



Uniwersytet
Gdański



Katedra Analizy Środowiska

**Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych
z Analizy Żywności**

Ćwiczenie 2

Oznaczanie zawartości białka w mleku metodą spektrofotometryczną

Gdańsk, 2024

1. Wprowadzenie

Białka są głównymi składnikami żywności oraz niezbędnymi składnikami pokarmowymi. Są także podstawowym elementem budowy tkanek, a ponadto wchodzi w skład enzymów i hormonów, regulując wiele ważnych procesów organizmu. Zawartość białka w produktach spożywczych jest jednym z czynników określających ich wartość odżywczą. Ilość tego składnika w surowcach wykorzystywanych w przetwórstwie żywności, decyduje często o prawidłowym przebiegu procesu produkcyjnego oraz o jakości gotowego wyrobu.

1.1. Struktura białek

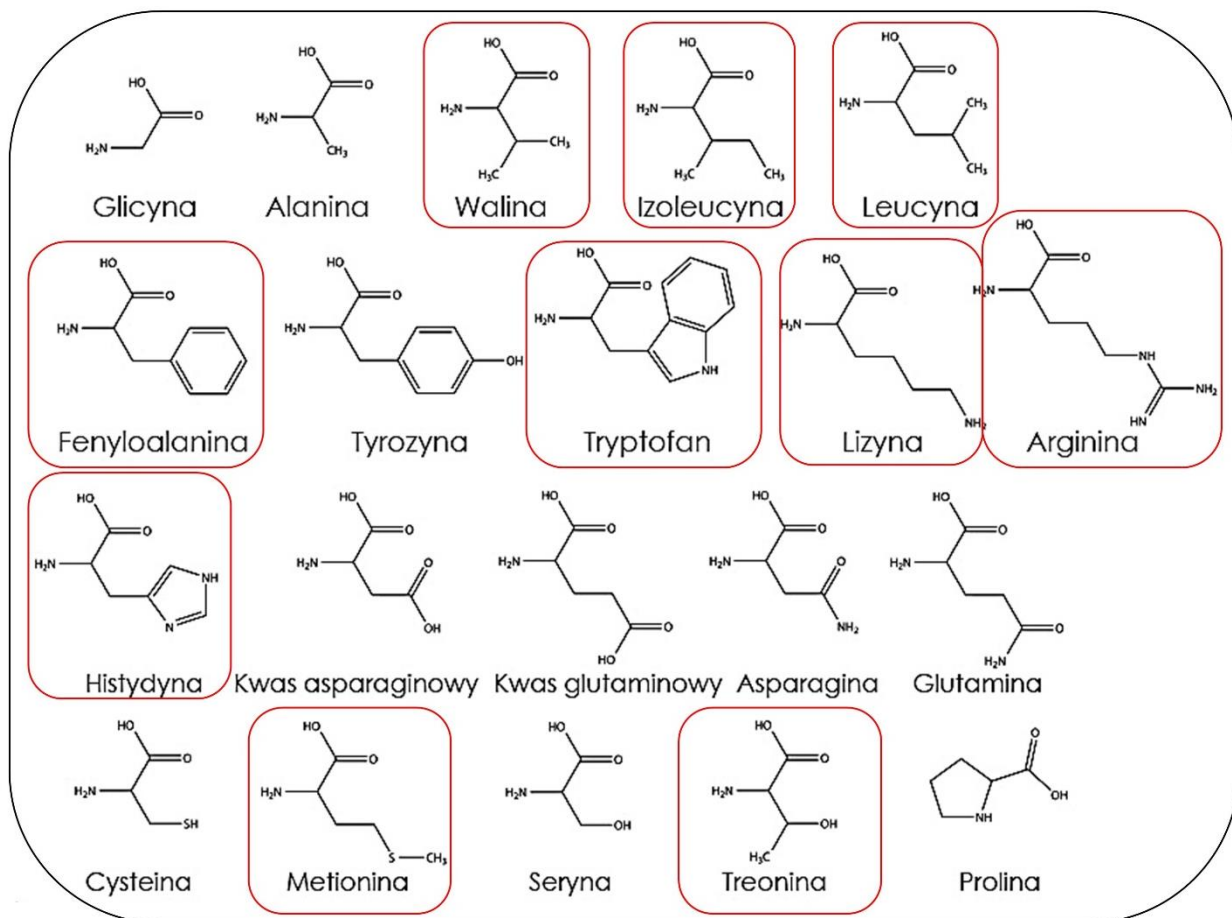
Białka są naturalnymi produktami zbudowanymi z reszt α -L-aminokwasowych (Rys. 1), połączonych w łańcuchy polipeptydowe wiązaniami **peptydowymi** (konfiguracja *trans*). Zawartość procentową podstawowych pierwiastków wchodzących w skład białek zestawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Udział procentowy podstawowych pierwiastków wchodzących w skład białek

Pierwiastek	Zawartość w białku [%]
Węgiel	50 – 55
Tlen	20 – 23
Wodór	6 – 7
Azot	12 – 19
Siarka	0,2 – 3
Fosfor	0 – 6

Aminokwasy białkowe, czyli takie aminokwasy, które wchodzi w skład białek przedstawiono na Rysunku 1. Części z nich organizm ludzki nie potrafi zsyntezować i muszą być dostarczane wraz z pożywieniem. Są to tzw. **aminokwasy egzogenne** (zaznaczone kolorem czerwonym na Rysunku 1.).

