

BÍLKOVINY

▶ Kvantitativní stanovení bílkovin

- hrubá bílkovina
- čistá bílkovina
- travitelná bílkovina

▶ Stanovení aminokyselinového složení bílkovin

- esenciální aminokyseliny
- reaktivní kyseliny
- limitující aminokyseliny

STANOVENÍ HRUBÝCH BÍLKOVIN

1. NEPŘÍMÉ METODY

založené na stanovení anorganického dusíku v mineralizátu a následném výpočtu celkového obsahu organického dusíku

obecně průměrný obsah dusíku v proteinech: 16 %

$$f = \frac{100}{16} = 6,25$$

☞ Stanoví se další dusíkaté (nebílkovinné) látky:
amoniak, aminokyseliny, peptidy, močovina →
riziko nadhodnocení výsledků

☞ Přepočítání na dominující protein závisí na jeho aminokyselinovém složení

Přepočítávací faktory:

Mléko + mléčné výrobky: 6,30

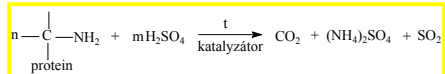
Mouka: 5,83

Sojové boby: 5,71

Vejce, maso: 6,25

A. KJELDAHLOVA METODA

1. Rozklad (dehydratace, mineralizace) organické hmoty



katalyzátory:

Se + K₂SO₄

K₂SO₄ + CuSO₄

TiO₂ + CuSO₄

ZnO₂ + CuSO₄

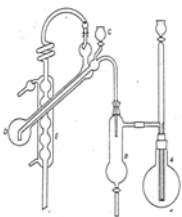
další látky: sirany alkalických kovů, H₂O₂

2. Stanovení amoniaku uvolněného z hydrolyzátu

(i) uvolnění amoniaku z (NH₄)₂SO₄ v mineralizátu:

→ **ALKALIZACE** (NH₄⁺ → NH₃)

(ii) izolace volného amoniaku ze zalkalizovaného mineralizátu: → **DESTILACE**



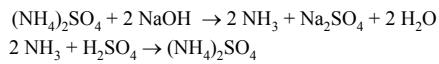
A - vyvíječ páry
B - kondenzační banka
C - chladič
D - destilační banka
E - chladič

Destilační přístroj podle
Parnas-Wagnera

(iii) Stanovení amoniaku v destilátu → TITRACE

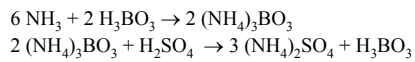
makro- a semimikrometody, automatizace

▪ **Alkalimetrická titrace** - jímání do H_2SO_4



Indikátory: - methylčerveň
- Tashirův indikátor (methylčerveň - methylenová modř)

▪ **Acidimetrická titrace** (Winklerova metoda) - jímání do kyseliny borité



Indikátor: methylčerveň

Možnosti eliminace nebilkoviných interferencí:

- precipitace proteinů trichloroctovou kyselinou (tekuté vz.) v
- dialýza
- gelová filtrace

ZHODNOCENÍ KJELDAHLOVY METODY



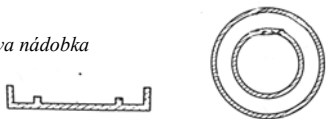
- vhodná pro všechny typy potravin
- **přímá metoda – není třeba příprava vzorku**
- robustní, spolehlivá
- vhodná i pro nerozpustné proteiny
- mezinárodně akceptovaná metoda



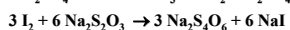
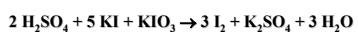
- toxické, korozivní páry
- toxické či drahé katalyzátory

