

# Možnosti použitia Lowryho metódy na stanovenie bielkovín v cukrovarníckych šťavách

TRIALS ON THE APPLICATION OF THE LOWRY METHOD FOR DETERMINATION OF PROTEIN CONTENT IN SUGAR BEET JUICES

Bożena Wnuk – Technická univerzita Łódź, Poľsko

Stanovenie bielkovín v cukrovarníckych šťavách spôsobuje problémy, pretože tieto bielkoviny sa nachádzajú vo forme komplexov s inými vysokomolekulárnymi zlúčeninami, predovšetkým s pektínovými látkami. Uvoľňovanie týchto komplexov spôsobuje často narušenie štruktúry samotnej bielkoviny. V cukrovarníckej analytike na stanovenie bielkovín v šťavách sa používa metóda Barnsteina a Schulzeho (3), ktorá spočíva v stanovení bielkovinného dusíka a prepočtom na bielkovinu koeficientom 6,25 sa určí výsledok. V prípade melasy prepočtový koeficient je 8 (4). Metóda Barnsteina a Schulzeho spočíva vo vyzrážaní bielkoviny účinkom Barnsteinovho činidla, zloženého z dvoch roztokov  $\text{CuSO}_4$  a  $\text{NaOH}$ . Potom sa pridá tretí roztok obsahujúci  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ , ktorý uľahčuje filtráciu vzniknutej zrazeniny. Vo vyzrážanej a premytej zrazenine sa stanoví celkový dusík Kjeldahlovou metódou (3) a výsledok sa prepočíta na obsah bielkovín.

Existuje mnoho metód na stanovenie bielkovín. Jednou z nich je Lowryho (6) kolorimetrická metóda, známa od roku 1951. Využíva sa v nej citlivá reakcia väzieb peptidových látok a aromatických aminokyselín s fenolovým reakčným činidlom Folin-Ciocalteiu. Činidlo Folin-Ciocalteiu je zmesou wolframanu sodného, molybdénu sodného a síranu lítneho v prostredí

kyseliny fosforečnej a chlorovodíkovej (7). Reakcia prebieha v dvoch etapách: počiatočné pripájania iónov do peptidových väzieb (biuretová reakcia) a nasledovná redukcia kyselinou fosfowolframovou a fosfomolybdénovou oxidov zodpovedných za väzbu medi v bielkovine, ako aj tyrozínu a tryptofánu v stanovovanej bielkovine. Výsledkom reakcie je vznik farebných látok, ktoré možno stanoviť spektrometrickou metódou ako absorbanciu roztokov v oblasti viditeľného spektra o vlnovej dĺžke 600–750 nm. Na základe kalibračnej krivky je možno stanoviť obsah bielkoviny v skúmanom roztoku.

Výhodou tejto metódy je relatívne jednoduchý pracovný postup a vysoká citlivosť (už od 1  $\mu\text{g}$  bielkoviny vo vzorke) a preto táto metóda bola zvolená do výskumov pre jej eventuality použitia na stanovenie bielkovín v cukrovarníckych šťavách. V literatúre z oblasti cukrovarníctva na stanovenie bielkovín sa nachádza práca M. AJDARI RADA A B. SENGEHO (1), v ktorej na stanovenie bielkovín v cukrovarníckych šťavách po predčerení sa používa reakčné Folin-Ciocalteiu činidlo. Chýba však dôkladný popis tejto metódy.

Cieľom práce bol výskum stanovenia korelácie medzi výsledkami stanovenia bielkovín v cukrovarníckych šťavách dosiahnutých Lowryho metódou a metódou Barnsteina a Schulzeho

