

Gyors fehérjemeghatározási módszer alkalmazása egyes élelmiszerek vizsgálatánál I.*

TÖRLEY DEZSŐ, NEDELKOVITS JÁNOS, ÖRSI FERENC
és GY. VADON ERIKA

Budapesti Műszaki Egyetem, Élelmiszerkémia Tanszék

Érkezett: 1972. április 18.

A Mezőgazdasági és Élelmézésügyi Minisztérium „A mezőgazdasági és élelmiszeripari nyersanyagok objektív minősítési és átvételi rendszereinek kiszélesítése és továbbfejlesztése” c. kutatási célprogramjának keretében foglalkozunk a gyors fehérjemeghatározási módszerek alkalmazásával. A cél az időigényes roncsolásos eljárások helyett olyan műszeres módszerek alkalmazása, amelyek gyorsan és könnyen kivitelezhetőek: kísérleti munkánk során a Folin – Ciocalteu reagenst alkalmazó – Lowry és munkatársai nevéhez fűződő módszert, a biuretreakción alapuló módszert és a színezékmegkötéses eljárást alkalmaztuk különböző terményekre és élelmiszeripari nyersanyagokra. Jelen beszámolóinkban egyes gabonaféléken és őrleményeken a Folin-reagenssel, valamint a biuret-reagenssel elért eredményekről számolunk be. Vizsgálataink során meghatároztuk búzalisztek, búzalisztből készített sikkérliszt, árpadara és kukoricadara vízben oldódó, alkoholban oldódó és összes fehérjetartalmát.

KÍSÉRLETI RÉSZ

1. Vizsgált anyagok

BFF 55	búzaliszt
BL 55	búzaliszt
BL 51	búzaliszt
sikkérliszt	(BL 112 búzalisztből készült)
árpadara	
kukoricadara	

A vizsgálati anyagokat a kereskedelemből szereztük be; általában 5–5 párhuzamos meghatározást végeztünk.

2. Fehérjetartalmú kivonatok készítése

2.1. *Vízben oldódó fehérje:* 1 g vizsgálandó őrleményt desztillált vízzel 30 percig rázógépen extraháltunk, majd 100 ml-re feltöltés után centrifugáltuk. A centrifugálással kapott tiszta oldat fehérjetartalmát határoztuk meg.

* A KÉKI 1972. március 31-i tudományos kollokviumán elhangzott előadás (Szerk.).

2.2. *Alkoholban oldódó fehérje.* 1 g vizsgálandó őrleményt 70%-os etil-alkohollal 30 percig rázógépen extrahálunk, majd 100 ml-re feltöltés után centrifugáljuk. A centrifugálással kapott tiszta oldat fehérjetartalmát határozzuk meg.

2.3. *Összes fehérje.* 1 g őrleményt 100 ml-es mérőlombikban 4 ml CCl_4 -dal megnedvesítünk, majd hozzáadunk 10 ml 1 n NaOH oldatot és a ledugaszolt lombikot 15 percig 60 °C-os termosztátba helyezzük, utána feltöltjük szóda-oldattal, mely 100 ml 2%-os Na_2CO_3 és 2 ml 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ és 1% KNa-tartarátot tartalmazó oldat elegye. 15 percig 3000 fordulát/perc sebességgel centrifugáljuk, és a tiszta oldat fehérjetartalmát határozzuk meg.

Valamivel időigényesebb, de a biuret-reakcióhoz tisztább oldatot kapunk, ha centrifugálás helyett előre megnedvesített szűrőpapíron szűrjük a kivonatot.

3. Eljárások

3.1. Lowry módszer (1)

Szükséges oldatok:

Folin–Ciocalteu reagens. Készítése: 1,5 literes lombikban 100 g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 25 g Na-molibdenát-dihidrát, 700 ml víz, 50 ml 85%-os foszforsav és 100 ml cc. HCl elegyét 10 óráig visszacseppegő hűtővel forraljuk. Hozzáadunk 150 g litium-szulfátot, 50 ml H_2O -t és néhány csepp brómos vizet. 15 perces – hűtő nélküli – forralással eltávolítjuk a felesleges brómot, lehűlés után vízzel feltöltjük 1 literre, majd szűrjük (az oldat ne legyen zöldes színű). A reagens savtartalmát 1 n NaOH-dal meghatározzuk fenolftalein jelenlétében; szükség esetén 1 n savtartalmúra hígítjuk desztillált vízzel.

