Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 72 (1981)

Heft: 4

Artikel: Bestimmung von Honigprotein mit Coomassie Brilliantblau G 250 = Determination of honey protein with Coomassie brilliant blue G 250

Autor: Bogdanov, S.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-984624

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 09.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 72, 411–417 (1981)
Eingegangen 22. Juli 1981. Angenommen 10. September 1981

Bestimmung von Honigprotein mit Coomassie Brilliantblau G 250

Determination of Honey Protein with Coomassie Brilliant Blue G 250

S. Bogdanov

Sektion Bienen, Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld-Bern

Einleitung

Es ist schon seit vielen Jahren bekannt, daß der Honig neben dem Hauptinhalt, den Kohlenhydraten, auch noch kleine Mengen von Protein enthält. 1910 hat *Lund* (1) das Honigprotein mit Phosphor-Wolframsäure ausgefällt und anschließend volumetrisch bestimmt. In Europa hat man diese Bestimmung bis jetzt gebraucht, um Honige auf Naturbelassenheit zu prüfen. Sehr kleine Mengen von Präzipitat deuten auf Zuckerfütterungshonig oder auf Verfälschung mit Zukkersirup hin. Die Methode von Lund, die auch im Schweizerischen Lebensmittelbuch (2) aufgeführt ist, hat jedoch nur einen semiquantitativen Charakter. *Bergner* und *Diemair* (3) und *White* und *Rudyi* (4) bestimmten den Proteingehalt nach der Methode von *Lowry* (5), nachdem der Zucker mit Ultrafiltration bzw. mit Dialyse entfernt worden war. *Bianchi* bestimmte den Honigproteingehalt mit der Biuret-Probe (7) nach Präzipitation der Proteine mit Phosphorwolframsäure. Alle diese Methoden sind jedoch zu aufwendig und eignen sich kaum für die Routineanalyse.

Bradford (8) entwickelte eine Proteinbestimmung mit dem Farbstoff Coomassie Brilliantblau G 250, die spezifisch für die Protein-Peptidbindung ist und die von sehr vielen Chemikalien und Stoffen nicht gestört wird (9). Diese Methode, die von der Firma Bio-Rad kommerzialisiert wird, hat sich bei der Untersuchung von Proteinen verschiedenster Herkunft bewährt (siehe Referenz 9 der Literatur).

Es war das Ziel dieser Arbeit, die Anwendbarkeit der Methode nach Bradford/Bio-Rad für die Bestimmung von Honigprotein zu prüfen und sie mit anderen Proteinbestimmungsmethoden zu vergleichen.

Methodisches

Reagenzien und Untersuchungsmaterial

Die Firma Bio-Rad (8152 Glattbrugg) hat aufgrund des von Bradford entwikkelten Farbreagenzes ein modifiziertes Produkt entwickelt (Produkt Nr. 500.0001, enthaltend einen Gammaglobulin-Standard). Wir fanden heraus, daß dieses Produkt fünfmal konzentrierter ist als das originale Bradfordsche Reagenz. Wir bereiteten es folgendermaßen zu: 100 mg Coomassie Brilliantblau G 250 (Standard Fluka, Nr. 27815) in 50 ml 95% Ethanol auflösen. Dazu gibt man 100 ml 85%ige (Gew/Vol) Ortho-Phosphorsäure und füllt auf 200 ml auf. Wir verwendeten für unsere Versuche das Bio-Rad-Reagenz, weil es bei diesem Produkt die Garantie für gleichbleibende Qualität gibt. Die Standardkurven mit dem eigenen und mit dem Bio-Rad-Reagenz sind jedoch ganz ähnlich (Abb. 1).

