-\text{NHCO}-$. Biuretreagenset indeholder Cu^{2+} -ioner, som kan danne Cu^{2+} protein-komplekser med nitrogenatomet fra peptidgrupperne som ligander. Komplekserne har en blåviolet farve og absorberer lys ved ca. 540 nm. Farveintensiteten og hermed absorbansen af lyset er proportional med antallet af peptidbindinger i opløsningen. Derfor må absorbansen også være proportional med protein-koncentrationen.



Modeludsnit af Cu^{2+} protein-komplekset
(ca. 4 peptidbindinger pr. Cu^{2+} -ion)

I eksperimentet fremstilles en standardkurve ud fra kendte protein-koncentrationer. Herved kan ukendte protein-koncentrationer bestemmes, idet der benyttes, at *Lambert-Beers lov* gælder for små koncentrationer dvs.: $A = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot [\text{protein}]$, hvor A er absorbansen ved den valgte bølgelængde, ϵ_{λ} er ekstinktionskoefficienten for fastholdt bølgelængde, l er kuvettebredden og $[\text{protein}]$ den aktuelle protein-koncentration af stoffet.

FORSØGSGANGEN

Forsøgsgangen er beskrevet neden for og illustreret på bilaget side 4.

Bemærk, at det er vigtigt at arbejde med stor præcision og rent glasudstyr.

1) Fremstilling af 4 standardopløsninger til standardkurve.

Der afpipetteres 5,00 mL af protein-opløsningen (med transferpette), som overføres til en 100 mL konisk kolbe og der tilsættes 5,0 mL 0,02 M NaOH (fuldpipette).

Efter blanding afpipetteres 5,00 mL af den fortyndede opløsning i en ny kolbe, og der tilsættes 5,0 mL 0,02 M NaOH.

Dette gentages endnu engang (se bilaget).

Til 4 reagensglas sættes nu 1,00 mL (transferpette) af hver af de 4 protein-opløsninger: reagensglassene er på bilaget angivet med numrene (1), (2), (3) og (4), hvor (1) blot er den oprindelige opløsning.

2) Fremstilling af analyseopløsning med skummetmælk.

Der overføres ca. 10 g skummetmælk til en 50 mL målekolbe (notér den nøjagtige masse på bilaget). Dernæst tilsættes med fuldpipette 10 mL 0,1 M NaOH, og der fyldes op til mærket med demineraliseret vand. Fra denne opløsning overføres 1,00 mL (transferpette) til reagensglas nr. (5): se bilaget.

3) Referenceopløsning (blindprøve).

Til reagensglas nr. (6) sættes 1,00 mL 0,02 M NaOH.

Vi hvert af de 6 reagensglas sættes nu 5,0 mL Biuret-reagens med fuldpipette.

Efter grundig blanding og henstand i 30 min. er opløsningerne klar til måling med colorimeteret.

I ventetiden:

- *Optagelse af absorptionsspektrum.*

For at finde ud af hvor Cu^{2+} protein-komplekset absorberer maximalt optages et scan-spektrum med absorbansen som funktion af bølgelængden.

Til dette anvendes en opløsning med en koncentration svarende til den mest koncentrerede af de 4 standardopløsninger, dvs. nr. (1).

Spektret optages i området 400-800 nm.

- *Klargøring af måleudstyret (lommeregner, CBL-2 med adapter, colorimeter).*

Indstil på den korrekte bølgelængde, idet $\lambda_{\max}$ vælges på baggrund af det optagne spektrum. Colorimeteret nulstilles med blindprøven som reference og målemetoden "SINGLE POINT".

Absorbansen af opløsningerne i reagensglassene (1)-(5) kan nu måles efter de 30 minutter.

Indfør måleresultaterne i skemaet neden for:

Prøve nr.	A
1	
2	
3	
4	
5 (skummetmælk)	

EFTERBEHANDLING

a) Standardkurve.