Tab. I. Analytické stanovenia bielkovín v surovej šťave

Obsah sušiny °Bx	Bielkoviny metóda Lowryho		Celkový dusík metóda Barnsteina a Schulzeho		Bielkovina = celkový dusík $\times$ 6,25		A/B
	g.100g <sup>-1</sup> šťavy	A g.100g <sup>-1</sup> sušiny	g.100g <sup>-1</sup> šťavy	g.100g <sup>-1</sup> sušiny	g.100g <sup>-1</sup> šťavy	B g.100g <sup>-1</sup> sušiny	
14,9	0,49	3,29	0,0063	0,042	0,04	0,264	12
14,7	0,439	2,99	0,0073	0,049	0,046	0,313	10
14,5	0,472	3,26	0,0066	0,046	0,042	0,284	11
14,5	0,486	3,34	0,0063	0,042	0,040	0,264	13
14,7	0,415	2,83	0,0075	0,051	0,047	0,319	9
14,9	0,448	3,01	0,0078	0,052	0,049	0,325	9
14,6	0,448	3,07	0,0069	0,047	0,044	0,295	10
14,8	0,486	3,28	0,0065	0,040	0,041	0,275	12
14,8	0,453	3,06	0,0077	0,052	0,048	0,325	9
14,8	0,443	3,00	0,0069	0,047	0,043	0,291	10
14,6	0,425	2,91	0,0073	0,050	0,046	0,313	9
14,9	0,476	3,20	0,0078	0,052	0,049	0,327	10
$\bar{\sigma}$ 14,7	0,457	3,10	0,0071	0,048	0,045	0,300	10

Tab. II. Analytické stanovenia bielkovín v ťažkej šťave

Obsah sušiny °Bx	Bielkoviny metóda Lowryho		Celkový dusík metóda Barnsteina a Schulzeho		Bielkovina = celkový dusík $\times$ 6,25		A/B
	g.100g <sup>-1</sup> šťavy	A g.100g <sup>-1</sup> sušiny	g.100g <sup>-1</sup> šťavy	g.100g <sup>-1</sup> sušiny	g.100g <sup>-1</sup> šťavy	B g.100g <sup>-1</sup> sušiny	
65,0	0,986	1,516	0,0058	0,0089	0,036	0,056	27
64,5	1,007	1,561	0,0053	0,0082	0,033	0,051	31
64,0	1,024	1,601	0,0046	0,0072	0,028	0,045	36
65,2	1,041	1,597	0,0054	0,0083	0,034	0,052	31
64,4	0,970	1,506	0,0054	0,0084	0,035	0,053	28
64,2	1,008	1,570	0,0052	0,0081	0,033	0,050	31
63,0	0,934	1,482	0,0048	0,0076	0,030	0,048	31
64,2	0,932	1,452	0,0042	0,0065	0,026	0,041	35
65,0	1,026	1,578	0,0057	0,0088	0,035	0,055	29
64,4	0,948	1,472	0,0053	0,0082	0,033	0,051	29
64,8	0,983	1,517	0,0059	0,0091	0,037	0,057	27
64,6	0,987	1,528	0,0057	0,0088	0,036	0,055	28
$\bar{\sigma}$ 64,4	0,987	1,532	0,0053	0,0082	0,033	0,051	30

Tab. III. Wilcoxonov test zhodnosti – surová šťava

Bielkoviny metóda Lowryho (g.100 g <sup>-1</sup> sušiny)	Počet	Celkový dusík metóda Barnsteina a Schulzeho (g.100 g <sup>-1</sup> sušiny)	Počet
Vzrastajúca postupnosť		Vzrastajúca postupnosť	
2,83	13	0,264	1,5
2,91	14	0,264	1,5
2,99	15	0,275	3
3,00	16	0,284	4
3,01	17	0,291	5
3,06	18	0,295	6
3,07	19	0,313	7,5
3,20	20	0,313	7,5
3,26	21	0,319	9
3,28	22	0,325	10,5
3,29	23	0,325	10,5
3,34	24	0,327	12
Suma	222	Suma	78

Tab. III. Wilcoxonov test zhodnosti – ťažká šťava

Bielkoviny metóda Lowryho (g.100 g <sup>-1</sup> sušiny)	Počet	Celkový dusík metóda Barnsteina a Schulzeho (g.100 g <sup>-1</sup> sušiny)	Počet
Vzrastajúca postupnosť		Vzrastajúca postupnosť	
1,452	13	0,041	1
1,472	14	0,045	2
1,482	15	0,048	3
1,506	16	0,05	4
1,516	17	0,051	5,5
1,517	18	0,051	5,5
1,528	19	0,052	7
1,561	20	0,053	8
1,570	21	0,055	9,5
1,578	22	0,055	9,5
1,597	23	0,056	11
1,601	24	0,057	12
Suma	222	Suma	78

používanou v cukrovarníctve, čo by umožnilo v budúcnosti širšie využitie Lowryho metódy v cukrovarníckej analytike.