Eljárás: 0–0,38 mg nitrogén tartalmú 0–10 ml fehérjeoldatot, mely NaOH-ra nézve 0,1 n koncentrációjú, és tartalmazza az 1.3. pontban leírt feltöltő-oldat vegyszereit megfelelő koncentrációban, kémcsőbe pipettázunk, és – szükség esetén – kiegészítjük térfogatát 10 ml-re olyan oldattal, mely az említett vegyszereket ugyanolyan koncentrációban tartalmazza. (Ha még nem alakult volna ki a réz-komplex, 10 percig állni hagyjuk, mielőtt a reagenssel elegyítenénk.) Hozzáadunk 1,00 ml 1 n savtartalomra hígított *Folin–Ciocalteu* reagenst, összerázzuk és szobahőmérsékleten 30 percig állni hagyjuk. A reagens hozzáadásától számított 30–120 perc között mérjük az oldat extinkcióját 750 nm-nél, vakpróbával szemben, melyet a mintával egyidejűen készítünk 10 ml – a minta feltöltésére használt – oldatból és 1 ml *Folin–Ciocalteu* reagensből.

A nitrogéntartalom kalibrációs görbéből olvasható le, melyet különböző hígítású kivonatokkal készítettünk el, s amelyeknek ismerjük a Kjeldahl szerint meghatározott nitrogéntartalmát. Használható számításra a regressziós egyenes is.

3.2. Biuret-módszer (2)

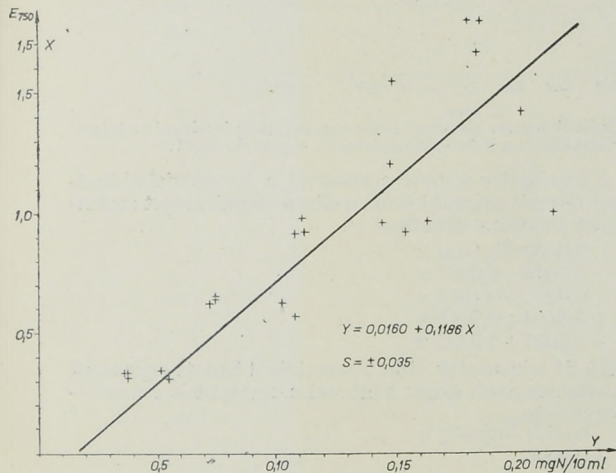
A biuret-reagens készítése: 400 ml 0,2 n NaOH-ban feloldunk 9,0 g KNa-tartarátot, azután 3,0 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ -t és 5,0 g KJ-ot; a kapott oldatot 0,2 n NaOH-dal 1000 ml-re töltjük fel.

Eljárás: 2 ml fehérjeoldatot elegyítünk 15 ml biuret-reagenssel, 30 percig 37 °C-on állni hagyjuk, majd 550 nm-nél mérjük az oldat extinkcióját. A nitrogéntartalmat kalibrációs görbéből kapjuk meg, melyet a Kjeldahl szerint meghatározott nitrogéntartalom és a különböző ismert hígítású oldatok biuret-reagenssel meghatározott extinkcióértékei alapján készítünk el.

EREDMÉNYEK

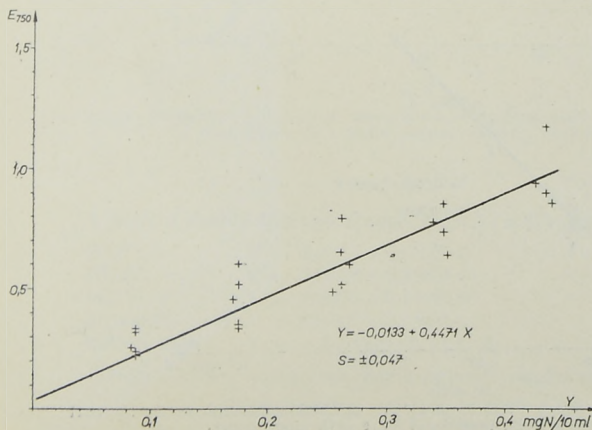
A vizsgálati eredményekből látható, hogy a Lowry-módszer alkalmazásakor az egyes fehérje-típusoknak (vízben, alkoholban, ill. lúgban oldódó) megfelelő egyenesek meredeksége eltér. Így pl. a sikérliszt esetében

a vízdoldható frakcióra	$Y = 0,0160 + 0,1186 X$
az alkoholban oldódó frakcióra	$Y = -0,0133 + 0,4471 X$
a lúgban oldódó (összes N) frakcióra	$Y = 0,0037 + 0,3064 X$
a regressziós egyenes egyenlete, a szórás	$S_Y: \pm 0,035$
	$S_A: \pm 0,047$
	$S_L: \pm 0,011$



