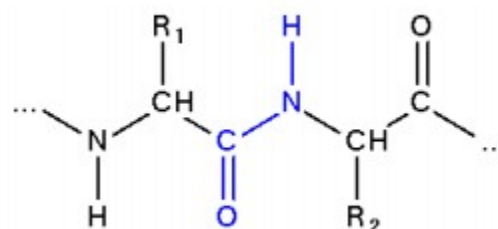


I. Część teoretyczna

1. Wprowadzenie

Białka są głównymi składnikami żywności oraz niezbędnymi składnikami pokarmowym. 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.



2. Budowa i właściwości białek

2.1. Struktura białek

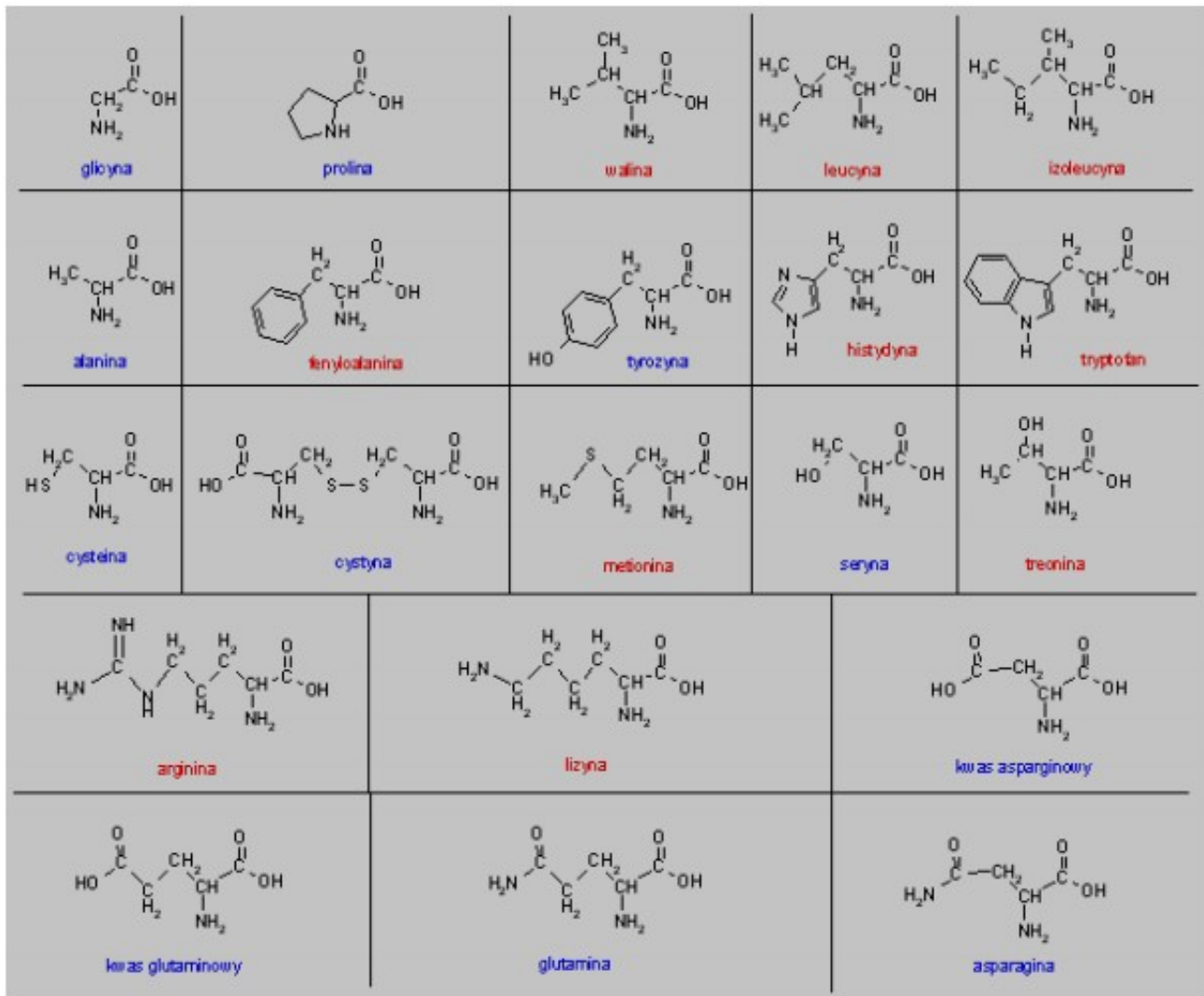
Białka są naturalnymi produktami zbudowanymi z reszt α -L-aminokwasowych (Rys. 1), połączonych w łańcuchy polipeptydowe wiązaniami *trans*-peptydowymi (jedynie przed resztami proliny występuje konfiguracja *cis*). Zawartość procentową podstawowych pierwiastków wchodzących w skład białek przedstawia Tabela 1.

Tabela 1 Skład procentowy podstawowych pierwiastków wchodzących w skład białka.

Pierwiastek	Procentowa zawartość w białku
węgiel	50-55%
tlen	20-23%
wodór	6-7%
azot	12-19%
siarka	0,2-3%
fosfor	0-6%

W białkach można znaleźć ponadto jony manganu, cynku, magnezu, żelaza, miedzi, kobaltu i innych metali.

Organizm ludzki nie potrafi syntezować niektórych aminokwasów i muszą być one dostarczane do organizmu w pożywieniu, aby organizm mógł wytworzyć potrzebne białka. Są to tzw. aminokwasy egzogenne, na Rys. 1 zaznaczone kolorem czerwonym.



