

## Rýchle stanovenie kazeínu

### The fast determination of casein

T. VACOVÁ, E. BUBELÍNIOVÁ, E. KLIMENTOVÁ

**Abstract:** It is possible the casein content in foods with several procedures to determine. We have verified a possibility of biuret method utilization for determination of isolated casein. The proposed method is simple and fast and is utilizable as working procedure.

Kazeín je hlavná bielkovina mlieka. Význam jeho stanovenia v ostatnom čase prekračuje rámec mliekárenskej problematiky, pretože mliečne bielkoviny (vo forme sušeného mlieka, koprecipitátov alebo kazeinátov) sa používajú ako prísady do iných potravín nemliečného charakteru:

- a) na zlepšenie biologickej hodnoty potravín,
- b) v dôsledku uplatnenia ich špecifických funkčných vlastností.

Dôkaz a stanovenie mliečnych bielkovín je často problematické, keďže sa zvyčajne analyzuje materiál s neznámym základným zložením.

Obsah kazeínu v mlieku sa podľa ČSN 57 0530 stanoví nepriamo, ako rozdiel z obsahu všetkých mliečnych bielkovín a sérových bielkovín, ktoré sa stanovia klasickou Kjeldahlovou metódou. Stanovenie podľa uvedeného manuálneho postupu je práce a časovo náročné.

Okrem klasickej Kjeldahlovej metódy, ktorou sa stanovujú bielkoviny na základe celkového obsahu dusíka vo vzorke, existujú ďalšie postupy stanovenia bielkovín založené na iných princípoch. Viaceré z nich sú prepracované a modifikované na mliečne bielkoviny. Správnosť týchto metód sa vždy porovnáva s Kjeldahlovou metódou, ktorá sa pokladá za správnu a referenčnú.

Komerčné analyzátory mlieka využívajú Kjeldahlov princíp (čas analýz je skrátený na niekoľko minút oproti 6 až 8 h pri rovnakom manuálnom postupe), ako aj ďalšie, najmä kolorimetrické princípy. V ostatnom čase sa využíva najmä spektroskopia v infračervenej oblasti, kde sa spolu s bielkovinami stanovujú ďalšie hlavné zložky mlieka: tuk, laktóza a voda. Kapacita automatických analyzátorov je až 300 vzoriek za hodinu.

Na stanovenie kazeínu vo vzorkách nemliečného charakteru sa uvádzajú

---

Ing. T. Vacová, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava

Prom. farm. E. Bubelíniová, Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava

Ing. E. Klimentová, Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava

priame i nepriame postupy. Najnovšia je Resminiho metóda založená na špecifickej enzymatickej izolácii kazeínu zo vzorky pomocou chymozínu, s nasledujúcim kvantitatívnym stanovením. Izolovaný kazeín sa stanovuje Kjeldahlovou metódou pri použití prepočítavacieho faktora z obsahu dusíka na kazeín 6, 38 [1].

Obsah kazeínu sa dá stanoviť podľa množstva fosforu, pretože kazeín obsahuje značné množstvo fosfoserínových skupín. Nevýhodou metódy je, že aj sójová bielkovina, ktorá sa pridáva do niektorých výrobkov, je fosfoproteín, a tak môže dôjsť k nesprávnej interpretácii výsledkov [2, 3].

Kazeín sa môže stanoviť aj pomocou stanovenia prolínu v bielkovinách. Metóda je pomerne obmedzená, pretože prolín nie je pre kazeín taký špecifický, ako napr. hydroxyprolín pre želatínu.

Hydrolýzou kappakazeínu pri definovaných podmienkach sa odštiepia glykomakropeptidy, v ktorých sa nachádza kyselina sialová. Na základe stanovenia jej obsahu sa dá usudzovať na obsah kazeínu vo vzorke [4, 5].

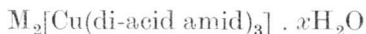
Najvýhodnejším riešením stanovenia pôvodu a obsahu proteínov je sekvenčná analýza, teda stanovenie proteínových fragmentov, ktoré sú selektívne pre každý proteínový komplex. Ďalším krokom je izolácia týchto fragmentov a nasledujúce kvantitatívne stanovenie pomocou analýzy aminokyselín. Fragmentácia sa robí enzýmovou trypsinom a separácia chromatograficky. Postup sa zatiaľ prakticky nedá využiť [6—8].