▪ Difuzní Conwayova metoda

Conwayova nádobka



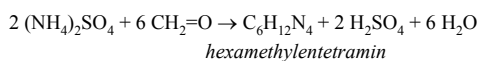
• Jodometrická titrace



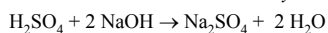
Indikátor: škrobový maz

B. METODY NEVYUŽÍVÁJÍCÍ KE STANOVENÍ AMONIAKU V MINERALIZÁTU DESTILACE

▪ Titrační stanovení amonných solí podle Hauše



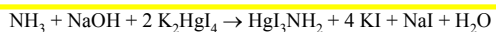
hexamethylentetramin



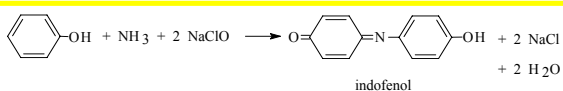
Indikátor: fenolftalein

▪ Spektrofotometrické stanovení

- Nesslerova metoda



- Berthelotova metoda



▪ Elektrochemické stanovení

Iontově selektivní metody

2. PŘÍMÉ METODY (bez mineralizace)

■ DUMASOVA METODA

Princip:

Pyrolýza (1000°C, katalyzátor CuO) v atmosféře bohaté na O₂, redukce oxidů dusíku na N₂

→ stanovení dusíku (po selektivní absorpci ostatních produktů pyrolýzy) s využitím tepelně vodivostního detektoru

ZHODNOCENÍ DUMASOVY METODY



- nevyžaduje agresivní chemikálie, prostá škodlivých emisí
- **přímá metoda – není třeba příprava vzorku**
- Rychlá (minuty)
- možnost plné automatizace

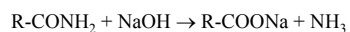


- riziko nadhodnocení výsledků (dusík může pocházet také z jiných zdrojů)
- nákladné přístroje

Potenciál nahradit Kjeldahlovu metodu

■ Titrační metody

🔪 **Přímá alkalimetrická titrace** (stanovení dusíku amidů aminokyselin)



- nespecifická, využitelná jen pro čisté preparáty

🔪 **Formolová titrace** (stanovení dusíku 2 - aminokyselin)

- jen pro koncové aminokyseliny

■ Spektrofotometrické metody

🔪 Přímá spektrofotometrie v ultrafialové oblasti

absorbční maxima :

180 - 220 nm

(peptidové vazby)

280 nm

(aromatické a heterocyklické aminokyseliny -
zvl. tyrosin a tryptofan)

ZHODNOCENÍ PŘÍMÉ SPEKTROFOTOMETRICKÉ METODY



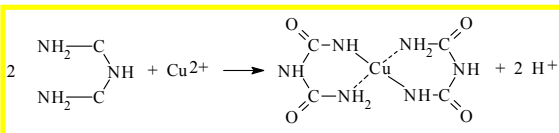
- jednoduchá a rychlá
- nedestruktivní, nevyžaduje činidla



- malá citlivost (0.05 – 5 mg)
- nespecifická, interferují UV absorbující látky zvl. složky nukleových kyselin
- velká závislost na aminokyselinovém složení

🔪 Biuretová metoda

koordinační vazba mědi (II) na peptidové vazby v alkalickém prostředí:



Spektrofotometrická detekce komplexu (540 nm)

ZHODNOCENÍ BIURETOVÉ METODY



- jednoduchost, vysoká průsaznost
- aminokyseliny neruší stanovení



- malá citlivost (0.05 - 5 mg)
- interferuje amoniak a některé detergenty

Lowryho metoda

redukce Folin - Ciocalteuova činidla (směs fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny)
bílkovinami na komplexy molybdenové modří
(abs. max. 745 - 750 nm)

oxidace tyrosinu, tryptofanu a v menší míře cystinu, cysteinu a histidinu vázaných v peptidovém řetězci

ZHODNOCENÍ LOWRYHO METODY



- velmi citlivá (50 – 100x citlivější než biuretová metoda)



- rozdíly v barvě komplexu v závislosti na typu proteinu
- interferuje řada sloučenin např. redukující cukry
- Vyžaduje izolaci proteinů