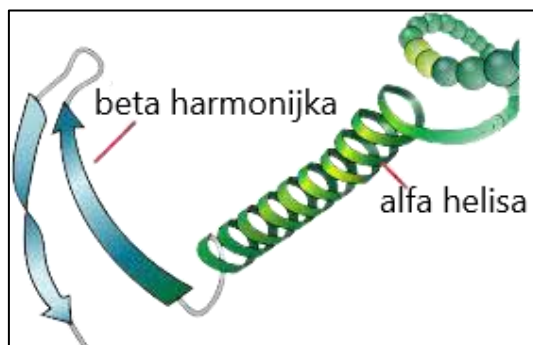
Różnorodność białek wynika ze składu i sposobu uszeregowania reszt różnych aminokwasów w cząsteczce. Chemiczne właściwości i wymiary reszt aminokwasów powiązanych w określonej sekwencji decydują o konformacji białek (kształcie łańcuchów polipeptydowych), o ich przestrzennym ułożeniu w cząsteczce, a także o wzajemnym oddziaływaniu podjednostek. Białka o określonej konformacji mają charakterystyczne właściwości biologiczne oraz cechy funkcjonalne w żywności.



Rysunek 1. Struktury aminokwasów wchodzących w skład białek; na czerwono zaznaczono aminokwasy egzogenne [źródło: fizjoterapeuty.pl]

Ze względu na skalę przestrzenną pełną strukturę białka można opisać na czterech poziomach:

- **Struktura pierwszorzędowa** – określa skład i sekwencję aminokwasów w łańcuchu polipeptydowych.
- **Struktura drugorzędowa** – opisuje ułożenie łańcucha polipeptydowego w przestrzeni oraz łańcuchów względem siebie. Są to lokalne struktury powstające w wyniku tworzenia się wiązań wodorowych. Długie łańcuchy polipeptydowe przyjmują najczęściej regularną strukturę helisy α , bądź strukturę β -harmonijki (Rysunek 2.)



Rysunek 2. Schemat struktury drugorzędowej białka [źródło: gentaur.pl]

- **Struktura trzeciorzędowa** – określa przestrzenne pofałdowanie łańcucha polipeptydowego. Stabilizowana jest przez oddziaływania między resztami aminokwasowymi występującymi w różnych rejonach cząsteczki. Najtrwalsze są *mostki disulfidowe* - kowalencyjne wiązania między resztami cysteiny zlokalizowanymi w różnych miejscach cząsteczki. Oprócz mostków disulfidowych istotną rolę w utrzymywaniu przestrzennego ukształtowania cząsteczek białka odgrywają *wiązania wodorowe* tworzące się między różnymi obszarami cząsteczki, wiązania *hydrofobowe*, w których powstaniu uczestniczą bogate w niepolarne reszty aminokwasowe obszary łańcucha (np. fenyloalaninę, leucynę), i *mostki solne* powstające między resztami aminokwasowymi naładowanymi dodatnio (np. lizyną) a resztami aminokwasowymi naładowanymi ujemnie (np. asparaginą).
- **Struktura czwartorzędowa** – dotyczy białek zbudowanych z więcej niż jednego łańcucha polipeptydowego. Określa wzajemny, na ogół złożony sposób interakcji wszystkich łańcuchów. Przykładem takiej struktury jest hemoglobina, zbudowana z czterech łańcuchów – dwóch łańcuchów α i dwóch β .

Pod wpływem wielu czynników fizycznych i chemicznych następuje zniszczenie struktury białka zwane procesem **denaturacji**. Denaturacja białka dotyczy zmian w II, III- i IV-rzędowej strukturze białka natywnego, które prowadzą do utraty aktywności biologicznej lub innej indywidualnej cechy charakterystycznej przy zachowaniu jego struktury pierwszorzędowej. Podczas denaturacji niszczone są wiązania wodorowe, a w obecności odczynników redukujących zerwaniu ulegają wiązania disulfidowe. Denaturacja może być procesem odwracalnym (tzw. renaturacja) lub nieodwracalnym. Podczas denaturacji zachodzą zmiany rozpuszczalności i przesunięcie punktu izoelektrycznego. Rozwinięcie łańcucha peptydowego może prowadzić do wzrostu lepkości, a także zmian absorpcji w nadfiolecie. Obserwuje się również często procesy agregacji i wytrącania, co jest związane ze zmianami stopnia hydratacji i rozpuszczalności białek.

Najważniejszymi metodami fizycznymi denaturacji są: ogrzewanie, silne mieszanie, wytrząsanie, naświetlanie promieniowaniem nadfioletowym, rentgenowskim i jonizującym lub działanie ultradźwiękami. Denaturacja chemiczna zachodzi pod wpływem związków, które są zdolne do rozerwania wiązań wodorowych, na przykład pod wpływem roztworu mocznika o stężeniu 6-8 mol/dm³ lub chlorku guanidyny o stężeniu 4 mol/dm³, na skutek działania kwasów lub zasad (wartość pH poniżej 3 lub powyżej 9), soli metali ciężkich, a także 1% roztworu dodecylosiarczanu sodu (SDS).



