

Kismennyiségű fehérjetartalom meghatározása borokban a biuret reakcióval megkötött réztartalom alapján

MOLNÁR ISTVÁN

Szőlészeti és Borászati Kutató Intézet, Budapest

Érkezett: 1981. november 4.

A fehérjetartalom meghatározására kidolgozott módszer a peptidlánc szelektív meghatározásán alapul. A meghatározás lényege, hogy a fehérje a biuret reakcióban sztöchiometrikus mennyiségben köt meg rezet. A meg nem kötött rezet Sephadex G-25 gélen abszorpcióval megkötjük és a fehérjéhez kötött rezet atomabszorpciós spektrofotometriával meghatározzuk. A nem fehérje természetű anyagok a meghatározást csak abban az esetben zavarják, ha redukálják a biuret reagenst vagy komplexet képeznek a rézzel. A borokban levő kis mennyiségű fehérje meghatározására a módszer alkalmas, ha a meghatározást megelőzően a mintából eltávolítjuk a biuret reagenst redukáló anyagokat.

A fehérjék különleges fizikai és kémiai tulajdonságainak alapján számos analitikai módszert dolgoztak ki meghatározásukra. Egyik módszer sem mentes a belső bizonytalanságoktól és a külső zavaró hatásokra való érzékenységtől. A vizsgálati eredmények jelentős mértékben függenek a választott módszertől. A fehérjék mennyiségi meghatározását megnehezíti, hogy az egyes fehérjék nagymértékben eltérnek egymástól olyan tulajdonságaik tekintetében, amelyek alapján analitikai meghatározásuk történik. Természetes, hogy azok a legmegbízhatóbb meghatározási módszerek, amelyek a minden fehérjére jellemző közös tulajdonságokat hasznosítják.

Ilyen tulajdonság a fehérjék nitrogéntartalma és ritka kivételtől eltekintve, a peptidlánc rézimegkötő képessége alkalikus közegben. A biuret reakció gyakran nem elég érzékeny.

A fehérjék meghatározhatók az ultraibolya-tartományban való fényelnyelésük alapján is, de csak tiszta, zavaró anyagoktól mentes oldataikban. A Lowry (1) által kidolgozott módszer nagyon érzékeny, de hasonlóképpen érzékeny a zavaró hatásokra is.

A biuret módszert Nielsen (2) módosította oly módon, hogy érzékenységből összemérhetővé vált a Lowry módszer érzékenységgel. Westley és Lambeth (3) további módosításokat végzett a módszeren, majd Klungsöyr (4) alkalmazta a gél-szűrést a biuret reakciót követően főlegesen maradt réz eltávolítására. Klungsöyr módszerére alapozva Goldberg (5) dolgozott ki egy ultraérzékeny fehérjemeghatározási módszert, amely 0,01 és 0,2 g/cm³ fehérjekoncentráció tartományban használható. Doetsch és Gadsden (6) írt le egy nagyon érzékeny fehérjemeghatározási módszert biológiai eredetű mintákra, amelyben ugyancsak a biuret reakcióban megkötött rezet határozta meg spektrofotometriásan, miután gél-szűréssel eltávolította a biuret reakcióban meg nem kötött rezet.

A borok fehérjetartalmának meghatározására kidolgozott módszeren a biuret reakción és a reakciót követően a fehérjéhez nem kötött rézfőlösi gél-sűrítéssel való eltávolításán alapul. A borokban levő fehérje mellől alkoholos kicsapással el-távolítottam a meghatározást zavaró anyagokat, a fehérjét réz komplex formába vittem. A réz-fehérje komplexet Sephadex oszlopon átengedve elválasztottam a felesleges réz ionoktól és a fehérje által sztöchiometrikusan megkötött rezet atom-abszorpciós spektrofotometriával határoztam meg.