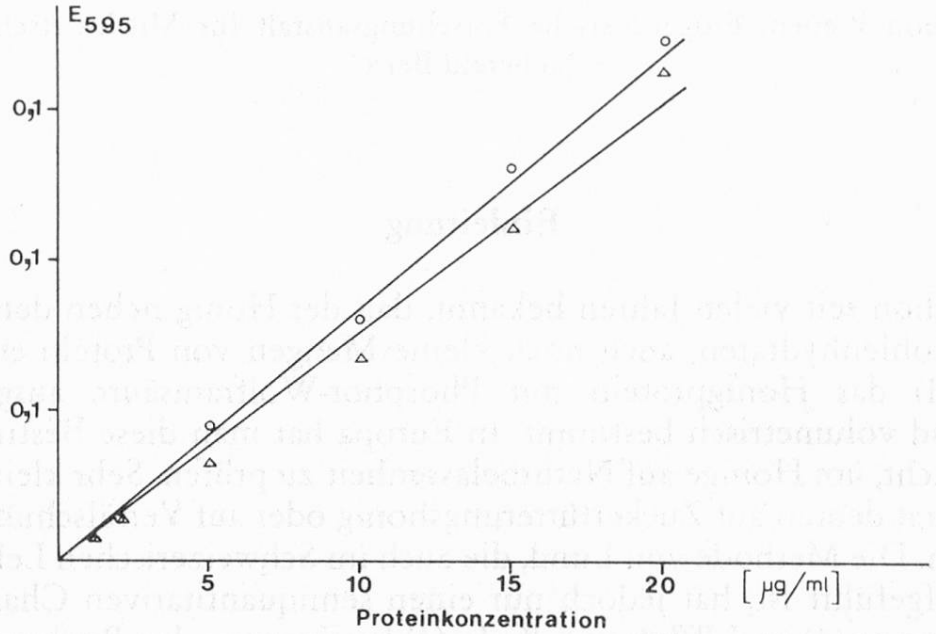

Abb. 1. Standardkurve mit Bradford/Bio-Rad-Reagenz. Extinktion $(E)_{595}$ bei 595 nm, gemessen bei verschiedenen Proteinkonzentrationen (Gammaglobulin). Blindwert abgezogen
△ = Bio-Rad-Reagenz ○ = selbstgemachtes Reagenz

Der BSA-Standard (Rinderserum-Albumin) stammt von Firma Sigma (Nr. A 4503).

Die untersuchten Honige waren der Versuchsanstalt Liebefeld eingesandte Proben, Honige aus anstaltseigenen Bienenständen und ausländische Honige von der Firma Narimpex, Biel. Es wurden 16 ausländische und 18 inländische Honige untersucht.

Ein von uns hergestellter «Modellhonig» war eine Zuckerlösung mit folgender Zusammensetzung: 38% Glucose, 31% Fructose, 8% Maltose, 5% Melezitose, 17% Wasser.

Bradford/Bio-Rad-Methode

- 0,5 g Honig auf 100 ml mit H_2O dest. auffüllen.
- Protein-Standard, enthaltend 1, 2, 5, 10, 15, 20 μg/ml Gammaglobulin, von der Stammlösung ausgehend anmachen.
- 0,2 ml Bio-Rad-Reagenz zu 0,8 ml Proteinstandard oder Honiglösung zugeben und sofort auf dem Vortex mischen (10—15 s). Blindprobe: 0,2 ml Bio-Rad-Reagenz zu 0,8 ml H_2O zugeben und mischen wie oben. Alle Proben doppelt ansetzen.
- Nach 5 bis 60 min die Extinktion bei 595 nm messen. Wir verwendeten einen Zeiss Photometer PM 2 DLC, ausgestattet mit einer Durchflußküvette (Lichtweg 1 cm). Da das Reagenz am Glas etwas absorbiert wird, spülten wir die Küvette nach 4 Messungen mit etwas Methanol. Man könnte auch ein normales Spektrophotometer mit Einweg-Plastikküvetten verwenden, so daß sich die Spülung der Küvette erübrigt.
- Blindprobenwert (0,5—0,6 Extinktionseinheiten) abziehen und Standardkurve aufzeichnen (Abb. 1). Wir erhielten bei allen unseren Versuchen unter den obigen Bedingungen eine lineare Abhängigkeit der Extinktion von der Proteinkonzentration. Bei höheren Proteinkonzentrationen ist die Linearität jedoch nicht mehr vorhanden.
- Berechnung der linearen Regression der Werte aus der Standardkurve mit y = Proteinkonzentration und x = entsprechende Extinktionswerte. Die Steigung der Geraden ist der Faktor (F), der multipliziert mit der Extinktion der Honigprobe, die Proteinkonzentration derselben ergibt.

Berechnung

Proteinkonzentration (mg/100 g Honig) = $20 \cdot (E_{\text{Probe}} - E_{\text{Blind}}) \cdot F$. Der Faktor war innerhalb eines Monats bei Lagerung des Farbreagenzes bei 4 °C konstant. Bei größeren Meßperioden sollte die Standardkurve wieder konstruiert werden.