1.2. Właściwości białek

Struktura białek warunkuje ich fizyczne, chemiczne, a w związku z tym również, biologiczne właściwości poszczególnych białek. Podstawowe struktury aminokwasów tworzących białko zawierają różne grupy funkcyjne - kwasowe, zasadowe, pierścienie aromatyczne, grupy alkoholowe, atomy siarki itp., stąd w zależności od pH roztworu w jakim się znajdują przybierają - jako całość - ładunek ujemny lub dodatni. Ładunek cząsteczki białka w roztworze o określonym stężeniu jonów wodorowych zależy od ilościowego stosunku aminokwasów zasadowych (lizyny, histydyny i argininy) i aminokwasów kwasowych (kwasu glutaminowego i asparaginowego). Od sumarycznego ładunku cząsteczki zależy z kolei jej stabilność w środowisku o różnym pH. W środowisku o wysokim stężeniu jonów wodorowych (niskie pH) cząsteczka białka zyskuje ładunek dodatni, podczas gdy w środowisku o niskim stężeniu jonów wodorowych (wysokie pH) ma ładunek ujemny. Wartość pH, przy którym sumaryczny ładunek cząsteczki wynosi 0, nosi nazwę **punktu izoelektrycznego**. W punkcie izoelektrycznym białko nie wykazuje ruchliwości elektroforetycznej oraz charakteryzuje się najniższą rozpuszczalnością w wodzie.

Białka nie posiadają charakterystycznej dla siebie temperatury topnienia. Na ogół są rozpuszczalne w wodzie. Niektóre z nich mogą rozpuszczać się w rozcieńczonych kwasach lub zasadach, jeszcze inne w rozpuszczalnikach organicznych. Posiadają zdolność wiązania cząsteczek wody. Efekt ten nazywa się **hydratacją**. Na rozpuszczalność polipeptydów ma wpływ stężenie soli nieorganicznych. Ich małe stężenie wpływa dodatnio na rozpuszczalność, jednak przy pewnym stężeniu następuje uszkodzenie otoczki solwatacyjnej, co powoduje wypadanie białek. Proces ten nie narusza struktury białka, jest odwracalny i nosi nazwę *wysalania białek*.

Właściwości funkcjonalne białek - wynikające z ich oddziaływań z wodą, innymi białkami, sacharydami, lipidami i jonami - umożliwiają osiągnięcie pożądanych cech sensorycznych żywności. Takie cechy funkcjonalne jak: lepkość, żelowanie, pęcznienie, zwilżanie się, rehydratacja, utrzymywanie wody, rozpuszczalność, pienienie się, tworzenie błon, ciast, włókien i emulsji, stabilizowanie emulsji powodują, że białka mogą wpływać na barwę, soczystość i teksturę produktów spożywczych, Odgrywają również istotną rolę przy rozdrabianiu, mieszaniu i formowaniu artykułów żywnościowych.



1.3. Podział białek

Ze względu na budowę i skład białka można dzielić na:

- **białka proste** (zbudowane wyłącznie z aminokwasów), które dzieli się na:
 - *protaminy* - posiadają charakter silnie zasadowy, charakteryzują się dużą zawartością argininy oraz brakiem aminokwasów zawierających siarkę, są dobrze rozpuszczalne w wodzie. Najbardziej znanymi protaminami są klupeina, salmina, cyprynina, ezocyna;
 - *histony* - posiadają silny charakter zasadowy; są dobrze rozpuszczalne w wodzie, a także w środowisku słabo kwaśnym; w połączeniu z kwasem dezoksyrybonukleinowym są składnikami jąder komórkowych, występują także w czerwonych ciałkach krwi;
 - *albuminy* - białka obojętne, spełniają szereg ważnych funkcji biologicznych: są enzymami, hormonami i innymi biologicznie czynnymi związkami. Dobrze rozpuszczają się w wodzie i rozcieńczonych roztworach soli; łatwo koagulują. Znajdują się w osoczu krwi, mleku oraz w mięśniach;
 - *globuliny* - źle rozpuszczalne w wodzie, natomiast dobrze w rozcieńczonych roztworach soli; występują w dość dużych ilościach w płynach ustrojowych oraz tkance mięśniowej. Przedstawicielem tej klasy białek jest fibrynogen osocza, miozyny oraz immunoglobuliny;
 - *prolaminy* - typowe białka roślinne, występują w nasionach. Ich charakterystyczną właściwością jest zdolność rozpuszczania się w 70% etanolu;
 - *gluteiny* - typowe białka roślinne; posiadają zdolność rozpuszczania się w rozcieńczonych kwasach i zasadach; zawierają duże ilości kwasu glutaminowego, glutaminy oraz proliny;
 - *skleroproteiny* - nierozpuszczalne w wodzie i rozcieńczonych roztworach soli; posiadają włóknistą budowę dzięki czemu pełnią funkcję podporowe; do tej grupy białek należy kreatyna;

- **białka złożone** (posiadają obok aminokwasów, także części niebiałkowe, tzw. grupy prostetyczne), które ze względu na charakter grupy prostetycznej dzieli się na:
 - *nukleoproteidy* - połączone z nukleotydami i kwasami nukleinowymi; występują w jądrach komórkowych; rybonukleoproteidy są zlokalizowane przede wszystkim w cytoplazmie: w rybosomach, mikrosomach i mitochondriach, w niewielkich ilościach także w jądrach komórkowych. Wirusy są zbudowane prawie wyłącznie z nukleoproteidów;