## Výsledky a diskusia

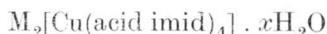
Zaoberali sme sa stanovením kazeínu izolovaného z mlieka biuretovou metódou. Kazeín z roztoku sa vyzráža pri hodnote pH jeho izoelektrického bodu (pH 4, 6). Po oddelení sa k zrazenine pridá biuretové činidlo, ktoré vytvorí s peptidickými väzbami kazeínu farebný komplex.

Princípom stanovenia je tvorba farebného komplexu peptidov so síranom meďnatým v alkalickom prostredí. Sfarbenie komplexu je purpurovofialové (ružovkasté s proteázami a peptónmi, až modré so želatínou). Reakciu málo ovplyvňujú bočné reťazce bielkovín a intenzita sfarbenia sa veľmi málo mení v závislosti od druhu bielkoviny [9].

Prvé štúdie biuretovej reakcie viedli k izolácii biuretového komplexu so zložením  $K_2[Cu(\text{biuret})_2] \cdot 4 H_2O$ . Neskôr sa ukázalo, že produkty môžu byť dvojaké, podľa toho, či obsahujú alkalický kov alebo nie. Reakciou s jednoduchými amidmi bez prítomnosti alkálií vznikajú soli  $[Cu(\text{amid})_2] \cdot 2 H_2O$ . Produkty vznikajúce z amidov dikyselín zodpovedajú vzorcu



a z amidov kyselín vzorec

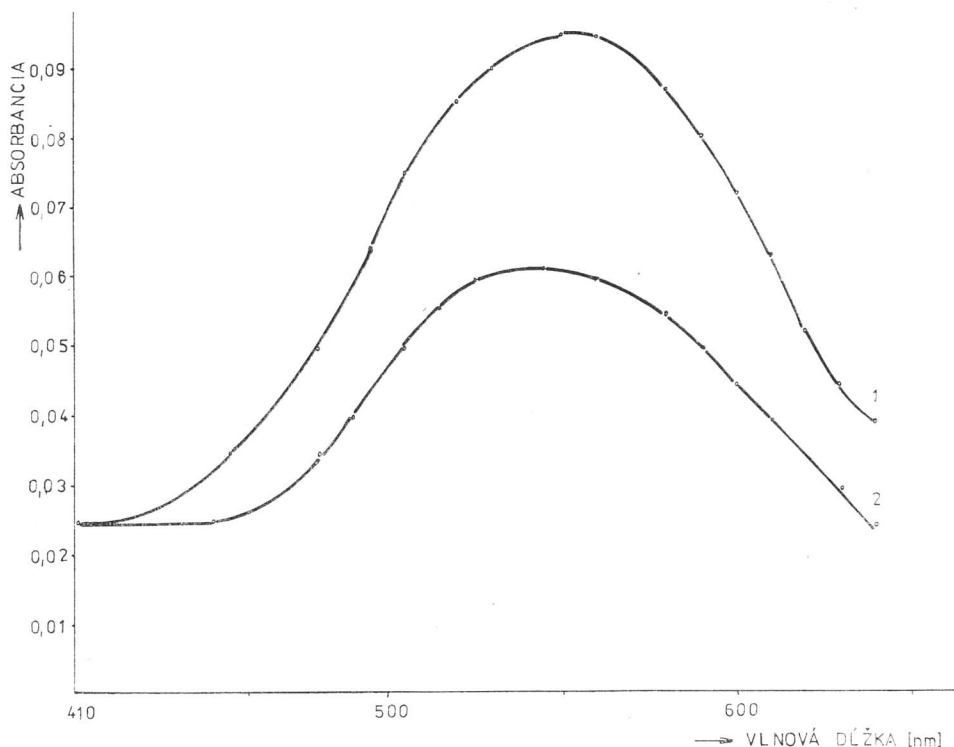


kde M = Na alebo K.

Významným záverom štruktúrnych štúdií bolo zistenie, že štyri základné dusíkové atómy vstupujú do biuretovej reakcie a že na tvorbe komplexu sa zúčastňujú dva vodíkové atómy z aminokyselín amidov. Aj počet vodíkových

atómov v biuretovej reakcii je 2 alebo 4, v závislosti od acidobázickej rovnováhy danej molekuly.