Andere Proteinbestimmungsmethoden

Die Proteinbestimmung nach *Lund* (1) wurde nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch ausgeführt (2).

Für die Kjeldahl- (10) und Biuret- (7)Methoden wurde folgendermaßen vorgegangen:

100 g Honig auf 500 ml mit H_2O dest. auffüllen. 5 Teile Honiglösung mit einem Teil 3 n Trichloressigsäure versetzen und über Nacht stehenlassen. Niederschlag abzentrifugieren (halbe Stunde Laborzentrifuge 3,000 rpm) und 2mal mit 0,6 n Trichloressigsäure waschen (Präzipität dazwischen abzentrifugieren). Niederschlag wie folgt weiterbehandeln.

Kjeldahl: Niederschlag von 200 ml Honiglösung mit 10 ml konz. Schwefelsäure aufschließen. Titration mit 0,05 n HCl.

Berechnung

g Stickstoff mal 6,25 = g Protein.

Biuret: Niederschlag von 7,5 ml Honiglösung mit 1 ml H_2O dest. und 4 ml Biuret-Reagenz versetzen. Proteinstandard (1—10 mg/ml) gleich behandeln. Für besseres Auflösen des Präzipitates Reagenzgläser eine halbe Stunde lang bei 40 °C halten. Ablesen nach 30—90 min bei 540 nm. Vorversuche mit BSA und Gammaglobulin, die zu einem Modellhonig zugegeben wurden, zeigten, daß 100% des Proteins ausgefällt und nachher bestimmt werden konnten.

Ergebnisse und Diskussion

Bradford/Bio-Rad-Methode

In Abbildung 1 sind die Standardkurven mit dem Bio-Rad-Reagenz (untere Gerade) und mit dem selbstgemachten Farbreagenz abgebildet. Die Kurven unterscheiden sich geringfügig voneinander. Lineare Regression ergab bei der oberen Gerade (selbstgemachtes Reagenz) einen Korrelationskoeffizient von 0,998, bei der unteren Gerade 0,995. Bei höheren Proteinkonzentrationen weicht die Kurve vom linearen Verlauf ab und biegt gegen oben um (Meßpunkte nicht gezeigt). Die Standardkurve mit Proteinstandardlösungen, die noch zusätzlich 0,5% «Modellhonig» enthielten, war identisch mit jener ohne Zucker. Also hat Zucker in dieser Konzentration keinen Einfluß auf die Farbreaktion. Dies bestätigt frühere Resultate, daß 1 M Saccharose (8) sowie 1 M Glucose oder Fructose (9) keinen Einfluß auf die Farbreaktion haben. Alle Honigproben, die wir untersuchten (Proteingehalt von 26 bis 320 mg/100 g), konnten mit Hilfe nur einer Verdünnung bestimmt werden. Für Honige mit mehr als 400 mg/100 g (eventuell Heidehonige) müßte die Probe mit H_2O (1+1) verdünnt werden. Die von Bradford entwickelte Standardproteinbestimmungsmethode (für Proteinkonzentration von 0,2 bis 1,4 mg/ml) wurde wegen ihrer ungenügenden Empfindlichkeit nicht benützt.

In Abbildung 2 ist die Verteilung der Proteinmengen bei den untersuchten Honigproben wiedergegeben. Der Mittelwert von allen Proben war 129 ± 59 mg/100 g Honig (Standardabweichung, $n = 34$). Die große Mehrheit der Honige (82%) hatten Proteingehalte von 50—200 mg/100 g. Ein Orangenblütenhonig hatte nur 26 mg/100 g und zwei Akazienhonige 50 mg/100 g. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen Honigtau- (10 Proben) und Blütenhonigen (24 Proben).

In einer späteren Arbeit soll die Beziehung zwischen Tracht und Proteingehalt untersucht werden.