### Metodika výskumu

Zo surovej a ťažkej šťavy bolo pripravené po 12 vzoriek, ktoré boli skladované pri teplote  $-18^{\circ}\text{C}$ . Pred analytickým stanovením šťavy boli rozmrazené a prefiltrované cez sací papier. Vo filtráte boli stanovené bielkoviny Lowryho metódou (6, 7) a taktiež bielkoviny dusíka metódou Barnsteina a Schulzeho (3). Bielkovinový

dusík bol prepočítaný na obsah bielkovín koeficientom 6,25. Vo vzorkách bol taktiež stanovený obsah sušiny (Bx). Výsledky analytických stanovení sú uvedené v tab. I. a II.

### Postup stanovenia

#### Lowryho metóda (6, 7)

Použité činidlá:

- **čínidlo A** – 2 % (m.v<sup>-1</sup>) roztok Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> v 0,1 M roztoku NaOH,
  - **čínidlo B<sub>1</sub>** – 1 % (m.v<sup>-1</sup>) roztok CuSO<sub>4</sub>,
  - **čínidlo B<sub>2</sub>** – 2% roztok vínanu sodného,
  - **čínidlo C** – alkalický roztok medi,
- 30 minút pred analytickým stanovením zmieša sa čínidlo A s čínidlom B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub> v pomere 100:1,
- **čínidlo D** – Folin-Ciocalteiuho činidlo rozmiešané v destilovanej vode v pomere 1:1.

Na stanovenie kalibračnej krivky bol použitý albumín (Egg Albumín, Fluka, holandský produkt).

V roztokoch na stanovenie kalibračnej krivky albumínu v rozmedzí koncentrácií od 20 do 1 000 µg.ml<sup>-1</sup> ako aj v cukrovarníckych šťavách sa vykonalo stanovenie bielkovín Lowryho metódou (šťavy pred analýzou boli zriedené destilovanou vodou v pomere 1:50). Na meranie sa pridalo do vzoriek po 1 ml zriedeného skúmaného roztoku alebo roztoku pre stanovenie kalibračnej krivky, pridalo sa 5 ml alkalického roztoku medi (čínidlo C) a dôkladne sa premiešalo. Po 10 minútach sa pridalo 0,5 ml činidla D a obsah skúmanej vzorky sa okamžite premiešal a vzorka sa ponechala v pokoji 30 minút. Porovnávacím roztokom bola destilovaná voda (1 ml), do ktorej sa postupne pridávali činidla C a D ako vo vzorkách šťav. Zmerali sa absorbancie roztokov vzoriek voči porovnávaciemu roztoku pri vlnovej dĺžke svetla  $\lambda = 670$  nm na prístroji Spekol 11. Na základe získaných výsledkov stanovenia absorbancie štandardných roztokov albumínu sa zostrojila kalibračná krivka zo závislosti odčítaných hodnôt absorbancií štandardných roztokov od koncentrácie albumínu. Potom sa odčítal z kalibračnej krivky obsah bielkovín v šťavách v g.100g<sup>-1</sup> šťavy ako aj v g.100g<sup>-1</sup> sušiny. Výsledky výpočtov uvádzajú tab. I. a II.

#### Metóda Barnsteina a Schulzeho (3)

- Použité činidlá:
- **Barnsteinove čínidlo I** – roztok CuSO<sub>4</sub>,
  - **Barnsteinove čínidlo II** – roztok NaOH,
  - 20% roztok Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>,
  - 0,020 M HCl,
  - koncentrovaná H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,
  - Tashiro indikátor,
  - 30% NaOH,
  - katalyzátor (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + CuSO<sub>4</sub>).

