

Zastosowanie metody Lowry'ego do oznaczenia białka w cukrze białym

Dr inż. Bożena Wnuk

Mgr inż. Anna Wysocka

Seminarium „Aktualne zagadnienia dotyczące jakości w przemyśle cukrowniczym”

Łódź 10 – 11 czerwca 2014 r.

Celem badań były próby
zastosowania metody
Lowry'ego do oznaczania
białka w cukrze białym

Białko w cukrze

W badaniach Miki i współpracowników [Miki T. i in. (1984) Carbohydrate Research] wykazano, że kłaczki z napojów bezalkoholowych słodzonych cukrem trzcinowym zawierały:

- polisacharydy (23,7 – 56,4%),
 - krzemiany (24,8 – 43,2%),
 - białko (5,6 – 25,7%).

Clarke i współpracownicy [Clark (M.A. (1997) Zuckerind.] uważają, że tworzenie kłaczków może być spowodowane przyciąganiem **ujemnie naładowanych cząsteczek**, zawierających grupę karboksylową takich, jak:

- *saponiny (zawierające kwas glukuronowy)
- *kwas oleanolowy,
- *polisacharydy ścian komórkowych,

oraz **dodatnio naładowanych cząsteczek**, zawierających grupy aminowe (białka, peptydy i inne).

Badania Cartera [Carter M. (2006) Zuckerind.] wykazały w kłaczkach pochodzących z cukru białego obecność szeregu **aminokwasów**,
takich jak:

leucyna, izoleucyna, lizyna, metionina,
fenyloalanina, tyrozyna, treonina, walina,
arginina, histydyna, alanina, kwas
asparginowy, kwas glutaminowy, glicyna,
prolina, seryna i in.

Wyniki badań Cartera i Miki

[Carter M. (2006) Zuckerind., Miki T. i in. (1984) Carbohydrate Research]

potwierdzają więc, że białka są istotnym składnikiem kłaczków pochodzących z zakwaszanego roztworu cukru białego.

Metoda Lowry'ego wykorzystuje dwie cechy budowy białek: obecność wiązań peptydowych oraz obecność aminokwasów aromatycznych (tyrozyny i tryptofanu) i aminokwasu cysteiny. Jest połączeniem dwóch reakcji: reakcji biuretowej tworzenia kompleksów wiązań peptydowych z jonami miedzi w środowisku alkalicznym (wiązanie koordynacyjne jonów miedzi z dwoma sąsiednimi wiązaniami peptydowymi białka) wzmocnionej inną reakcją z odczynnikiem Folina - Ciocalteu.

W skład odczynnika Folina - Ciocalteu wchodzi **kwasy fosfomolibdenowy i fosfowolframowy**, który w obecności aminokwasów: tyrozyny, tryptofanu i cysteiny, ulega redukcji do **błękitu fosfomolibdenowego**. Stężenie powstałego barwnego kompleksu mierzy się metodą kolorymetryczną w zakresie widma widzialnego 600 – 700 nm i odczytuje stężenie białka z krzywej wzorcowej.

Materiał badawczy: cukier biały

Stosowane odczynniki w metodzie Lowry'ego

Odczynnik A – 2% (m/v) roztwór Na_2CO_3 w 0,1 M roztworze NaOH,

Odczynnik B₁ - 1% (m/v) roztwór CuSO_4

Odczynnik B₂ - 2% roztwór winianu sodowego

Odczynnik C – zasadowy roztwór miedzi, przygotowywany 30 minut przed oznaczeniem analitycznym, powstały przez zmieszanie 50 ml odczynnika A z 0,5 ml odczynnika B₁ i z 0,5 ml odczynnika B₂.

Odczynnik D – rozcieńczony wodą destylowaną odczynnik Folina –Ciocalteu w stosunku 1:1

Przygotowanie krzywej wzorcowej

Do sporządzenia krzywej wzorcowej stosowano **albuminę** (Egg Albumin, Fluka, Product of Netherlands).