Vergleich zwischen verschiedenen Proteinbestimmungsmethoden

In Tabelle 1 sind die Resultate der Proteinbestimmungen von 12 Honigproben wiedergegeben, die mit 4 verschiedenen Methoden erhalten wurden. Die mit der Bradford-Methode erhalteten Werte sind 31% höher als die mit der Kjeldahl-Methode und 2,5mal niedriger als die mit der Biuret-Probe erhaltenen. Die Brad-

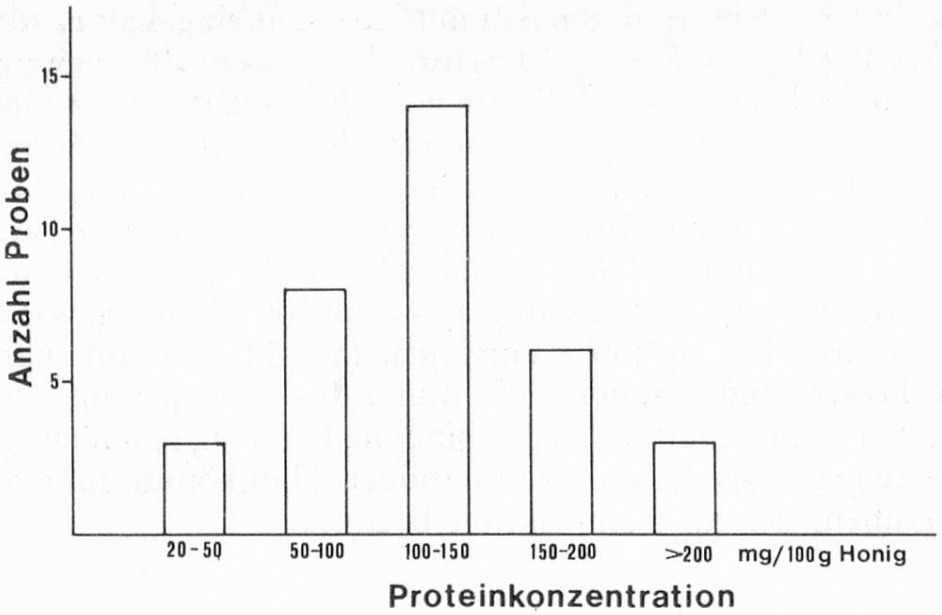

Abb. 2. Proteingehalt von Honigen. Messungen mit der Bradford/Bio-Rad-Methode an 18 inländischen und 16 ausländischen Honigen

ford-Werte korrelieren signifikant ($p = 0{,}01$) mit allen anderen Werten, am besten mit den Kjeldahl-Werten, am schlechtesten mit den Biuret-Werten.

Die Bestimmungen mit der Kjeldahl- und mit der Biuret-Methode kommen wegen ihrer großen Aufwendigkeit für die Routineuntersuchungen kaum in Frage. Die volumetrische Bestimmung nach Lund gibt Anhaltspunkte über den wahren Proteingehalt, ist aber nur semiquantitativ. Je nach Pollengehalt und Präzipitatbeschaffenheit kann das Präzipitatvolumen variieren. Auch ist die Ablesegenauigkeit bei den kalibrierten Röhren zu wenig genau.

Tabelle 1. Vergleich verschiedener Honigproteinbestimmungsmethoden

Honigprobe		Bradford/ Bio-Rad	Kjedahl	Biuret	Lund ml Prazipitat
		Honigprotein in mg pro 100 g Honig			
Sonnenblumenhonig	Ausland	80	79	330	0,65
Lindenblütenhonig	Ausland	100	83	200	0,70
Blütenhonig	Ausland	120	70	180	0,75
Thymianhonig	Ausland	195	152	400	1,15
Akazienhonig	Ausland	50	47	97	0,45
Rapshonig	Inland	120	114	412	0,80
Kastanienhonig	Inland	130	108	290	1,30
Honigtauhonig	Ausland	185	124	470	1,10
Honigtauhonig	Inland	165	80	370	0,80
Honigtauhonig	Inland	145	92	330	0,80
Honigtauhonig	Inland	111	105	300	0,90
Honigtauhonig	Inland	97	95	340	0,70

White und *Rudyi* bestimmten den mittleren Proteingehalt nordamerikanischer Honige auf 169 mg/100 g (n = 740, Schwankungsbreite 58—786 mg). Bergner und Diemair fanden bei 6 Honigen Werte von 120 bis 920 mg — beide Gruppen verwendeten die Lowry-Methode. *Bianchi* (6) bestimmte den Honigproteingehalt mit der Biuret-Methode nach Ausfällung der Proteine mit Phosphorwolframsäure auf 200—700 mg/g. Unsere Werte mit der Biuret-Methode sind von der gleichen Größenordnung. *Bosi* und *Battaglini* (11) bestimmten den Gehalt an Proteinaminosäuren mit Gaschromatographie auf 100 mg/100 g, was einem Proteingehalt von zirka 110 mg/100 g entspricht (n = 28, Schwankungsbreite 70—300 mg). Die Lowry- und besonders die Biuret-Reaktion, die auf der Komplexbindung von Cu^{2+}-Ionen mit der Peptidbindung beruhen, scheinen also höhere Proteinwerte zu geben als die anderen Methoden. Dies könnte auf einem Honigstörfaktor beruhen, der die Farbreaktion beeinflußt.