Vykonanie stanovenia spočíva vo vyzrážaní bielkoviny Barnsteinovým činidlom, mineralizácii vyzrážanej bielkoviny a oddestilovaním amoniaku z mineralizovanej vzorky. Do 50 g šťavy sa pridalo cca 200 ml destilovanej vody a zahrievalo sa počas 20 minút pri teplote 85 °C. Potom sa pridalo za stáleho miešania 30 ml Barnsteinovho činidla I a II, 10 ml roztoku Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, 250 ml destilovanej vody a ponechalo stať 30 minút pri teplote 80 °C. Nasledovala filtrácia cez sací papier a zrazenina sa premývala horúcou destilovanou vodou do vymiznutia reakcie na Cu<sup>2+</sup> ióny. Sací papier so zrazeninou bol vysušený pri

laboratórnej teplote a mineralizovaný v mineralizátore firmy Tecator. Oddestilovanie amoniaku z mineralizovanej vzorky bolo vykonané v destilačnom aparáte Tecator. Vypočítaný obsah bielkovinného dusíka v šťavách sa prepočítal na obsah bielkovín prepočítavacím koeficientom 6,25. Výsledky sú uvedené v tab. I. a II.

### Wilcoxonov test zhodnosti

Za účelom porovnania metód stanovenia bielkovín, Lowryho metódy a metódy Barnsteina a Schulzeho, bol vykonaný Wilcoxonov test zhodnosti, bežne nazývaný kruhový test (2). Výsledky stanovenia bielkovín dvoma metódami sú zostavené vo vzrastajúcom rade a každej hodnote je priradený zodpovedný počet miest (tab. III. a IV.). Potom sa osobitne pre každú metódu uvedie suma podriadených čísiel. Menšia z nich je označená symbolom W a jej hodnota je porovnaná s kritickou hodnotou  $W_0$  (2). Menšia suma čísiel miest  $W = 78$  sa získala pri metóde Barnsteina a Schulzeho. Odčítaná kritická hodnota z tab. 13 (2) pre  $n = 12$  je  $W_0 = 120$  a je väčšia, ako W, a z toho možno zamietnuť hypotézu o zhodnosti rozloženia

výsledkov stanovených obidvoma metódami rovnako v surovej tak aj v ťažkej šťave. Okrem toho čísla miest v Lowryho metóde sú väčšie, ako odpovedajúce čísla v metóde Barnsteina a Schulzeho (tab. III. a IV.). Možno iba prijať, že nedostatok zhodnosti rozloženia je zapríčinený rozdielom ich stredných hodnôt. Odtiaľ možno vyvodiť záver, že metóda Lowryho poskytuje skutočne vyššie hodnoty výsledkov stanovenia bielkovín ako metóda Barnsteina a Schulzeho rovnako v surových šťavách tak i v ťažkej šťave, takže skúmané metódy nemôžu byť vzájomne zastupiteľné.

V prípade surovej repnej šťavy obsah bielkovín stanovený Lowryho metódou bol od 2,83 do 3,43 g.100g<sup>-1</sup> sušiny (tab. I.) a v priemere bol desaťkrát väčší, ako obsah bielkovín v surovej šťave stanovený metódou Barnsteina a Schulzeho, používanou v cukrovarníckej analytike (od 0,264 do 0,32 g.100g<sup>-1</sup> sušiny).

V prípade ťažkej šťavy obsah bielkovín stanovených Lowryho metódou bol v rozsahu od 1,425 do 1,601 g.100g<sup>-1</sup> sušiny (tab. II.) a priemerná hodnota bola tridsaťkrát väčšia ako výsledok stanovenia bielkovín v ťažkej šťave metódou Barnsteina a Schulzeho, používanou v cukrovarníctve (0,041 0,057 g.100g<sup>-1</sup> sušiny).

### Štatistika výsledkov analýz

V tab. V. a VI. sú uvedené štatistiky analytických výsledkov v surovej a ťažkej šťave. Výsledné hodnoty stanovené metódou