Analiza Żywności

2. Oznaczanie zawartości białka w mleku metodą spektrofotometryczną

- *fosfoproteidy* - połączone z resztami kwasu fosforowego (ok. 1%); posiadają charakter kwaśny, zazwyczaj są połączone z kationami metali; należy do nich kazeina mleka, witelina żółtka jaja czy ichtulina ikry ryb;
- *chromoproteidy* - białka połączone z barwnikami. Należą tu hemoproteidy (hemoglobina, mioglobina, cytochromy katalaza, peroksydaza) zawierające układ hemowy oraz flawoproteidy;
- *metaloproteidy* - białka połączone z jednym lub kilkoma kationami metali np. Fe, Cu, Co, Ca, Mg, Mo czy Zn; atomy metalu stanowią grupę czynną wielu enzymów;
- *glikoproteidy* - ich grupę prostetyczną stanowią cukry, należą tu m.in. mukopolisacharydy (ślina). Glikoproteidy występują też w substancji ocznej i płynie torebek stawowych;
- *lipoproteidy* - połączenia białek z tłuszczami prostymi lub złożonymi, np. sterydami, kwasami tłuszczowymi. Lipoproteidy są nośnikami cholesterolu (LDL, HDL, VLDL). Wchodzą na przykład w skład błony komórkowej.

W związku z łatwością rozpuszczania się w wodzie białka można podzielić na:

- *Hydrofilowe* – rozpuszczalne w wodzie, ze względu na kształt nazywane są globularnymi, najczęściej spotykane są w cytoplazmie
- *Hydrofobowe* (fibrylarne) – nierozpuszczalne w wodzie, przyjmują kształt włókien, znajdują się w błonach komórkowych

W związku z podstawową funkcją biologiczną, białka można podzielić na:

- *białka transportujące* – m.in. hemoglobina, albumina osocza, lipoproteina;
- *białka magazynujące* - występujące np. w nasionach roślin;
- *białka strukturalne* - m.in. glikoproteiny, elastyna, kolagen i keratyna;
- *białka regulatorowe* - niektóre hormony jak insulina, glukagon czy hormon wzrostu ;
- *toksyny* – występujące np. w jadzie węża;
- *przeciwciała*;
- *enzymy* - m.in. transferazy, hydrolazy, liazy;
- *białka aparatu kurczliwego* - aktyna i miozyna.

1.4. Białka zawarte w produktach spożywczych

Bogatym źródłem białka są jaja, mleko i produkty mleczne, mięso zwierząt hodowlanych oraz ryby. Wymienione produkty zawierają białka o wysokiej wartości odżywczej, tzw. **białka pełnowartościowe**, w skład których wchodzi wszystkie egzogenne aminokwasy w proporcjach zapewniających ich maksymalne wykorzystanie przez organizm ludzki. Większość artykułów pochodzenia roślinnego zaliczana jest do produktów niskobiałkowych, gdyż obecne w nich białka są niepełnowartościowe i posiadają niższą wartość odżywczą. Wprawdzie nasiona roślin strączkowych (szczególnie soi) zawierają znaczne ilości białka, ale jest ono niepełnowartościowe z powodu niewystarczającej zawartości metioniny. Także wartość odżywcza zbóż jest ograniczona z powodu niedostatecznej zawartości lizyny.

Dla wybranych produktów żywnościowych przedstawiono zawartość białka oraz jego wartość odżywczą wyznaczoną za pomocą **wskaźnika aminokwasu ograniczającego** (Tabela 2). Wskaźnik aminokwasu ograniczającego określa stopień wykorzystania aminokwasów danego białka do budowy białek ustrojowych, określa się go po porównaniu składu białka ze wzorcem FAO (zgodnie z Kodeksem Żywnościowym Światowej Organizacji Zdrowia FAO/WHO). Białka pełnowartościowe charakteryzują się wysoką wartością wskaźnika aminokwasu ograniczającego.

Tabela 2. Zawartość białka i jego wartość odżywcza w wybranych produktach spożywczych (Maria Malecka, Wybrane metody analizy żywności, Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, Poznań, 2003)

Rodzaj produktu	Średnia zawartość białka [g/100 g produktu]	Wskaźnik aminokwasu ograniczającego wg wzorca FAO
Jaja całe	12,0	100,0
Wołowina	21,0	100,0
Dorsz	16,0	99,0
Mleko krowie	3,0	98,0
Soja	35,0	78,0
Kasza jęczmienna	8,8	67,0
Fasola	22,0	55,0
Ziemniaki	1,7	54,0
Pieczywo pszenne	5,8	46,8
Pomidory	0,9	34,8
Pomarańcze	0,9	28,9
Orzechy włoskie	16,0	22,0

1.5. Białka zawarte w mleku

Skład mleka różnych gatunków zwierząt różni się dość znacznie (Tabela 3). Mniejsze różnice występują między poszczególnymi rasami i osobnikami. Mleko niektórych ssaków nie nadaje się do bezpośredniej konsumpcji przez człowieka, np. mleko fok zawiera 12 razy więcej tłuszczu, a także więcej białka niż mleko krowie. Istotnym składnikiem mleka jest laktoza - disacharyd nadający mleku charakterystyczny słodkawy posmak.