*vhodná jako mikrometoda, je však málo robustní
(použití hlavně v biochemii)*

Reakce s organickými barvivy

měří se snížení absorbance roztoku barviva po precipitaci jeho komplexu s bílkovinami

sulfonovaná barviva: **Oranž G a GG, aminočern 10 B** aj. - iontové i hydrofobní interakce s proteinem

ZHODNOCENÍ METODY ZALOŽENÉ NA ADSORBCI BARVIV



- vysoká citlivost
- rychlost
- snadná automatizace
- mezinárodně akceptovaná metoda
- vhodná při vývoji alternativních metod



- adsorpce komplexu na sklo
- závislost rozsahu interakce na aminokyselinovém složení
- nestandardnost šarží barviva

Infračervená spektrometrie

měření absorbance tekutých vzorků v infračervené oblasti
(např. 1548 cm^{-1} - absorpce peptidové vazby)

nebo reflektance tuhých vzorků v blízké infračervené oblasti spektra

➤ *nedestruktivní metoda, není nutná úprava vzorku, rychlá*

3. IMUNOCHEMICKÉ METODY

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

↪ stanovení alergenních proteinů soji, arašídů, gliadinu atd.

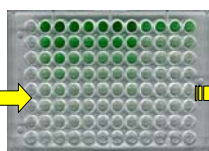
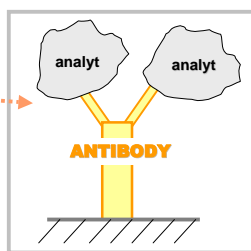
↪ stanovení vaječné a mléčné bílkoviny

Seznam alergenních složek potravin
(Vyhláška č.113/2005 Sb.)



Princip stanovení

- ↪ Vazba mezi antigenem (protein) a protilátkou (antibody)
- ↪ Spektrofotometrická příp. vizuální detekce (po přidavku činidel)



ZHODNOCENÍ IMUNOCHEMICKÉ METODY

- rychlé stanovení
- vysoce specifické
- kvalitativní i kvantitativní analýza
- komerčně dostupné kity

- křížová reaktivita
→ falešně pozitivní výsledky



4. DALŠÍ FYZIKÁLNÍ METODY

- Refraktometrické metody
- Turbidimetrické metody
- Metody elektronové spektroskopie
- Polarografické metody

STANOVENÍ ČISTÝCH BÍLKOVIN

oddělení:

- srážením

⚡ trichloroctovou kyselinou (např. stanovení bílkovin v mléce – ČSN EN ISO 8968-5)

⚡ taninem

- dialýzou
- gelovou filtrací

STANOVENÍ TRAVITELNÝCH BÍLKOVIN

hydrolyza:

- pepsinem (pH 1, 38 °C),
- trypsinem (pH 8, 38 °C)

STANOVENÍ FRAKČÍ BÍLKOVIN

A. Elektroforéza

- ▶ kapilární (CE)
- ▶ za podmínek denaturace (SDS-PAGE/acid urea PAGE)
- ▶ za nativních podmínek (PAGE)
- ▶ isoelektrická fokusace (IEF)

*SDS-PAGE - sodium dodecyl (lauryl) sulfate-
Polyacrylamide gel electrophoresis*

B. Chromatografická frakcionace

- ▶ gelová filtrace
velikost a tvar molekuly
- ▶ ionexová
velikost náboje v daném elektrolytu
- ▶ reverzní fáze
hydrofóbní interakce

B. Membránové procesy

- Ultrafiltrace
- Nanofiltrace
- Reverzní osmóza

*separace na základě velikosti molekul
(semipermeabilní membrány)*

Využití membránových procesů

- **Ultrafiltrace, nanofiltrace**
zkonzentrování roztoků proteinů (např.
zkonzentrování mléka před výrobou sýrů)
- **Reverzní osmóza**
odstranění vody, solí nebo jednoduchých
cukrů z roztoků proteinů