Zusammenfassung

Die Anwendbarkeit der Bradford/Bio-Rad-Proteinbestimmungsmethode mit Coomassie Brilliantblau G 250 auf die Honigproteinanalyse wurde geprüft. Diese Methode wurde gleichzeitig mit anderen Proteinbestimmungsmethoden verglichen. Die schnellste und einfachste Methode, die die genauesten Meßresultate ergibt, ist die Bradford/Bio-Rad-Methode. Der mittlere Honigproteingehalt, gemessen mit der Bradford/Bio-Rad-Methode, war 129 ± 59 mg/100 g Honig. Die Werte streuten zwischen 26 und 320 mg/100 g. Mit der Kjeldahl-Methode wurden 31% niedrigere, mit der Biuret-Methode 2,5mal höhere Proteingehalte gemessen.

Résumé

On a examiné si la méthode de Bradford/Bio-Rad destinée à déterminer la teneur en protéines à l'aide du bleu brillant G 250 de Coomassie peut être utilisée pour le dosage des protéines du miel. En même temps, cette méthode a été comparée avec d'autres méthodes de détermination des protéines. La méthode de Bradford/Bio-Rad est selon nos essais la méthode de détermination la plus rapide et la plus simple, elle donne les résultats les plus précis.

La teneur moyenne en protéines du miel, mesurée avec la méthode de Bradford/Bio-Rad est de 129 ± 59 mg/100 g de miel. Les valeurs varient entre 26 et 320 mg/100 g. Les valeurs obtenues avec la méthode de Kjeldahl sont inférieures de 31%, celles mésurées avec la méthode de Biuret 2,5 fois plus élevées.

Summary

The applicability of the Bradford/Bio-Rad protein determination method with Coomassie brilliant blue G 250 colour reagent was examined in honey analysis. At the same time is was compared with other protein determiation methods. The fastest and the simplest method, which also should yield te most exact results, is the Bradford/Bio-Rad method.

The average honey protein content, measured with the Bradford/Bio-Rad method, was 129 ± 59 mg/100 g honey. The values were between 26 and 320 mg/100 g. The values, determined with the Kjeldahl method, were 31% lower, those with the Biuret probe two and a half times higher.

Literatur

1. *Lund, R.:* Über die Untersuchung des Bienenhonigs unter spezieller Berücksichtigung der stickstoffhaltigen Bestandteile. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **1**, 38–58 (1910).
2. Schweizerisches Lebensmittelbuch, 5. Auflage, 2. Band, Kapitel 23 A, Abschnitt 09, Honig und Kunsthonig. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1967.
3. *Bergner, K. G.* und *Diemair, S.:* Proteine des Honigs. Z. Lebensm. Unters. -Forsch. **157**, 7–13 (1975).
4. *White, J. W.* and *Rudyi, O. N.:* The protein content of honey. J. apic. Res. **17**, 234–238 (1978).
5. *Lowry, O. H., Rosenbrough, N-J., Farr, A. L.* and *Randall, R-J.:* Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**, 265–275 (1951).
6. *Bianchi, E. M.:* Photokolorimetrische Bestimmung der Gesamtproteine des Honigs. In: Apitherapie Symposium, S. 68–70, Apimondia Verlag, Bucharest 1976.
7. *Legget Bailey L.:* Techniques in protein chemistry, S. 341. Elsevier, Amsterdam 1967.
8. *Bradford, M. M.:* A rapid and sensitive methode for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**, 248–254 (1976).
9. Bio-Rad Protein Assay. Bio-Rad Bulletin 1069 EG, Februar 1979.
10. Schweizerisches Lebensmittelbuch, 5. Auflage, 1. Band, Kapitel 6.2, 519–522. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1964.
11. *Bosi, G.* and *Battaglini, M.:* Gas chromatographic analysis of free and protein amino acids in some unifloral honeys. J. apic. Res. **17**, 152–166 (1978).

Dr. S. Bogdanov
Sektion Bienen
Eidgenössische Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft
CH-3097 Liebefeld-Bern