Tab. V. Štatistika výsledkov stanovení v surovej šťave

		Bielkoviny metóda Lowryho		Celkový dusík metóda Barnsteina a Schulzeho		Bielkovina = celkový dusík × 6,25	
		(g.100g <sup>-1</sup> šťavy)	(g.100g <sup>-1</sup> sušiny)	(g.100g <sup>-1</sup> šťavy)	(g.100g <sup>-1</sup> sušiny)	(g.100g <sup>-1</sup> šťavy)	(g.100g <sup>-1</sup> sušiny)
Aritmetický priemer °Bx	14,7	0,457	3,10	0,0071	0,048	0,045	0,300
Štandard. odchýlka populácie	0,14	0,024	0,159	0,0005	0,004	0,003	0,023
Štandardná odchýlka	0,15	0,025	0,166	0,0006	0,004	0,003	0,024
Min.	14,5	0,415	2,83	0,0063	0,04	0,04	0,264
Max.	14,9	0,49	3,34	0,0078	0,052	0,049	0,327
Median	14,75	0,451	3,07	0,0071	0,048	0,045	0,304
Variačný koeficient	0,022	0,00622	0,0276	3,220E-07	1,827E-05	1,136E-05	5,686E-04

Tab. VI. Štatistika výsledkov stanovení v ťažkej šťave

		Bielkoviny metóda Lowryho		Celkový dusík metóda Barnsteina a Schulzeho		Bielkovina = celkový dusík × 6,25	
		(g.100g <sup>-1</sup> šťavy)	(g.100g <sup>-1</sup> sušiny)	(g.100g <sup>-1</sup> šťavy)	(g.100g <sup>-1</sup> sušiny)	(g.100g <sup>-1</sup> šťavy)	(g.100g <sup>-1</sup> sušiny)
Aritmetický priemer °Bx	64,4	0,987	1,532	0,0053	0,0082	0,033	0,051
Štandard. odchýlka populácie	0,559	0,354	0,0475	0,000492	0,000726	0,00324	0,00451
Štandardná odchýlka	0,584	0,369	0,0496	0,000514	0,000758	0,00338	0,00471
Min.	63	0,024	1,452	0,0042	0,0065	0,026	0,041
Max.	65,2	1,026	1,601	0,0059	0,0091	0,037	0,057
Median	64,45	0,977	1,523	0,00535	0,00825	0,0335	0,0515
Variačný koeficient	0,341	0,136	0,00246	2,639E-07	5,748E-07	1,145E-05	2,215E-05

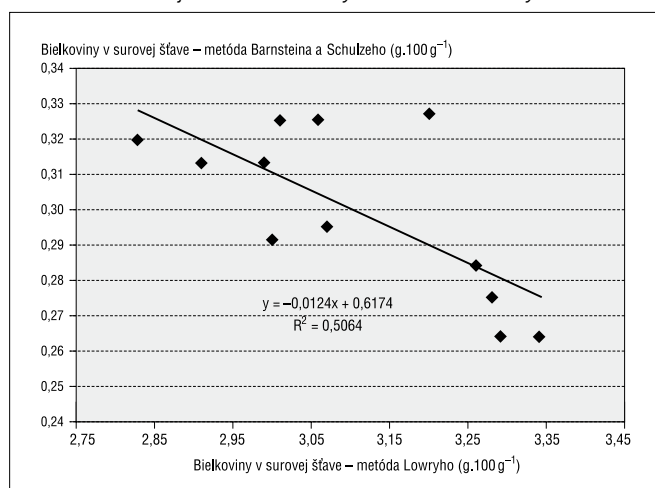
Lowryho a metódou Barnsteina a Schulzeho sa významne líšia rovnako v surovej tak aj v ťažkej šťave. Svedčia taktiež o tom, že metódou Lowryho sa stanovia podstatne väčšie hodnoty bielkovín v šťave ako metódou Barnsteina a Schulzeho, teda nie je možnosť náhrady jednej metódy metódou druhou.