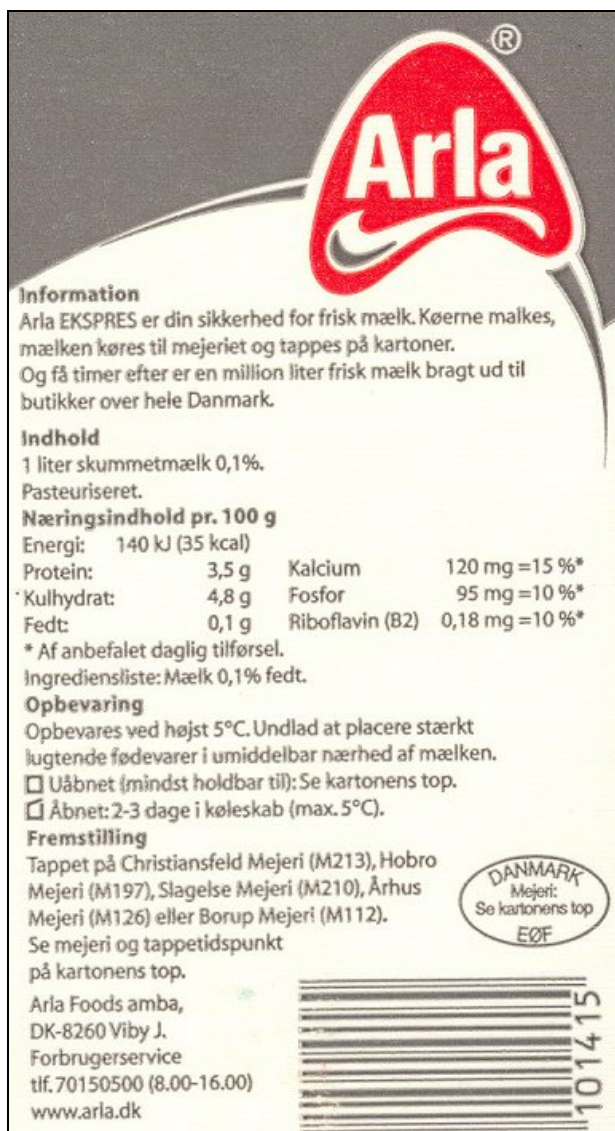
Beregn først koncentrationen, C af protein i reagensglassene (1)-(4).

Enhed for C : mg protein pr. mL opløsning.

Tegn herefter en standardkurve med absorbansen som funktion af C (anvend evt. regnearket *Grafværktøj* eller *TI-89* grafisk lommeregner).

b) Protein-indholdet i skummetmælk.

Beregn protein-indholdet i skummetmælk i enheden g protein pr. 100 g skummetmælk og sammenlign med varedeklarationen.



Information
Arla EKS PRES er din sikkerhed for frisk mælk. Køerne malkes, mælken køres til mejeriet og tappes på kartoner. Og få timer efter er en million liter frisk mælk bragt ud til butikker over hele Danmark.

Indhold
1 liter skummetmælk 0,1%.
Pasteuriseret.

Næringsindhold pr. 100 g

Energi:	140 kJ (35 kcal)		
Protein:	3,5 g	Kalcium	120 mg = 15 %*
Kulhydrat:	4,8 g	Fosfor	95 mg = 10 %*
Fedt:	0,1 g	Riboflavin (B2)	0,18 mg = 10 %*

* Af anbefalet daglig tilførsel.
Ingrediensliste: Mælk 0,1% fedt.

Opbevaring
Opbevares ved højst 5°C. Undlad at placere stærkt lugtende fødevarer i umiddelbar nærhed af mælken.
☐ Uåbnet (mindst holdbar til): Se kartonens top.
☒ Åbnet: 2-3 dage i køleskab (max. 5°C).