Tabela 3. Średni skład mleka różnych zwierząt (g/100 ml) (źródło: D. Miller Ben Shaul, Skład mleka dzikich zwierząt. Analiza mleka zwierząt i metody chowu. International Zoo Yearbook, 1959)

Gatunek	Tłuszcz	Białko	Laktoza
Słoń	22,1	3,2	7,4
Szympanś	3,7	1,2	7,0
Człowiek	4,0	1,3	6,5
Koń	1,6	2,7	6,2
Owca	9,0	4,7	5,8
Zebra	4,8	3,0	5,3
Wielbłąd	5,4	3,8	5,1
Świnia	5,0	3,7	5,0
Kot	5,0	7,2	4,9
Krowa	3,7	3,3	4,8
Kangur	4,0	3,9	4,7
Koza	4,1	3,7	4,2
Pies	11,8	8,7	3,3
Szczur	12,0	9,2	3,3
Niedźwiedź polarny	9,5	9,6	3,0
Szara foka	53,2	11,2	2,6
Bóbr	19,8	9,0	2,2
Królik	10,5	15,5	2,0
Delfin	34,9	10,6	0,9

Białka mleka dzieli się ze względu na ich budowę, rolę biologiczną i właściwości funkcjonalne na kazeiny, białka serwatki oraz otoczki kuleczek tłuszczowych (Tabela 4).

Tabela 4. Zawartość białek w mleku krowim (źródło: food-info.net)

Białko	g/kg białka	Udział w całkowitej zawartości białka [%]
Kazeiny		
α-s1-kazeina	1,0	30,6
α-s2-kazein	2,6	8,0
β-kazeina	10,1	30,8
κ-kazeina	3,3	10,1
Całkowita zawartość kazein	26,0	79,5
Białka serwatki		
α-laktoalbumina	1,2	3,7
β-laktoglobulina	3,2	9,8
Albumina surowicy krwi	0,4	1,2
Immunoglobuliny	0,7	2,1
Pozostałe	0,8	2,4
Całkowita zawartość białek serwatki	6,3	19,3
Kuleczki tłuszczowe	0,4	1,2
Całkowita zawartość białka	32,7	100

Kazeiny są heterogeniczną grupą fosfoprotein, złożoną z 20 składników; są to najważniejsze białka mleka krowiego, jego zawartość wynosi 2,4-2,6%. Kazeiny strącają się z surowego, odtłuszczonego mleka w temp. 20 °C przy pH 4,6; w mleku występują w postaci miceli tworzących roztwór koloidalny. Kuliste micelle mają kształt maliny (średnica 20-300 nm), a ich masa micelarna wynosi 10^7 - 10^{10} . Micelle posiadają porowatą strukturę i są wyraźnie widoczne pod mikroskopem; cząstki miceli wypełniają mniej niż połowę jej objętości. Taka budowa sprzyja wiązaniu wody, jonów, laktozy i enzymów. W 1 ml mleka jest około $7 \cdot 10^{13}$ miceli, które stanowią łącznie od 5 do 6% objętości mleka. Micelle utworzone są z podjednostek złożonych z 25-30 cząsteczek kazeiny α, β, κ, których domeny hydrofobowe są zwrócone do wnętrza, a hydrofilowe w kierunku rozpuszczalnika. W mleku krowim 40% kazeiny stanowi frakcja α, 30% frakcja β, a dalsze 10% frakcja κ. W skład każdej miceli wchodzi od 300 do 500 podjednostek połączonych jonami wapniowymi, fosforanowymi i cytrynianowymi.

Białka serwatki. Serwatka, tzw. odciek pozostający po strąceniu kazein z chudego mleka, jest mieszaniną czterech głównych składników stanowiących około 80% frakcji (β- laktoglobuliny, α-laktoalbuminy, immunoglobulin oraz albumin osocza) oraz wielu innych występujących w małych ilościach, w tym dużej liczby enzymów. W mleku występują w rozproszeniu i są bardzo

trudne do wydzielenia w postaci skrzepu. Białka te nie zawierają fosforu, natomiast są bogate w lizynę. β -laktoglobulina ulega denaturacji podczas silnego ogrzania, co ma niekorzystny wpływ na wydzielanie skrzepu przy pomocy podpuszczki. α -Laktoalbumina jest bardziej odporna na wysokie temperatury; pasteryzacja (80-90°C) nie powoduje jej koagulacji, stąd pozostaje ona w serwatce. Cząsteczki albuminy osocza w środowisku kwaśnym asocjują. Immunoglobuliny (makroglobuliny) są złożoną mieszaniną białek o dużej masie cząsteczkowej i właściwościach odpornościowych. W dużych ilościach występują w siałce. Obserwuje się je również u krów z zapaleniem wymienia (mastitis). Mleko mastitisowe to mleko od krów z zapaleniem wymienia. Produkowane są przez komórki plazmatyczne występujące w gruczołach mleknych. Wyróżnia się podstawowe 3 grupy immunoglobulin: typu G (IgG), które stanowią 90% całości globulin mleka bydła (u ludzi dominują IgA), o masie cząsteczkowej 150-170 tys., typu M (IgM) o masie cząsteczkowej 0,9-1 mln. oraz typu A (IgA) o masie cząsteczkowej 300-500 tys. Pasteryzacja mleka niszczy tę frakcję białek.