### Diskusia výsledkov

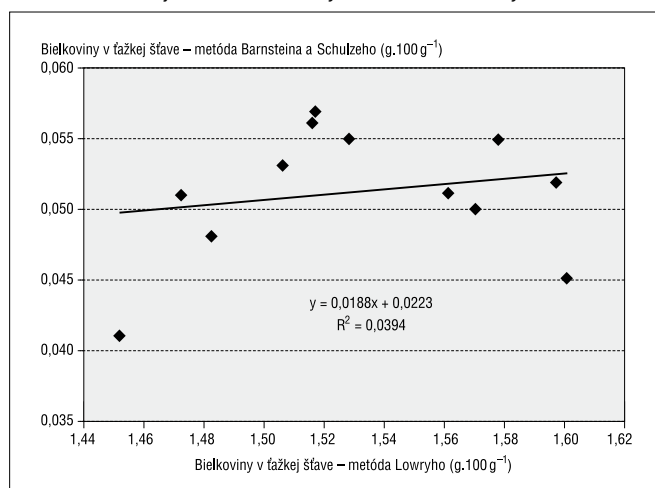
Obr. 1. predstavuje obsah bielkovín v surovej šťave stanovených metódou Barnsteina a Schulzeho v surovej šťave v závislosti od hodnoty bielkovín stanovených metódou Lowryho. Druhá mocnina korelačného koeficienta tejto závislosti je  $R^2 = 0,5084$ . Odtiaľ  $R = 0,7130$  a jeho hodnota je väčšia, ako tabuľková (2) hodnota koeficientu  $R_0 = 0,5324$  (pre  $n = 12$ ,  $\alpha = 0,05$ ). Toto umožňuje predpokladať, že existuje lineárna korelácia medzi týmito premennými. Za účelom získania lepších výsledkov bolo by potrebné vykonať sledovanie s väčším počtom vzoriek.

Na obr. 2. je znázornený obsah bielkovín v ťažkej šťave stanovených metódou Barnsteina a Schulzeho v závislosti od obsahu bielkovín v ťažkej šťave stanovených metódou Lowryho. Druhá mocnina korelačného koeficientu tejto závislosti je  $R^2 = 0,0394$ . Malá hodnota druhej mocniny korelačného koeficienta svedčí o tom, že neexistuje lineárna korelácia medzi týmito premennými.

Obr. 1. Obsah bielkovín v surovej šťave stanovených metódou Barnsteina a Schulzeho v závislosti od obsahu bielkovín v surovej šťave stanovených metódou Lowryho



Obr. 2. Obsah bielkovín v surovej šťave stanovených metódou Barnsteina a Schulzeho v závislosti od obsahu bielkovín v ťažkej šťave stanovených metódou Lowryho



V prípade surovej šťavy potvrdila sa možnosť existencie lineárnej korelácie medzi obsahom bielkovín v surovej šťave stanovených metódou Barnsteina a Schulzeho a obsahom bielkovín stanovených metódou Lowryho. Naproti tomu v prípade ťažkej šťavy sa táto korelácia nepotvrdila. Môže to byť spôsobené aj tým, že v ťažkej šťave je podstatne menej bielkovinných zlúčenín [v priemere 0,033 g.100g<sup>-1</sup> šťavy – metóda Barnsteina (6)], pretože sa odstránili v technologickom procese.

Taktiež v ťažkej šťave sa môžu nachádzať aj zlúčeniny pochádzajúce z rozkladu niektorých necukrov, ktoré môžu podstatne ovplyvniť stanovenie bielkovín metódou Lowryho. Rovnako môže mať vplyv na výsledok stanovenia aj vysoký obsah sacharózy v ťažkej šťave (5), i keď šťavy pred analytickým stanovením boli päťdesiatkrát zriedené.

Z literárnych údajov vyplýva (5) že Folin-Ciocalteiho činidlo dáva počas stanovenia bielkoviny niekedy dodatočné reakcie s mnohými nebielkovinými substanciami. Bolo zistené (5), že najsilnejšie interferujúcou skupinou zlúčenín sú

aminokyseliny, z nich najmä tyrozín a tryptofán. Menšie interferencie dávajú cysteín a minimálne interferencie fenylalanín, histidín, lyzín a taurín, kým ostatné aminokyseliny interferencie s Folin-Ciocalteiho činidlom nedávajú. Interferencie vytvárajú aj oligopeptidy, dokonca aj dipeptidy, ktoré obsahujú vo svojom zložení aromatické aminokyseliny. Všetky nukleotidy, ako aj purínové a pirimidínové zásady interferencie vôbec nevytvárajú, niekedy len v stopách. Zo sacharidov nepatrnú interferenciu vykazuje sacharóza pri relatívne vysokej koncentrácii 1 mg.ml<sup>-1</sup> (5).

