

## Лекция 3

### Химия и методы определения нутриентов. Белки

Белками, или протеинами (от греч. *πρωτος* — первый, важнейший), называют высокомолекулярные (молекулярная масса варьирует от 5–10 тыс. до 1 млн и более) природные полимеры, молекулы которых построены из остатков  $\alpha$ -аминокислот. В белковой молекуле аминокислоты соединены между собой пептидными связями.

Белки являются наиболее ценным компонентом пищи. Они играют огромную роль в жизнедеятельности клеток и тканей, являются важнейшей составной частью всего живого. Белки — основной материал, из которого построена структура живой клетки.

Основное же значение белков заключается в их незаменимости другими пищевыми веществами. В состав белков входят (%): углерод (50,6–54,5), кислород (21,5–23,5), азот (15,0–17,6, в среднем 16), водород (6,5–7,3), сера (0,3–2,5), фосфор (0,5–0,6).

#### *Методы определения содержания белка*

##### *Определение массовой доли белка в продуктах питания*

Проблема определения концентрации белка насчитывает уже более 70 лет. Окончательно она не решена до сих пор. Очевидно, что создание «идеального метода» неосуществимо в силу уникальности структуры каждого белка.

Методы количественного определения белков разнообразны. Из физических методов простейшим является взвешивание чистого белка. Однако белки очень гигроскопичны, и полностью удалить из их состава воду столь трудно, что этот способ количественного определения белков применяют редко. Кроме того, выделить весь белок из исследуемого объекта практически невозможно.

Наиболее простым химическим методом является количественное определение общего, или белкового (после осаждения белка и отделения его от растворимых азотсодержащих веществ), азота, поскольку его содержание в различных белках колеблется в довольно ограниченных пределах, что дает возможность судить по количеству азота о количестве белка в биологическом объекте.

При анализе пищевых продуктов для определения общего азота широкое применение находит метод Кьельдаля, основанный на минерализации белоксодержащей пробы серной кислотой в присутствии катализатора. В результате минерализации органический продукт разлагается до углекислого газа и воды; азот превращается в аммиак и связывается с серной кислотой. Образовавшийся в реакционной среде сульфат аммония разрушают концентрированным раствором щелочи. Выделившийся при этом аммиак отгоняют с водяным паром и количественно поглощают раствором серной или борной кислоты. Содержание аммиака после отгонки в раствор серной кислоты определяют обратным кислотно-основным титрованием раствором гидроксида натрия.

Метод прямого ацидиметрического титрования используют для количественного определения аммиака, образующегося в результате минерализации анализируемой пробы и поглощенного раствором борной кислоты. Установление точки эквивалентности проводят визуально, используя метиловый красный, бромкрезоловый зеленый или смешанный кислотно-основной индикатор Таширо (смесь метилового красного и метиленового голубого), а также используя физико-химические методы. По результатам титрования рассчитывают массовую долю азота в испытуемой пробе. Количество белкового азота пересчитывают на содержание белка, используя коэффициенты. Универсальный белковый коэффициент 6,25 принят на основании того, что среднее содержание азота в большинстве белков составляет 16 %. Уточненные белковые коэффициенты для некоторых объектов, с учетом фактического содержания белка в них, следующие: 5,7 — пшеница, овес, семена подсолнечника; 6,0 — рис; 6,25 — кукуруза, семена бобовых культур, пивоваренный ячмень; 6,38 — молоко и молочные продукты.

Более удобными в применении и оперативными являются спектрофотометрические методы, получившие в последнее время широкое распространение при выполнении массовых анализов и проведении оперативного контроля качества сырья и готовой продукции на содержание белка.

Для экспрессной оценки содержания белка используют метод Вартбурга и Христиане, основанный на способности ароматических радикалов таких аминокислот, как тирозин, триптофан, фенилаланин, к поглощению при 280 нм. Однако при данной длине волны поглощают и нуклеиновые кислоты, вклад которых в значение оптической плотности при 280 нм можно учесть, измерив поглощение исследуемого раствора белка при 260 нм. При 260 нм поглощающими веществами в растворе являются только нуклеиновые кислоты. Рассматриваемый метод не применим к объектам, в которых содержание нуклеиновых кислот более 20 %, так как дает ориентировочные результаты.