Rys. 1. Struktura aminokwasów wchodzących w skład białek. Kolorem czerwonym zaznaczono aminokwasy egzogenne.

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

Białka 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 w 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

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 (<http://www.food-info.net/pl/qa/qa-fp1.htm>).

Białko	g/kg białka	Udział w całkowitej zawartości białka
Kazeina		
α-s1-kazeina	10.0	30.6
α-s2-kazeina	2.6	8.0
β-kazeina	10.1	30.8
κ-kazeina	3.3	10.1
Całkowita zawartość kazeiny	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

3. Metody oznaczania zawartości białka

Ilościowe oznaczanie ilości białka w produktach żywnościowych opiera się głównie na obecności w ich strukturze atomów azotu i przeprowadza się metodami bezpośrednimi i pośrednimi.

Do bezpośrednich metod oznaczania białka należą metody spektrofotometryczne (metoda biuretowa i metoda Lovry'ego), nefelometryczne oraz refraktometryczne.

Metody pośrednie (np. metoda Kjeldahla) polegają najczęściej na określeniu zawartości azotu, a następnie przeliczeniu go na białko przy użyciu odpowiednich współczynników przeliczeniowych. 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.

Według innego podziału metody oznaczania białka dzielą się na następujące grupy:

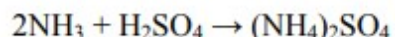
- o metoda Kjeldahla,
- o metody oparte na wbudowaniu barwnika do białka,
- o miareczkowanie formolowe,
- o metody spektrofotometryczne,
- o metody immunologiczne.

3.1. Metoda Kjeldahla

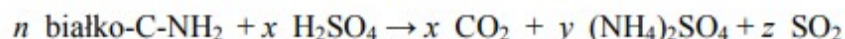
Najczęściej stosowaną metodą oznaczania azotu w artykułach spożywczych jest - znana od 1883 i niewiele modyfikowana - metoda Kjeldahla; jest to także metoda referencyjna. Polega ona na przeprowadzeniu mineralizacji produktu ze stężonym kwasem siarkowym(VI) („na mokro”), zalkalizowaniu roztworu, a następnie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

- o mineralizacja próbki,
- o destylacja amoniaku z parą wodną,
- o miareczkowanie.

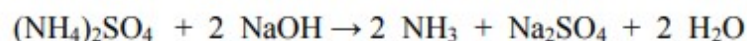
Podczas *mineralizacji* próby w kolbie Kjeldahla następuje utlenianie związków organicznych do ditlenku węgla, wody i amoniaku. Mineralizację prowadzi się przy pomocy stężonego kwasu siarkowego w obecności katalizatorów. Jako katalizatory najczęściej stosuje się siarczan(VI) miedzi(II) lub rtęci(II), 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:



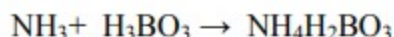
Sumaryczny przebieg powyższych reakcji przedstawia następujący schemat:



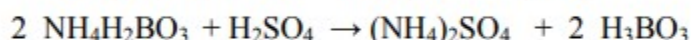
Siarczan(VI) amonu rozkłada się po zalkalizowaniu roztworu wodorotlenkiem sodu:



Wydzielony amoniak oddestylowuje się do odbieralnika zawierającego roztwór słabego kwasu, np. kwasu borowego występującego w nadmiarze. Następuje wiązanie amoniaku w formę soli amonowej kwasu borowego



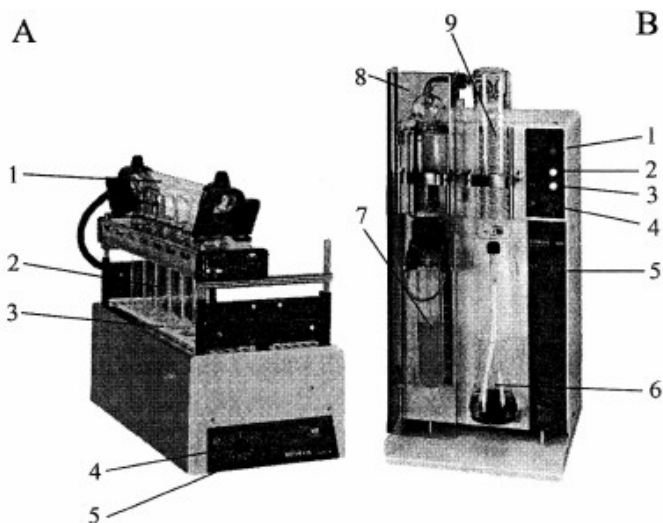
Związany amoniak jest następnie oznaczany przez miareczkowanie mianowanym roztworem silnego kwasu, np. kwasu solnego lub kwasu siarkowego.



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 próbę, 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 (Rys. 6).



Rys. 6. Zestaw do oznaczania białka metodą Kjeldahla firmy Chi: A – jednostka do mineralizacji: 1 – odprowadzenie oparów kwasu siarkowego(VI), 2 – termoodporne probówki ze mineralizowanymi próbkami, 4 – płaszcz grzejny, 5 – włącznik; B- aparat do destylacji z parą wodną: 1 – włącznik, 2 – przycisk Start, 3 – przycisk dozujący roztwór NaOH, 4 – pokrętko ustawienia czasu destylacji, 5 – regulacja natężenia pary wodnej, 6 – odbieralnik destylatu, 7 – probówka z destylowaną próbką, 8 – osłona, 9 – chłodnica wodna (Miroslawa Klepacka, Analiza żywności, Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa 2005).

3.2. 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 izoelektycznego 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 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.

3.3. 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.

3.4. 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 $\mu\text{g/ml}$).

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.

3.5. Metody immunologiczne

Ostatnio 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.