Anyagok és módszerek

Üvegből készült, 10 cm hosszú és 0,9 cm belső átmérőjű kromatográfiai oszlop, kis holt térfogattal. Sephadex G-25 médium típusú dextrán gél (Pharmacia, Uppsala) Biuret reagens: a reagenst a *Weichselbaum* (7) reagens módosításával készítettem. A reagens nátriumhidroxid koncentrációja 1,0 mól/liter.

NaKC ₄ H ₄ O ₆ · 4H ₂ O	60 g
NaCH	40 g
CuSO ₄ · SH ₂ O	15 g
KI	5 g
Desztillált vízzel 1 literre hígítva.	

Nátriumhidroxid oldat: 0,2 M

Kénsav oldat: 0,2 M

Bovin szérin albumin (Sigma)

1 mg/cm³ koncentrációjú törzsoldat, amelyet 1 mg/liter nátriumazid hozzáadásával sötét üvegben hűtőszekrényben tároltam. A standard oldatokat a 20–500 mg/liter koncentrációjú tartományban a törzsoldatból hígítással állítottam elő. A hígítást 0,2 M koncentrációjú nátriumhidroxiddal végeztem.

A fehérje elválasztása a meghatározást zavaró anyagoktól alkoholos kicsapással:

50 cm³ vizsgálandó oldathoz 1 cm³ 10 százalékos sósavat és 180 cm³ 96 százalékos etilalkoholt adtam, 3 óráig állt, majd 3,9 cm³ 9 százalékos nátriumsulfát oldatot és 15 cm³ 96 százalékos etilalkoholt adtam hozzá és 4 óráig állni hagytam, utána szűrtem és mostan a következő mosófolyadékkal: 410 cm³ 96 százalékos etilalkohol, 82 cm³ desztillált víz, 10 cm³ 9 százalékos nátriumsulfát oldat és 5 cm³ 10 százalékos sósav. A szűrőpapír megszikkadása után a szűrőpapíron levő csapadékot földoldottam 50 cm³ 0,2 M NaOH oldatban oly módon, hogy az oldatot 15 percig 60 °C melegítettem keverés nélkül, enyhe rázogatóssal. A szobahőmérsékletre hűtött oldatból végeztem a meghatározást.

Géloszlop készítése: A 10 × 0,9 cm-es kromatográfiai oszlopba előzetesen 0,2 M NaOH oldatban duzzasztott Sephadex G-25 típusú gél-töltöttem 6 cm-es ágy-magasságig. A gélyágon keresztülengedtem 12 cm³ 0,2 M nátriumhidroxid oldatot és a folyadékszintet leengedtem a gélyág felszínéig.

Biuret reakció: A nátriumhidroxid oldatban oldott mintákból 5 cm³-t egy 25 cm³-es csiszoltdugós üvegedénybe pipettáztam, hozzáadtam 5 cm³ biuret reagent és állni hagytam szobahőmérsékleten 15 percig.

A fehérjéhez nem kötött réz eltávolítása: A reakcióelegyből 2 cm³-t felvittem a gélyág tetejére és a lecsepegő oldatot egy 10 cm³-es körjeles csiszolt dugós kémcsőbe gyűjtöttem. Az oldat lecsepegése után még 3 × 2 cm³–0,2 M nátriumhidroxid oldatot engedtem át a gélen és a lecsepegő oldatot ugyanabban a kémcsőbe fogtam föl. A kémcsövet ezután 0,2 M nátriumhidroxid oldattal jelig töltöttem.

A fehérjéhez kötött réz meghatározása: A meghatározást az Instrumentation Laboratory 751 típusú atomabszorpciós spektro-fotométerével végeztem kétsuga-

A fehérjéhez kötött réztartalom és a réztartalomból számított BSA koncentráció középértéke és szórása

BSA standard mg/l	Mért réztartalom középértéke és az adatok szórása (S) ppm	A számított BSA koncentráció és a szórás mg/l
0	0,082±0,010	
20	0,235±0,010	18± 2
40	0,385±0,012	37± 2
50	0,468±0,014	48± 2
60	0,532±0,014	57± 2
80	0,699±0,018	79± 2
100	0,834±0,022	96± 2
200	1,610±0,034	197± 3
300	2,300±0,051	287± 6
400	3,019±0,065	381± 8
500	4,024±0,091	512±12

ras üzemmódban 324,7 nm-es hullámhosszon. A mérések statisztikus kiértékelését a készülékbe épített mikroprocesszor végezte el.