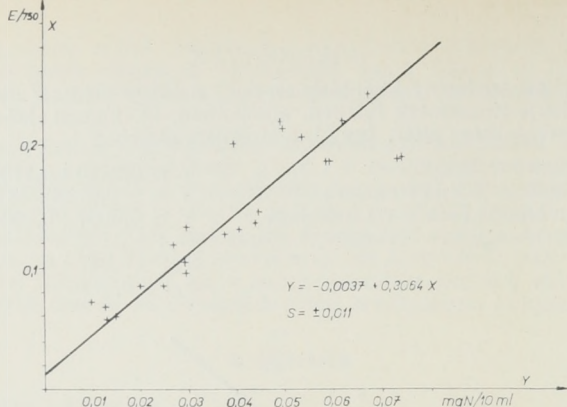
1. ábra

Összefüggés a BL-112 búzalisztból készített sikérliszt vizes extraktjában Kjeldahl-eljárással meghatározott N-tartalom és a Folin-reagenssel mért extinkció között



2. ábra

Összefüggés a BL-112 búzalisztból készített sikérliszt alkoholos extraktjában Kjeldahl-eljárással meghatározott N-tartalom és a Folin-reagenssel mért extinkció között



3. ábra

Összefüggés a BL-112 búzalisztból készült sikérliszt lúgos extraktjának Kjeldahl-eljárással meghatározott N-tartalma és a Folin-reagenssel mért extinkció között

Jelentősen eltérnek a sikérlisztre kapott értékektől a kereskedelmi liszt-fajták kalibrációs egyenesei, de ezek egymás között is eltérő meredekséget mutatnak. Így pl. a vízben oldódó frakcióra vonatkozóan

BFF 55 $Y = 0,0032 + 0,1029 x$

BL 55 $Y = 0,0044 + 0,0951 x$

BL 51 $Y = 0,0055 + 0,1019 x$

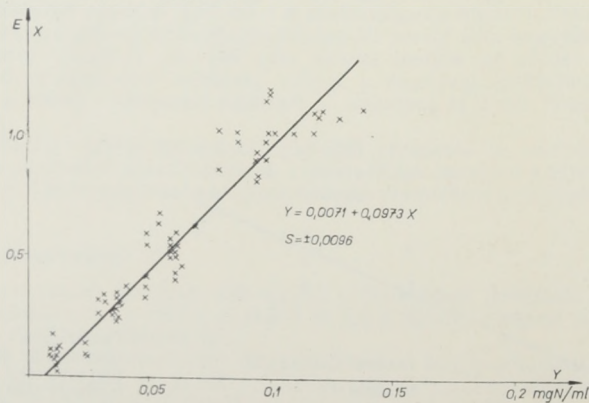
árpadara $Y = -0,0104 + 0,2615 x$

kukoricadara $Y = -0,0031 + 0,2383 x$

A BFF 55, BL 55 és BL 51 búzalisztek vizes kivonatainál kapott egyenesek meredeksége közel áll egymáshoz, ezért közös kalibrációs egyenest is számítottunk (4. ábra), melynek egyenlete

$$Y = 0,0071 + 0,0973 x$$

szórása $S = \pm 0,0096.$



4. ábra

Összefüggés különböző búzalisztek vizes kivonataiban Kjeldahl-eljárással meghatározott N-tartalom és a Folin-reagenssel mért extinkció között

Az árpadara, a kukoricadara és a sikérliszt b értékei jelentősen eltérnek, így közös kalibrációs egyenest nem számítottunk ki.

Az alkoholos kivonatok vizsgálatánál kapott kalibrációs egyenesek:

$$\text{BFF 55.} \quad Y = 0,0146 + 0,1688 x$$

$$\text{BL 55} \quad Y = 0,0173 + 0,1807 x$$

$$\text{BL 51} \quad Y = 0,0093 + 0,2207 x$$

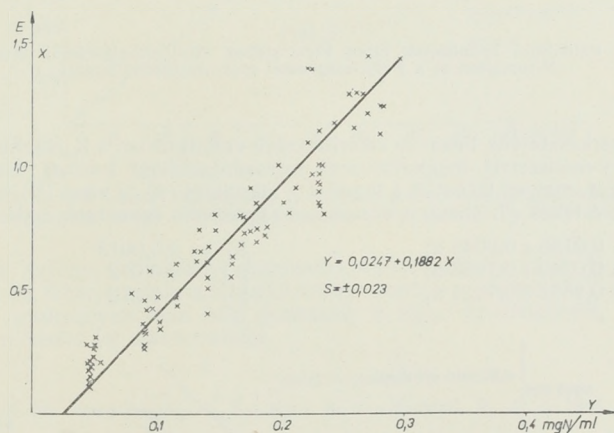
$$\text{árpadara} \quad Y = 0,0144 + 0,2168 x$$

$$\text{kukoricadara} \quad Y = 0,0030 + 0,2499 x$$

A búzalisztekre vonatkozó közös egyenes adatai (5. ábra)

$$Y = 0,0247 + 0,1882 x$$

$$S \pm = 0,023$$



5. ábra

Összefüggés különböző búzalisztek alkoholos kivonataiban Kjeldahl-eljárással meghatározott N-tartalom és a Folin reagenssel mért extinkció között