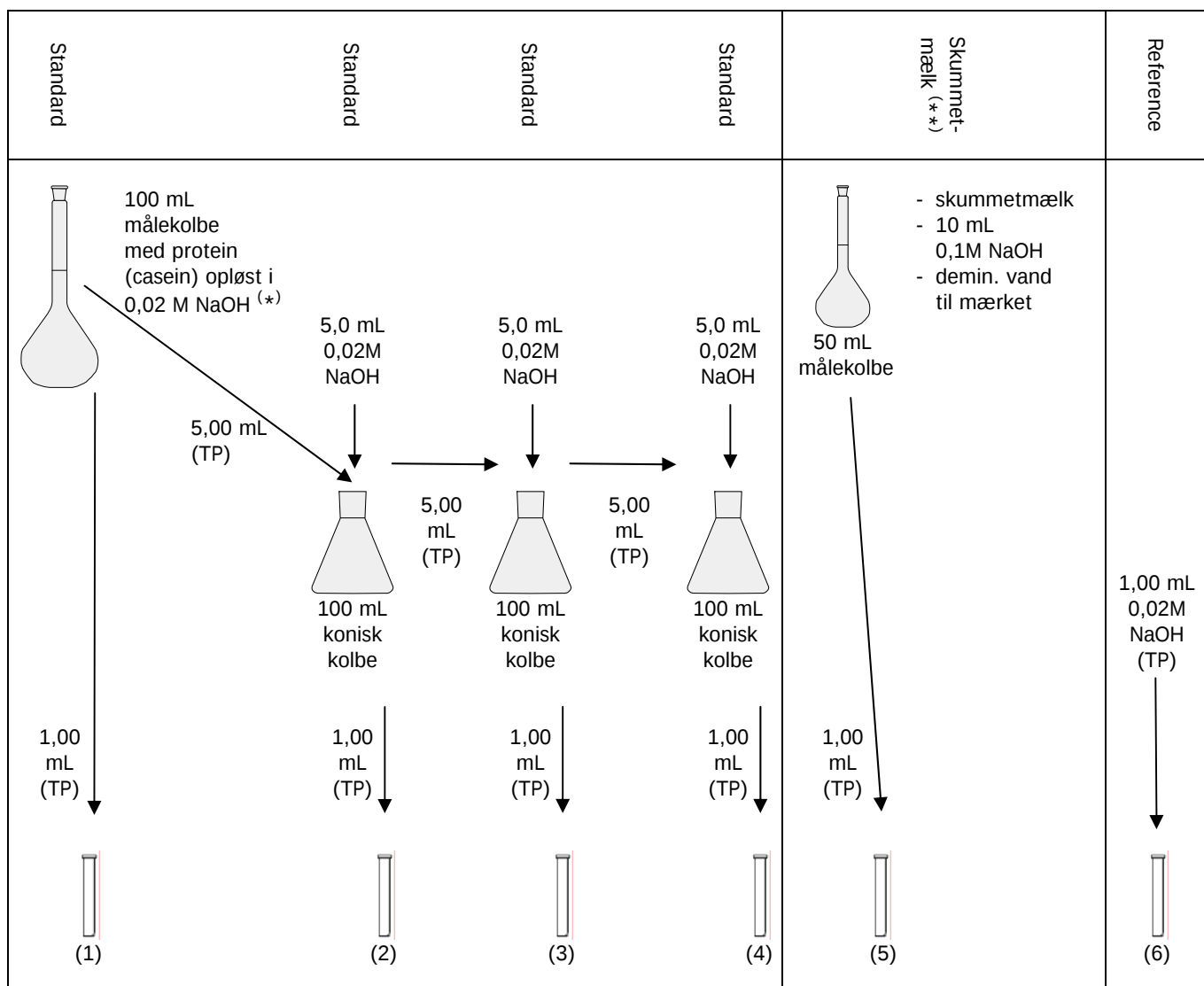
Fremstilling
Tappet på Christiansfeld Mejeri (M213), Hobro Mejeri (M197), Slagelse Mejeri (M210), Århus Mejeri (M126) eller Borup Mejeri (M112).
Se mejeri og tappetidspunkt på kartonens top.

Arla Foods a.m.b.a.,
DK-8260 Viby J.
Forbrugerservice
tlf. 70150500 (8.00-16.00)
www.arla.dk

DANMARK
Mejeri:
Se kartonens top
EØF

101415

BILAG:
Skema over forsøgsgangen



Forkortelsen "TP" angiver, at udtagningen foretages med transferpette.
Til de andre udtagninger anvendes fuldpipette.

(*) Masse af protein (ca. 1 g): _____ g (allerede fremstillet)

(**) Afvejede masse af skummetmælk (ca. 10 g): _____ g

Til hvert af de 6 reagensglas sættes nu 5,0 mL Biuret-reagens med fuldpipette.
Efter grundig blanding og henstand i 30 min. er opløsningerne klar til måling med colorimeteret.