Roztwór wyjściowy albuminy

0,2 g albuminy /200 ml

Następnie z tego roztworu przygotowano roztwory wzorcowe albuminy o stężeniach od 20 do 200 $\mu\text{g/ml}$.

1 ml roztworu wzorcowego

+

5 ml odczynnika miedziowego (**odczynnik C**)



po 10 minutach

+ 0,5 ml **odczynnika D** (energiczne mieszanie)



po 30 minutach

Odczyt absorbancji ($\lambda=670$ nm)

*próba odniesienia – woda destylowana 1 ml + 5 ml
odczynnika C + 0,5 ml odczynnika D*

*Przygotowanie rozcieńczeń roztworu podstawowego
cukru białego*

Roztwór podstawowy cukru

40g/100 ml



Roztwory rozcieńczone o stężeniu cukru

10 g/100 ml

15 g/100 ml

20 g/100 ml

25 g/100 ml

30 g/100 ml

35 g/100 ml

1 ml roztworu cukru

+

5 ml odczynnika miedziowego (**odczynnik C**)



po 10 minutach

+ 0,5 ml **odczynnika D** (energiczne mieszanie)



po 30 minutach

Odczyt absorbancji ($\lambda=670$ nm)

*próba odniesienia – woda destylowana 1 ml + 5 ml
odczynnika C + 0,5 ml odczynnika D*

Tabela 1. Zawartość białka w cukrze białym oznaczana metodą Lowry'ego w zależności od stężeń roztworów cukru przygotowywanych do tego oznaczenia

Stężenie cukru g/100 ml	Średnia wartość absorbancji z trzech pomiarów A_{670}	Stężenie białka (odczyt z krzywej wzorcowej) $\mu\text{g/ml}$	Zawartość białka w cukrze mg/100 g
10	0,028	12,2	12,02
15	0,026	11,16	7,44
20	0,029	12,45	6,23
25	0,036	15,46	6,20
30	0,047	20,18	6,73
35	0,057	24,48	6,99
40	0,061	26,19	6,52

Tab. 2. Badania Cartera M. zawartości białka w rafinadzie i cukrze oznaczana metodą Lowry'ego i Kjeldahla
 [Carter M. (2006) Zuckerind.]

	Zabarwienie IU	Zawartość białka mg/100g metodą	
		Lowry'ego	Kjeldahla
Rafinada	7 - 9	25,1 – 45,9	25,7 – 34,5
Cukier biały	20 - 23	14,9 – 47,4	32,1 – 45,2
Cukier B	76 - 93	55,0 – 63,1	136,7 – 138,4

Wnioski

- Metoda Lowry'ego jest prostą i szybką metodą oznaczania białka w wielu produktach, może też być zastosowana do oznaczania białka w cukrze.
- Zawartość białka w badanym cukrze białym oznaczana metodą Lowry'ego zależała od stopnia rozcieńczenia roztworów cukru przygotowywanych do tego oznaczenia i wynosiła od 12,02 mg/100 g cukru białego, przy stężeniu roztworu cukru wynoszącym 10 g/100 ml, do 6,52 mg/100 g cukru przy stężeniu cukru 40 g/100 ml roztworu .

Wnioski

- W przypadku stężeń roztworów cukru od 20 do 40 g/100 g uzyskano porównywalne wyniki oznaczeń białka w cukrze, wynoszące od 6,20 mg/100 g do 6,99 mg/100 g. Ten zakres stężenia cukru byłby odpowiedni do przygotowywania roztworów cukru przed oznaczeniem w nim białka metodą Lowry'ego
- W przypadku wprowadzenia metody Lowry'ego do analityki cukrowniczej należałoby przyjąć jedną wartość stężenia roztworu cukru przygotowywanego do oznaczania.

Wnioski

- Należy kontynuować podjęte badania w celu znalezienia ewentualnych korelacji pomiędzy zawartością białka w cukrze oznaczaną metoda Lowry'ego a np. mętnością roztworów cukru, zabarwieniem czy zawartością kłaczków w cukrze

Dziękuję