A géloszlop regenerálása: A gélágyon 5 cm³-es részletekben 25 cm³ 0,2 M kén-savoldatot engedtem át. A savas eluciót követően 12 cm³ 0,2 M nátriumhidroxid oldattal regeneráltam az oszlopot.

Eredmények

Bovin szérum albuminra (BSA) vonatkoztatva meghatároztam a módszer statisztikus jellemzőit. Az 1. táblázat tartalmazza a 0–500 mg/liter koncentrációjú BSA standardok által megkötött réztartalmat a standard szórást 15 meghatározásból számolva, ppm-ben kifejezve.

A mérési adatokból kiszámítottam a fehérje és az általa megkötött réz mennyisége közötti összefüggést. Az összefüggés a 0 és 500 mg/liter fehérjekoncentráció között lineáris és a

$$\text{Cu mg/l} = 0,092 + 0,0077 \text{ mg/l BSA} \quad (1)$$

regressziós egyenlet írja le, amelynek korrelációs koefficiense $r = 0,9960$. A BSA által megkötött rézmennyiségből a

$$\text{mg/l BSA} = (130 \pm 3) \text{ ppm Cu} - 10 \quad (2)$$

egyenlettel fejezhető ki a fehérjetartalom.

A 2. táblázat tartalmazza a mért és az (1) összefüggéssel számított réz mennyiségét, valamint a különbségüket ppm-ben kifejezve, továbbá a mért réztartalomból a (2) összefüggéssel számított fehérjekoncentrációt, valamint a számított réztartalomból a (2) egyenlettel számított fehérjetartalmat. A táblázat utolsó oszlopa a BSA standardok által átfogott koncentrációtartományban. A mért és számított fehérjetartalom eltérése nem számottevő. A módszerrel meghatároztam különböző borok fehérjetartalmát a BSA standardra vonatkoztatva. A réztartalmat a megfelelően hígított mintákból határoztam meg. Az öt ismétlésben végzett meghatározások eredményét és statisztikus értékelését a 3. táblázat tartalmazza.

A fehérjéhez kötött réztartalom és a réztartalomnak megfelelő BSA koncentráció mért és számított értékei

BSA standard mg/l	Réztartalom ppm		BSA tartalom mg/l	
	mért	számított	mért	számított
20	0,235	0,240	18	21
40	0,385	0,390	37	41
50	0,468	0,465	48	52
60	0,532	0,539	57	60
80	0,699	0,689	79	82
100	0,834	0,837	96	99
200	1,610	1,582	197	200
300	2,300	2,320	287	290
400	3,019	3,070	381	384
500	4,024	3,815	512	515

3. táblázat

Borok BSA-ra vonatkoztatott fehérjetartalmának átlagértékei és a meghatározás szórása

A bor megnevezése	A réztartalom középtérke és a szórása ppm	A fehérjetartalom középtérke és a szórás mg/l
1. Kecskeméti Furmint	0,739±0,025	86±3
2. Badacsonyi Olasz-rizling	0,778±0,026	91±3
3. Kecskeméti Olasz-rizling	0,831±0,025	95±3
4. Kecskeméti Tramini	0,906±0,027	107±3
5. Kecskeméti Sanvignon	0,941±0,029	112±4
6. Kecskeméti Zöldszilváni	1,015±0,031	122±4
7. Badacsonyi Rizlingszilváni	1,031±0,035	124±4
8. Kecskeméti Olasz-rizling	1,052±0,036	127±5
9. Badacsonyi Tramini	1,119±0,036	135±5
10. Pécsi Olasz-rizling	1,157±0,040	140±5
11. Pécsi Furmint	1,245±0,042	152±5
12. Pécsi Tramini	1,405±0,045	173±6
13. Tokaji Furmint	1,491±0,045	184±6
14. Tokaji Hárslevelű	1,670±0,047	207±6
15. Tokaji Szamorodni	1,887±0,049	235±6