A lúgban oldódó frakciók (összes fehérje) kalibrációs egyenesei:

$$\text{BFF 55} \quad Y = 0,0015 + 0,0939 x$$

$$\text{BL 55} \quad Y = 0,0098 + 0,1079 x$$

$$\text{BL 51} \quad Y = 0,0079 + 0,1139 x$$

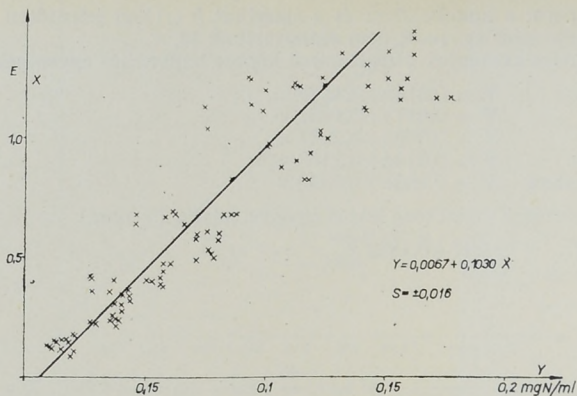
$$\text{árpadara} \quad Y = 0,0110 + 0,1359 x$$

$$\text{kukoricadara} \quad Y = -0,0086 + 0,1159 x$$

A búzalisztekre vonatkozó közös egyenes adatai (6. ábra).

$$Y = 0,0067 + 1030 x$$

$$S = \pm 0,016$$



6. ábra

Összefüggés különböző búzalisztek lúgos kivonatában Kjeldahl-eljárással meghatározott N-tartalom és a Folin-reagenssel mért extinkció között

Megszerkesztettük búza- és sikkérlisztekre vonatkozóan a Kjeldahl-eljárással és a Lowry-módszerrel meghatározott nitrogéntartalom közötti összefüggést mutató ábrát, melyen láthatók a lúgos (L), alkoholos (A) és vizes (V) kivonatokkal kapott értékek (7. ábra); a vonatkozó regressziós egyenesek egyenletei:

$$Y_L = 0,0150 + 0,9646 x;$$

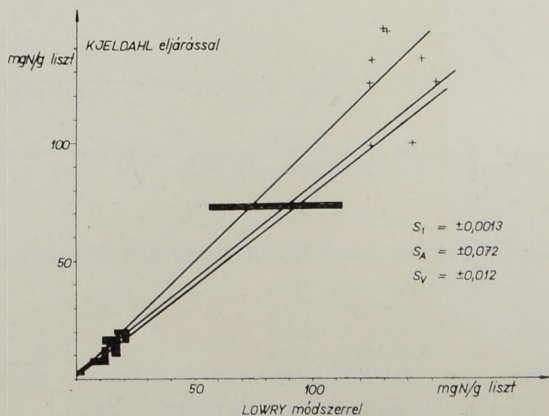
$$S_L = \pm 0,0013$$

$$Y_A = 0,0249 + 0,7808 x;$$

$$S_A = \pm 0,072$$

$$Y_V = 0,9551 + 0,7824 x;$$

$$S_V = \pm 0,012$$



7. ábra

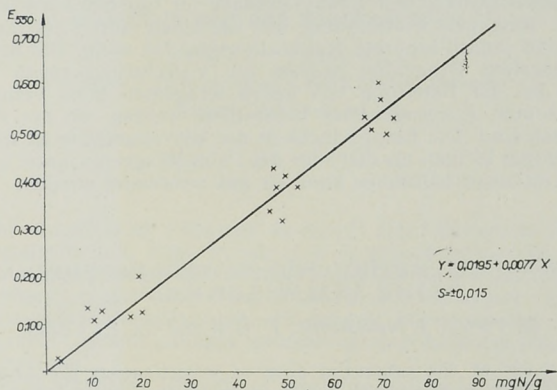
Összefüggés a Kjeldahl-eljárással és a Lowry-módszerrel meghatározott N-tartalom között

Az ábrán — ahol a nagyszámú mérési eredmény az egyes észlelt pontok jelölését nem tette lehetővé — csak a kérdéses területet jelöltük, ahová az adatok esnek.