W mleku zidentyfikowano około 60 rodzimych enzymów we frakcji kazein, wśród białek serwatki i w białkowej otoczce kuleczek tłuszczowych. Niektóre z nich mają istotne znaczenie w technologii mleczarstwa (m.in. peroksydaza, fosfataza alkaliczna, plazmina, lipazy).

1.6. Metody oznaczania zawartości białka

Oznaczanie zawartości białka w produktach żywnościowych przeprowadza się głównie metodami **bezpośrednimi** (np. spektrofotometryczne (metoda biuretowa i Lovry'ego), nefelometryczne, refraktometryczne) oraz **pośrednimi** (np. metoda Kjeldahla).

Metody pośrednie najczęściej polegają na określeniu zawartości azotu, a następnie przeliczenie go na białko przy użyciu odpowiednich współczynników obliczeniowych. W produktach spożywczych oznacza się tzw. azot ogólny, w skład którego obok azotu białkowego wchodzi azot pochodzący z produktów odbudowy białek, a także azot z innych związków organicznych. Przeciętna zawartość azotu w białkach wynosi około 16%, dlatego też dla tzw. białka surowego współczynnik przeliczeniowy wynosi 6,25 ($100:16=6,25$). Ponieważ białka produktów spożywczych różnią się między sobą zarówno składem jakościowym jak i ilościowym białek, odmienna jest także zawarta w nich ilość azotu. Dlatego też dla poszczególnych produktów spożywczych stosuje się różne wskaźniki przeliczeniowe, i tak np. dla białka jaja kurzego – 6,67, białka mleka – 6,38, białka mięsa – 6,25 czy dla białka żyta, pszenicy i owsa – 5,70. Stosowane mnożniki podaje się obok oznaczonej zawartości białka, np. dla mleka N 6,38. Metody pośrednie



można stosować tylko wówczas gdy badany produkt nie zawiera innych związków azotowych lub zawiera ich bardzo mało.

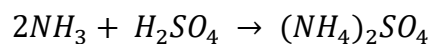
Metody oznaczania białka można podzielić również na:

- metoda Kjeldahla
- metody oparte na wbudowaniu barwnika do białka
- miareczkowanie formolowe
- metody spektrofotometryczne
- metody immunologiczne

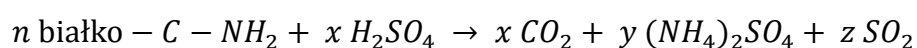
1.6.1. Metoda Kjeldahla

Najczęściej stosowaną metodą oznaczania azotu w artykułach spożywczych jest - znana od 1883 i niewiele modyfikowana - metoda Kjeldahla; jest to także metoda referencyjna. Polega ona na przeprowadzeniu mineralizacji produktu ze stężonym kwasem siarkowym(VI) („na mokro”), zalkalizowaniu roztworu, a następnie oddestylowaniu i jakościowym oznaczeniu powstałego amoniaku. Analiza przebiega w trzech etapach:

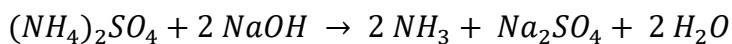
- *Mineralizacji próbki* – podczas, której w kolbie Kjeldahla następuje utlenianie związków organicznych do ditlenku węgla, wody i amoniaku. Mineralizację prowadzi się przy pomocy stężonego kwasu siarkowego w obecności katalizatorów. Jako katalizatory najczęściej stosuje się siarczan(VI) miedzi(II) lub rtęci(II), albo mieszaninę selenowo-miedziową. Czasami stosuje się środki podwyższające temperaturę spalania, np. siarczan(VI) sodu lub potasu oraz środki utleniające. Powstały w czasie mineralizacji amoniak tworzy w środowisku kwasu siarkowego(VI) sól amonową:



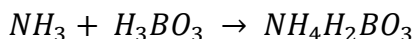
Sumaryczny przebieg powyższych reakcji przedstawia następujący schemat:



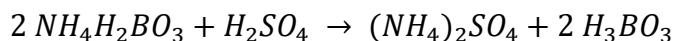
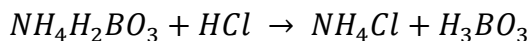
Siarczan (VI) amonu rozkłada się po zalkalizowaniu roztworu wodorotlenkiem sodu.



- *Oddestylowaniu wydzielonego amoniaku* – oddestylowanie następuje do odbieralnika zawierającego roztwór słabego kwasu, np. kwasu borowego występującego w nadmiarze. Następuje wiązania amoniaku w formę soli amonowej kwasu borowego



- *Miareczkowanie związanego amoniaku* – miareczkowanie za pomocą mianowanego roztworu silnego kwasu, np. kwasu solnego lub kwasu siarkowego (VI)



Ilość azotu w próbce oblicza się z ilości mililitrów kwasu zużytego do miareczkowania.

Metodą Kjeldahla, oprócz azotu zawartego w białkach, oznaczany jest azot pochodzący z innych związków (z jonów amonowych, grup amidowych, aminowych oraz iminowych); nie oznaczany jest azot pochodzący z azotanów(III), azotanów(V) oraz azot aromatycznych pierścieni heterocyklicznych. Do oznaczeń należy pobrać taką próbkę, aby zawierała około 0,02 g azotu (z reguły jest to około 0,5-1,5 g produktu).