Absorpčné spektrum bis-biureto-mednatého tetrahydrátu je identické so spektrom zlúčeniny v roztoku medzi 375 a 640 nm. Z toho sa usudzuje, že komplex si zachováva svoju štruktúru i v roztoku [10]. Optická densita roztoku stúpa lineárne s obsahom medi, ak je proteín v nadbytku. Ak je v nadbytku meď, optická densita opäť stúpa lineárne so vzrastom obsahu proteínu, avšak takáto krivka má trochu strmší sklon. Vysvetlením toho je hypotéza, že každý atóm medi je viazaný na štyri atómy peptidického dusíka [11].



Obr. 1. Absorpčná krivka biuretového komplexu. 1 — s kazeínovým štandardom, 2 — s kazeínom izolovaným z mlieka.

Farebnú reakciu môžu rušiť niektoré sprievodné látky nachádzajúce sa v potravinách (amónne soli, rozpustné uhľohydráty a pod.) [12, 13]. Odporúča sa preto bielkoviny vopred oddeliť vyzrážaním [12] alebo gélovou filtráciou [14], a k nim pridať biuretové činidlo. Pri izolácii kazeínu z mlieka sme zistili, že farebná reakcia s biuretovým činidlom je rušená zákalom spôsobeným pravdepodobne prítomnosťou lipoproteínov v zrazenine kazeínu. Prefiltrovaním farebného roztoku komplexu cez kremelinu sa získal číry farebný roztok, pričom filtrácia nenarušila intenzitu sfarbenia. Zákal možno odstrániť aj prídavkom izopropanolu.

Biuretovú metódu na stanovenie kazeínu v mlieku sme modifikovali takto:

Do centrifugačnej kyvety sa naváži diferenčne 1 ml mlieka s presnosťou 0,0002 g, pridá sa 6,5 ml vody teplej 40 °C a 0,2 ml 10 % kyseliny octovej. Po premiešaní sa nechá asi 10 min stáť a potom sa pridá 0,2 ml 1 M octanu sodného a opäť sa premieša. Po ďalších 10 min sa zrazenina odstredí. Tekutý podiel sa opatrne zleje. Zrazenina sa kvantitatívne pomocou malého množstva vody preniesie do 100 ml odmernej banky. Pridá sa 50 ml biuretového činidla. Mieša sa do rozpustenia zrazeniny. Po 30-min stáť sa roztok doplní destilovanou vodou do 100 ml. Roztok sa prefiltruje cez kremelinu. Meria sa absorbancia roztoku pri vlnovej dĺžke 546 nm v 1-cm kyvete. Ako porovnávací roztok sa použije zmes vody a biuretového činidla 1 : 1.

Faktor na prepočet obsahu kazeínu vo vzorke sa zistí pomocou čistého kazeínu. Náväžok kazeínu 0,05 g sa preniesie do odmernej banky na 100 ml a spracuje už uvedeným spôsobom.

Vypočíta sa:

$$F = \frac{\text{náväžok kazeínu (g)}}{\text{absorbancia vzorky kazeínu 546 m}}$$

Obsah kazeínu vo vzorke:

$$\% \text{ kazeínu} = F \cdot \frac{\text{absorbancia vzorky 546 nm}}{\text{náväžok vzorky (g)}} \cdot 100$$

Príprava biuretového činidla: 9 g Seignettovej soli sa rozpustí v 400 ml 0,2 M NaOH (bez karbonátov, pripravený z nasýteného odšťátého NaOH), potom sa pridá 3,0 g jemného práškoveho  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  p. a. a 5,0 g KI p. a. Každá zo solí musí byť pred pridaním ďalšej rozpustená. Zmes sa doplní 0,2 M NaOH na 1000 ml. Roztok sa dá skladovať v tmavej fľaši pomerne dlhý čas.

Metódu sme overili na sérii vzoriek odstredeného mlieka. Interval spoľahlivosti stanovenia kazeínu vo vzorkách bol od 2,91 do 3,07 %. Zistená relatívna šírka intervalu spoľahlivosti bola  $\pm 0,97$  %.