Общим достоинством методов определения содержания белков с помощью УФ-спектрофотометрии являются простота и скорость. Однако сложность химического состава пищевых продуктов, возможность влияния небелковых компонентов на результаты определения ограничивают применение этой группы методов.

Определение белков в видимой области спектра основано на качественных реакциях на белки и их структурные компоненты. Одним из спектрофотометрических методов количественного определения белков в растворе является разработанный в 1949 г. биуретовый метод. Метод основан на определении интенсивности окраски исследуемого образца, возникающей в результате взаимодействия белков и полипептидов с ионами меди (II) в щелочной среде. Реакция обусловлена присутствием в белке пептидных связей, которые с ионами меди образуют окрашенные солеобразные комплексные соединения. Белок существует в кето- и енольной форме, между которыми устанавливается равновесие. Катионы меди (II) реагируют с

еиольной формой полипептида, замещая водород оксигрупп и образуя координационную связь с азотом.

Интенсивность окраски образующегося биуретового комплекса зависит от длины цепи пептида и варьирует от сине-фиолетовой до красно-фиолетовой и красной. Длина волны, отвечающая максимальной чувствительности определения, находится в интервале 540–640 нм. К достоинствам метода стоит отнести его низкую чувствительность к посторонним веществам (не дает побочной реакции с небелковыми веществами), невысокую погрешность. Чувствительность метода составляет 2–10 мг/см<sup>3</sup>. Данный метод мало используется в биохимической лабораторной практике (за исключением медицинских анализов на белок), так как является менее чувствительным, чем метод Лоури, предложенный в 1951 г.

Определение белка по методу Лоури основано на измерении интенсивности окраски раствора белка, в котором осуществляются две цветные реакции: биуретовая реакция (образование окрашенного комплекса ионов меди (II) с амидными связями) и реакция взаимодействия реактива Фолина — Чиокальтеу с ароматическими аминокислотами. Использование реактива Фолина — Чиокальтеу повышает чувствительность метода Лоури почти в 100 раз по сравнению с биуретовым методом. Реактив Фолина — Чиокальтеу представляет смесь растворов вольфрамата и молибдата натрия, к которой добавляют последовательно фосфорную, хлороводородную кислоты и, после кипячения, сульфат лития, а также несколько капель бромной воды.

В результате реакции происходит восстановление фосфорновольфрамовой и фосфорномолибденовой кислот с образованием комплексного соединения синего цвета с максимумом поглощения при 750 нм. Реакция инициируется комплексными соединениями меди, возникающими при взаимодействии белка со щелочным раствором сульфата меди (II). Интенсивность окраски зависит главным образом от содержания в исследуемом образце тирозина и триптофана. Данным методом можно определить абсолютное содержание белка в исследуемом растворе только в том случае, если градуировочный график построен для того же белка, определение концентрации которого проводят. Чувствительность метода к белку составляет 10–100 мкг/см<sup>3</sup>. Несмотря на то, что метод обладает высокой чувствительностью (для анализа используются сильно разбавленные растворы), он имеет ряд недостатков. Используемый по методике реактив Фолина — Чиокальтеу дает положительную реакцию и на другие вещества, например, фенольной природы, что осложняет анализ, особенно объектов растительного происхождения.

Метод Бредфорда, предложенный в 1976 г., основан на связывании белками кислотного красителя кумасси синего (Coomassie Brilliant Blue G-250, I) за счет электростатического взаимодействия сульфонильных групп красителя с аминокислотными остатками преимущественно аргинина и в меньшей степени с остатками гистидина, тирозина, триптофана и фенилаланина.

Связанная форма имеет голубую окраску с максимумом поглощения при 595 нм, в то время как исходный кислый раствор красителя — 465 нм.

Основное достоинство данного метода — чувствительность; метод позволяет надежно определять от 10 до 100 мкг/см<sup>3</sup> белка. В целом чувствительность метода зависит от соотношения концентраций определяемого белка и красителя: чем больше красителя, тем чувствительней метод. Рассматриваемый метод менее «капризный» по сравнению с методом Лоури. Поскольку белки различаются по своей способности связывать красители, желательно для построения градуировочного графика использовать в качестве стандартного белка белок, концентрацию которого в дальнейшем предполагается определять.

Реагенты, используемые в методе Бредфорда, обладают большим сродством к альбуминам, в методе Лоури — к глобулинам. Биуретовый метод одинаково выявляет белки различной структуры, но обладает недостаточной аналитической чувствительностью.