Zasada metody Kjeldahla została wykorzystana do skonstruowania automatycznego urządzenia służącego do oznaczania azotu. Zestaw obejmuje aparat do mineralizacji, jednostkę do destylacji lub destylacji i automatycznego miareczkowania i pozwala na wykonanie ponad stu analiz dziennie.

1.6.2. Metody oparte na wbudowaniu barwników

Do oznaczania białka stosuje się także metody oparte na tworzeniu barwnych kompleksów białek z pewnymi organicznymi barwnikami, np. czernią amidową 10B, oranżem G, błękitem Coomassie G-250, które mogą być ilościowo wbudowane do białek. W pewnych ściśle określonych warunkach, zwykle poniżej punktu izoelektrycznego białka, białko i barwnik reagują ilościowo tworząc nierozpuszczalne kompleksy, które można oddzielić poprzez wirowanie lub sączenie od reszty roztworu. Natężenie barwy uzyskanego roztworu zależy od ilości barwnika niezwiązanego



Analiza Żywności

2. Oznaczanie zawartości białka w mleku metodą spektrofotometryczną

z białkiem (barwnik dodawany jest w nadmiarze), czyli jest odwrotnie proporcjonalne do ilości białka w analizowanej próbce.

Zasada wbudowywania się czerni amidowej 10B do białek została wykorzystana w aparacie Pro-Milk, stosowanym do szybkiego oznaczania białek mleka w przemyśle mleczarskim.

1.6.3. Miareczkowanie formolowe

Metoda formolowa polega na miareczkowym oznaczeniu ilości jonów wodorowych uwolnionych na skutek reakcji formaldehydu z resztami zasadowymi aminokwasów w łańcuchu białkowym. Rezultatem tej reakcji jest przemiana grup $-NH_2$ w grupy $-N=CH_2$. Prowadzi to do uwalniania jonów wodorowych, które miareczkuje się ściśle mianowanym roztworem wodorotlenku sodu.

Oznaczenie prowadzi się w dwóch etapach. W pierwszym etapie miareczkuje się próbkę wodorotlenkiem sodu wobec fenoloftaleiny (do $pH > 8,3$); zostają zobojętnione wszystkie wolne grupy α -aminowe. W drugim etapie dodaje się formalinę (także zobojętnioną), która powoduje uwalnianie jonów wodorowych z grup ϵ -aminowych lizyny (grupy te nie mogą być zobojętnione w pierwszym etapie miareczkowania, ponieważ aż do $pH 9,8$ występują wyłącznie w formie zjonizowanej). Uwolnione jony wodorowe miareczkuje się ponownie roztworem NaOH. Udział aminokwasów, w tym lizyny, jest w białku stały (uwarunkowany genetycznie), dlatego też ilość jonów wodorowych uwalnianych po dodaniu formaliny jest proporcjonalna do ilości białka w produkcie.

1.6.4. Metody spektrofotometryczne

Do metod spektrofotometrycznych należy przede wszystkim metoda biuretowa oraz metoda Lovry'ego.

W **metodzie biuretowej** wykorzystano reakcję zachodzącą w środowisku zasadowym pomiędzy wiązaniami peptydowymi a jonami miedzi Cu^{2+} , w wyniku której powstają barwne kompleksy. Stosowanie tej metody jest ograniczone obecnością soli amonowych, które również dają reakcję barwną z jonami miedzi.

Metoda Lovry'ego służy do oznaczania białek rozcieńczonych. Oznaczenie przebiega w dwóch etapach; w pierwszym następuje przyłączenie jonów miedzi do białka (reakcja biuretowa), w drugim etapie kompleks białkowo-miedziowy redukuje odczynnik Folina-Ciocolteau



fosfomolibdeniano-fosforowolframowy. W wyniku reakcji tworzy się barwny kompleks, którego absorbancja (mierzona przy 750 nm) jest proporcjonalna do stężenia białka.

Metody spektrofotometryczne wykorzystuje się do oznaczania frakcji rozpuszczalnej w białkach, które decydują o właściwościach funkcjonalnych surowca. Ma to szczególne znaczenie w analizie jakości preparatów białek roślinnych i zwierzęcych oraz przy ocenie mięsa ryb składowanego przez dłuższy czas w warunkach zamrażalniczych. *Oznaczanie ilości białka rozpuszczalnego* polega na wyekstrahowaniu białka z próbki za pomocą odpowiedniego buforu, a następnie określeniu ilości białka za pomocą bezpośredniego pomiaru spektrofotometrycznego uzyskanego roztworu, bądź po przeprowadzeniu go w barwny kompleks stosując odczynnik biuretowy (stężenie białka 1-10 mg/ml) czy odczynnik Folina-Ciocolteau (stężenie białka 10-100 µg/ml).

Także analizy ilościowe **metodą spektrofotometrii w zakresie nadfioletu (UV)** pozwalają oznaczyć zawartość białka w analizowanym produkcie. Białka, zawierają aminokwasy aromatyczne (fenyloalaninę, tryptofan oraz tyrozyna), które wykazują zdolność pochłaniania wiązki światła monochromatycznego z zakresu UV, stąd mierzona absorbancja jest proporcjonalna do zawartości białka w próbce.