Következtetések

A lúgos közegben tartaráttal oldatban tartott kétértékű réz ionokat a poliszacharidok, mint a dextrán alapú Sephadex gél, abszorpcióval megkötik *Klungsoyr*, (1), de nem adszorbeálják a fehérjéhez komplexben kötött rezet. Ily módon a biuret reakció végbemenetele után Sephadex gélen való gélzúréssel elválasztható a fehérjéhez komplexen kötött rézből a reagensben levő rézfőlösleg. Abban az esetben, ha a fehérjét nem tartalmazó biuret reagenst engedtem át a gélágyon az adott meghatározási körülmények között állandó 0,080–0,085 ppm réznek megfelelő volt az eluátum réztartalma, amely az elucióhoz használt lúgból származott. Az alkalmazott mennyiségű és összetételű biuret reagensben levő réz elegendő volt ahhoz, hogy teljesen végbemenjen a fehérje-réz komplex képződése, nagy réztartalmú reagens használata fölöslegesen terhelte az oszlopot. A meghatározás előtt

viszont el kell távolítani a mintából minden olyan vegyületet, amely lúgos közegben redukálja a kétértékű rézionokat, hasonlóan zavarják a meghatározást a négy-nél több aminosavat tartalmazó peptidek. A zavaró anyagoktól legcélszerűbben a fehérjék alkohollal való kicsapásával lehet megszabadulni. A kicsapott fehérjék lúgos oldással mennyiségi változás nélkül oldatba vihetők.

A fehérjéhez komplexen kötött réz meghatározására megelőzően a réz nátriumdiethyltiokarbamáttal való reakciója eredményeképpen keletkező szintermék spektrofotometriás meghatározását használtam (Molnár, 1978). A réz atomabszorpciós spektrofotometriával való meghatározása érzékenyebb, pontosabb, kisebb szórási módszer, mint a spektrofotometriás és a réz koncentrációja 0,2 és 4, Opm tartományban határozható meg. Bovin szérum albuminra vonatkoztatva a 20–500 mg/liter koncentrációtartományban mérhető a fehérjetartalom. Az eredmények alapján 1 mg BSA 0,083 mg rézhez kötött meg, azaz 12,6 mg BSA kötött meg 1 mg rézet. Klungsöyr (4) és Doetsch (6) szerint az egyes fehérjék réz komplexeiben 10 mg körüli fehérjemennyiségre jut 1 mg réz, vagyis ez azt jelenti, hogy a fehérjét alkotó aminosavak és a megkötött rézionok számaránya nagyobb, mint négy. Strickland (8) szerint ez az állítás nem mond ellent a fehérje – biuret komplex kvaterner szerkezetének, mivel nagyon lúgos oldatban a peptidkötéseknek a kétharmada vesz részt a réz komplex képzésben, a maradék peptidkötés a föltekeredett (random) szerkezetet stabilizálja. Fontos tehát a megfelelően magas alkáli koncentráció, amely biztosítja a fehérje natív formából a random formába való gyors átalakulását.

A lúgos fehérje-réz komplex képződése a polipeptid lánc tulajdonsága és a meghatározás eredményét kevésbé befolyásolja a fehérje összetétele mint az egyéb fehérjemeghatározási módszerekkel kapott eredményeket. Végeredményben a réztartalom mérésére visszavezetett meghatározás rendelkezik a biuret módszer előnyeivel, ugyanakkor kiküszöböli annak egyetlen hátrányát, az érzéketlenségét. A módszer feltehetően alkalmas egyéb élelmiszerekben levő kis mennyiségű fehérjetartalom meghatározására.