Schober a spol. [15] zistili v porovnaní s Kjeldahlovou metódou relatívne veľkú chybu v správnosti biuretovej metódy. Ďalší autori zistili pri porovnaní výsledkov získaných biuretovou a Kjeldahlovou metódou korelačné koeficienty  $r = 0,91$  [16], a  $r = 0,95$  [17].

Zistené odchýlky výsledkov sa často komentujú ako prekážky pre praktické využívanie biuretovej metódy. Na druhej strane metóda priťahuje pozornosť svojou jednoduchosťou a možnosťou adaptácie na autoanalýzátorovú techniku. Čas vývoja sfarbenia biuretového komplexu možno skrátiť zvýšením teploty z 30 min až na 1 min. V klinickej biochémií sú známe viaceré automatické analyzátory, ktoré využívajú biuretovú metódu na stanovenie bielkovín v telesných tekutinách, pričom sa za hlavnú výhodu metódy pokladá jej rýchlosť. Jednoduchosť a rýchlosť biuretovej metódy umožňujú využiť túto metódu i v potravinárskych aplikáciách.

Po predhádzajúcej špecifickej izolácii kazeínu z nemliečnych potravinových materiálov možno biuretovú metódu aplikovať ako vyhovujúci prevádzkový postup na rýchle stanovenie prídavku kazeínu, resp. mliečnych bielkovín v potravinách.

## Сúhrn

Obsah kazeínu v potravinách možno stanoviť viacerými postupmi. Overili sme možnosť využiť biuretovú metódu na stanovenie izolovaného kazeínu. Navrhovaná metóda je jednoduchá a rýchla a možno ju využiť ako prevádzkový postup.

## Literatúra

1. RESMINI, P. a spol.: *Sc. e Technica Lattiero-Casearia*, 30, 1979, s. 77.
2. THALACKER, R.: *Dtsch. Lebensmittel-Rundschau*, 59, 1963, s. 111.
3. KUTSCHER, W. — NAGEL, W. — PFAFF, W.: *Z. Lebensm. Untersuch. — Forsch.*, 160, 1961, s. 117.
4. REIMERDES, E. H. — MEHRENS, H. A. — MATTHIESEN, I.: *Kieler milchwiss. Forschungsber.*, 31, 1979, s. 223.
5. REIMERDES, E. H. — MACHT, S.: *Kieler milchwiss. Forschungsber.*, 32, 1980, s. 129.
6. SCHMIDT, D. E. a spol.: *Anal. Chem.*, 52, 1980, s. 177.
7. REIMERDES, E. H. — MEHRENS, H. A. — MATTHIESEN, I.: *Milchwissenschaft*, 35, 1979, s. 401.
8. ROKUSHIKA, S. a spol.: *J. Chromatogr.*, 176, 1979, s. 456.
9. JENNESS, R., PATTON, S.: *Grundzüge der Milchchemie*. München—Basel—Wien, Bayer. landwirtsch. Verlag 1967.
10. FREEMAN, H. C. — SMITH, J. E. — TAYLOR, J. C.: *Acta crystall.*, 14, 1961, s. 407.
11. COLE, E. R.: *Rev. pure appl. Chem.*, 19, 1969, s. 109.
12. PFLEIDERER, G.: In: *Handbuch der Lebensmittelchemie II/2*, Berlin—Heidelberg—New York, Springer Verlag 1967.
13. LENGERKEN, J. a spol.: *Nahrung*, 20, 1976, s. 641.
14. DOETSCH, K. a spol.: *Cereal Chem.*, 51, 1974, s. 610.
15. SCHÖBER, R. — NICLAUS, W. — CHRIST, W.: *Milchwissenschaft*, 19, 1964, s. 75.
16. RENNER, E. — ÖMEROGLU, S.: *Z. Lebensm. — Untersuch. — Forsch.*, 149, 1972, s. 329.
17. BOSSET, J. — BLANC, B. — PLATTNER, E.: *Anal. Chim. Acta*, 75, 1975, s. 343.

Вацова, Т., Бубелиниова, Е., Климентова, Е.

### Ускоренное определение казеина

#### Выводы

Содержание казеина в пищевых продуктах возможно определить несколькими методами. Мы проверяли возможность использования биурет-метода для определения изолированного казеина. Предлагаемый метод простой, скорый и можно его использовать как метод, годный к эксплуатации.