Również **promieniowanie w zakresie podczerwieni (IR)** wykorzystywane jest do oznaczania zawartości białka. Selektywne pochłanianie promieniowania elektromagnetycznego z tego zakresu przez odpowiednie grupy białek było podstawą konstrukcji urządzeń o nazwie Infratec firmy Tecator, w których oprócz białek ogółem oznaczana jest woda, tłuszcz i kolagen w mięsie.

1.6.5. Metody immunologiczne

Coraz częściej do oznaczania białek stosuje się metodę immunoenzymatyczną (ELISA), która polega na utworzeniu połączeń specyficznych przeciwciał z analizowanym białkiem oraz odpowiednim enzymem. Enzym ten, reagując z bezbarwnym substratem, przeprowadza go w barwny związek, którego stężenie można oznaczyć spektrofotometrycznie. Metoda ELISA jest bardzo czułą metodą, pozwalającą oznaczyć nie tylko poszczególne klasy białek w badanym produkcie, ale także określić stopień ich denaturacji. Z uwagi na to, że oznaczenie końcowe polega na pomiarze absorbancji metoda ta zaliczana jest także do metod spektrofotometrycznych.



2. Część eksperymentalna

2.1. Cel ćwiczenia

Ćwiczenie polega na oznaczaniu zawartości białka w mleku metodą spektrofotometryczną.

2.2. Odczynniki, akcesoria laboratoryjne i aparatura

a) Odczynniki:

- Roztwór kazeiny ($c = 10 \text{ mg/ml}$)
- Odczynnik miedziowy – 100 ml (w 50 ml wody rozpuścić 0,15 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ i 0,6 g winianu sodowo-potasowego ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times \text{H}_2\text{O}$); wolno, ciągle mieszając, dodać 30 ml 10% NaOH wolnego od węglanów i 0,2 g KI; uzupełnić do 100 ml wodą dejonizowaną (KI chroni jony miedzi przed autoredukacją)

b) Akcesoria laboratoryjne:

- wialki 10 ml – 20 szt.
- pipeta automatyczna 1-100 μl – 1 szt.
- pipeta automatyczna 0,1-1 ml – 1 szt.
- końcówki do pipet
- pipeta szklana 5 ml. – 1 szt.
- pipeta pasteurera – 10 szt.
- tuby wirówkowe – 4 szt.
- strzykawki + filtry strzykawkowe – 4 szt.

c) Aparatura analityczna

Spektrofotometr UV/Vis Beckman DU® 650 spectrophotometer (Beckman, CA, USA).

2.3. Przygotowanie krzywej wzorcowej

- 1) Z roztworu podstawowego kazeiny o stężeniu 10 mg/ml przygotować roztwory robocze (w wodzie dejonizowanej) o objętości 1 ml na dziesięciu poziomach stężeń: 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml;
- 2) Do każdej próbki dodać 4 ml odczynnika miedziowego, wymieszać i odstawić na 30 min w temperaturze pokojowej;
- 3) Zmierzyć absorbancję przy długości fali $\lambda = 540 \text{ nm}$ wobec odczynnika miedziowego.



Analiza Żywności

2. Oznaczanie zawartości białka w mleku metodą spektrofotometryczną

2.4. Przygotowanie próbek mleka do analizy

- 1) Badane mleko rozcieńczyć wodą dejonizowaną 10-krotnie.
- 2) Do 1 ml rozcieńczonego mleka dodać 4 ml odczynnika miedziowego, wymieszać i odstawić na 30 min w temperaturze pokojowej;
- 3) Zmierzyć absorbancję przy długości fali $\lambda = 540$ nm wobec odczynnika miedziowego (jeśli próbka będzie mętna to przed analizą należy ją odwirować lub przefiltrować z użyciem filtrów strzykawkowych).

2.5. Opracowanie wyników

- na podstawie wyników uzyskanych podczas analizy roztworów wzorcowych wykreślić wykres zależności odpowiedzi detektora od stężenia kazeiny w roztworze (wyznaczyć współczynnik determinacji (R^2) oraz równanie prostej)
- wykorzystując równanie prostej obliczyć stężenie białka w badanym mleku, wynik wyrazić w gramach białka na 100 ml produktu (g/100 ml)

3. Literatura:

- Sikorski Zdzisław E. (red.), *Chemia Żywności*, wyd. 4, WNT, Warszawa, 2002.
- Klepacka Mirosława (red.), *Analiza żywności*, Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa 2005.
- Małecka Maria (red.), *Wybrane metody analizy żywności*, Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, Poznań, 2003.
- Budślawski Józef., Drabant Z., *Metody analizy żywności*, WNT, Warszawa 1972.

4. Informacje dodatkowe

Zakres informacji, które student powinien umieć, aby móc uczestniczyć w zajęciach:

- definicja, struktura, właściwości i podział białek
- charakterystyka białek występujących w mleku i innych produktach spożywczych
- metody oznaczania białka w mleku
- metoda krzywej kalibracyjnej – definicja, sposób przygotowania, sposób obliczania
- spektrofotometria UV-Vis – zasada działania, prawo Lamberta-Beera

Przydatna literatura:

- Literatura spisana w Rozdziale 3.
- Stepnowski P., Synak E., Szafranek B., Kaczyński Z., „Techniki Separacyjne”, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, 2010