I R O D A L O M

- (1) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, L., Randall, R. J.: J. Biol. Chem, 193. 265, 1951.
- (2) Nielsen, H.: Acta Chem. Scand. 12, 38, 1958.
- (3) Westley, J., Lambeth, J.: Biochim. Biophys Acta 40, 364, 1960.
- (4) Klungsöyr, L.: Anal. Biochem. 27. 91, 1969.
- (5) Goldberg, M. L.: Anal. Biochem. 51, 240, 1973.
- (6) Doetsch, K., Gadsden, R. H.: Clin Chem. 19, 1170, 1973.
- (7) Weichselbaum, T. E.: Amer. J. Clin. Pathol. 16, 40, 1946.
- (8) Strickland, R. D., Preeman, M. L., Gurule, F. T.: Anal. Chem. 33, 545, 1961.
- (9) Molnár I.:

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕБОЛЬШОГО КОЛИЧЕСТВА БЕЛКА В ВИНАХ НА ОСНОВАНИИ БИУРЕТЕВОЙ РЕАКЦИИ СВЯЗАННОГО СОДЕРЖАНИЯ МЕДИ

И. Молнар

Метод разработанный для определения содержания белка основывается на селективном определении пептидо. Суть определения заключается в том, что белок в биуретовой реакции связывает медь в стехиометрическом количестве. Несвязанный медь связываем абсорпцией на Сефадексе Геле Г-25 а медь связанной к белку определили спектрофотометрической абсорпцией. Небелковые вещества только в том случае мешают определению если они редуцируют биуретовый реагент или если составляют комплекс с медью. Метод

соответствует для определения небольшого количества белка в вине в том случае, если до определения из образца удалим биуретовый реагент редуцирующее вещество.

BESTIMMUNG GERINGER MENGEN VON PROTEINEN IN WEINEN AUF GRUND DES MITTELS DER BIURETREAKTION GEBUNDENEN KUPFERGEHALTES

I. Molnár

Die zur Bestimmung des Proteingehaltes entwickelte Methode gründet sich auf die selektive Bestimmung der Peptidkette. Das Wesen der Bestimmung besteht darin, dass das Protein in der Biuretreaktion eine stöchiometrische Menge Kupfers festbindet. Die Menge des nicht gebundenen Kupfers wird sodann an Sephadex G-25 Gel durch Absorption gebunden, und das an Protein gebundene Kupfer mittels Atomabsorptionsspektrophotometrie bestimmt. Diese Bestimmung wird durch Substanzen nichtproteinischer Natur nur dann gestört, wenn das Reagens durch sie reduziert wird oder wenn sie mit dem Kupfer eine Komplexverbindung bilden. Die Methode ist zur Bestimmung der in den Weinen vorkommenden geringer Mengen von Proteinen geeignet, falls man vor der Bestimmung jene Substanzen vom Muster entfernt, die das Biuretreaagens reduzieren können.

DETERMINATION OF LOW PROTEIN CONTENTS IN WINES ON THE BASIS OF THEIR COPPER CONTENT BOUND BY MEANS OF THE BIURET REACTION

I. Molnár

The method developed for the determination of the protein content is based on the selective determination of the peptide chain. The determination consists essentially in the binding of copper by the protein in a stoichiometric amount during the biuret reaction. The copper amount which has not been bound is then bound on Sephadex G-25 gel by absorption and the copper amount bound to protein determined by atomic absorption spectrophotometry. Substances of non-protein nature are interfering with this determination only in the case when they are reducing the biuret reagent or when they are forming a complex with copper. The method is suitable for the determination of the minute amounts of protein present in wines provided the substances reducing the biuret reagent are removed from the sample prior to the determination.