A biuret-reagenssel kapott eredményeket a 8. ábra szemlélteti; a regressziós egyenes adatai

$$Y = 0,0195 + 0,0077 x$$

$$S = \pm 0,015$$



8. ábra

Összefüggés a lisztek vízben, alkoholban és lúgban oldódó fehérjetartalmának Kjeldahl-eljárással meghatározott N-tartalma és a biuret reagenssel mért extinkció között

Ez az egyenes valamennyi kivonatra vonatkozik; a vizes és alkoholos kivonatok kis fehérjetartalma következtében azonban a kis extinkció-értékeknél leolvasott eredmények nem elég pontosak; a lúgos kivonatoknál, ill. sikérlisztnél a módszer jól alkalmazható.

IRODALOM

- (1) Lowry, O. H.—Rosenbrough, N. J.—Farr, A. L.—Randall, R. J.: J. Biol. Chem. 193, 265, 1951.
- (2) László R.—Törley D.: Élelmiszerkémiai és technológiai gyakorlatok. Budapest. 1971.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА БЫСТРОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА ПРИ ИССЛЕДОВАНИЯХ НЕКОТОРЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ. I.

Д., Тёрлеи Й., Неделкович Ф. Ёрши и Е. Вадон

Авторы на основании полученных результатов испытаний установили, что метод LOWRY применим при определении белков зерновых культур, особенно при пшеничных муках, но для определения растворяющихся по разному фракций необходимы отдельные калибрационные прямые. При изготовлении реагента Folin — Ciocalteu необходимо точно соблюдать указания, а при изготовлении нового реагента необходимо проверять его известным белоксодержащим раствором, что идентичны ли значения экстинкций.

Чувствительность метода биурет почти на два величены меньше, чем реагента Фолина; хорошо применим при соответствующих условиях концентрации.

ANWENDUNG EINER SCHNELLMETHODE ZUR BESTIMMUNG
VON EIWEISSSTOFFEN BEI DER UNTERSUCHUNG
EINZELNER LEBENSMITTEL I.

D. Törley, J. Nedelkovits, F. Örsi und Gy. E. Vadon

Die Verfasser stellten aufgrund ihrer mitgeteilten Versuchsergebnisse die allgemeine Anwendbarkeit der Lowry-Methode für Getreidearten, insbesondere Weizenmehle fest; zur Bestimmung der einzelnen unterschiedlich löslichen Fraktionen sind jedoch separate Kalibrationsgeraden nötig. Bei der Bereitung des Folin-Ciocalteu Reagenten müssen die Vorschriften genau eingehalten werden und bei der Bereitung von neuen Reagenten muss vermittle einer Lösung bekannten Eiweissgehaltes kontrolliert werden, ob die Extinktionswerte identisch sind. Die Empfindlichkeit der Biuretmethode ist mit fast zwei Größenordnungen kleiner, als diejenige des Folin-Reagenten; unter entsprechenden Konzentrationsverhältnissen kann sie gut verwendet werden.

USE OF A RAPID METHOD FOR PROTEIN DETERMINATION
IN THE ANALYSIS OF FOODS I.

D. Törley, J. Nedelkovits, F. Örsi and Gy. E. Vadon

On the basis of the presented data of investigation the Lowry method proved to generally applicable to cereals particularly to wheat flours. However, separate calibration straight lines are needed for the determination of certain fractions that have different solubilities. At the preparation of the Folin-Ciocalteu reagent the prescriptions must be strictly observed, and on preparing fresh batches of reagents the identity of the obtained extinction values must be checked by solutions of known protein content. The sensitivity of the biuret method is lower by about two orders of magnitude than that of the Folin reagent; under adequate conditions of concentration it can be used with success.

APPLICATION D'UNE MÉTHODE RAPIDE DE DOSAGE DES
PROTÉINES DANS L'ANALYSE DE QUELQUES DENRÉES. I.

D. Törley, J. Nedelkovits, F. Örsi et Gy. E. Vadon

Les auteurs ont, à partir de leurs résultats d'analyse publiés, établi l'applicabilité générale de la méthode Lowry pour les céréales, en particulier pour la farine de froment; afin de doser quelques fractions de solubilités différentes il y a, cependant, besoin de courbes d'étalonnage individuelles. En préparant le réactif Folin-Ciocalteu il y a lieu d'observer strictement les prescriptions et, lors de la préparation d'un nouveau réactif il faut, à l'aide d'une solution de teneur connue en protéines, contrôler l'identité des valeurs de la densité optique.