Príčinou vysokých rozdielov medzi výsledkami stanovenia bielkovín, najmä v ťažkej šťave, metódou Lowryho a metódou Barnsteina a Schulzeho môže byť vysoký obsah sacharózy ako prítomnosť farebných zlúčenín a niektorých necukrov, poskytujúcich dodatočné reakcie s Folin-Ciocalteiho činidlom, čo pri nízkom obsahu bielkoviny v ťažkej šťave môže výsledky stanovenia bielkovín Lowryho metódou podstatne ovplyvniť. V tab. VII. sú uvedené výhody a nevýhody metód Lowryho a Barnsteina a Schulzeho, použitých na stanovenie bielkovín v cukrovarníckych šťavách.

## Záver

1. V prípade analýzy ťažkej šťavy nezískala sa lineárna korelácia medzi výsledkami získanými Lowryho metódou a výsledkami stanovenia bielkovín získanými metódou Barnsteina a Schulzeho. Iba v prípade analýzy surovej šťavy korelačný koeficient  $R = 0,713$  bol väčší ako kritická hodnota korelačného koeficienta  $R_0 = 0,5324$  (pre  $n = 12$ ,  $\alpha = 0,05$ ), čo svedčí o možnosti existencie lineárnej závislosti, k potvrdeniu tohto by bolo potrebné vykonať podstatne viac porovnávacích pokusov.
2. Metódu Lowryho možno použiť na stanovenie bielkovín v cukrovarníckych roztokoch, predsa je treba počítať s tým, že touto metódou sa stanovia ako bielkoviny aj niektoré necukry, napr. tyrozín, tryptofán, cysteín, a z toho dôvodu sú výsledky stanovení touto metódou podstatne vyššie ako výsledky stanovenia bielkovín metódou Barnsteina a Schulzeho, používanou v cukrovarníctve.
3. V prípade surovej šťavy obsah bielkovín stanovený metódou Lowryho bol v priemere 0,457 g.100g<sup>-1</sup> šťavy, 3,1 g.100g<sup>-1</sup> sušiny) a bol v priemere desaťkrát väčší ako hodnota obsahu bielkovín v surovej šťave stanovená metódou Barnsteina a Schulzeho, ktorá je používaná v cukrovarníckej analytike (0,045 g.100g<sup>-1</sup> šťavy, 0,3 g.100g<sup>-1</sup> sušiny).
4. V prípade ťažkej šťavy obsah bielkovín stanovených metódou Lowryho bol v priemere 0,987 g.100g<sup>-1</sup> šťavy (1,5 g.100g<sup>-1</sup> sušiny) a priemerne tridsaťkrát väčší ako hodnota bielkovín v ťažkej šťave stanovených metódou Barnsteina a Schulzeho (0,033 g.100g<sup>-1</sup> šťavy, t.j. 0,051 g.100g<sup>-1</sup> sušiny).
5. Metóda Lowryho má veľa predností (tab. VII.) v porovnaní s metódou Barnsteina a Schulzeho. Charakterizuje ju jednoduchý pracovný postup s relatívne krátkym časom na vykonanie analýzy, vysoká citlivosť (možnosť stanovenia obsahu bielkoviny už od 1 µg), použitie malého množstva reakčných činidiel a jednoduché, nekomplikované zariadenie na analýzy.

Metódu Lowryho možno využiť v cukrovarníckej analytike na porovnanie relatívnych hodnôt stanovenia obsahu bielkovín v šťavách a na ich základe určiť napr. úbytok bielkovín v šťavách v priebehu technologického procesu.

Tab. VII. Porovnanie Lowryho metódy s metódou Barnsteina a Schulzeho, použitých na stanovenie bielkovín v cukrovarníckych šťavách

Metoda Lowryho	Metoda Barnsteina a Schulzeho
Vysoká citlivosť metódy, možnosť stanovenia bielkoviny už od 1 µg	Vysoká citlivosť metódy, možnosť stanovenia dusíka už od 1 µg
Jednoduchý pracovný postup analýzy	Zložitý pracovný postup
Krátky čas vykonania analýzy (asi 1 hod.)	Vysoká časová náročnosť na analýzu (čas vykonania asi 8 hod.)
Jednoduché prístrojové vybavenie na analýzu (napr. spektrokolorimeter Spekol, pipety, skúmavky)	Zložitá aparatura: mineralizátor, vodný kúpeľ, destilačný aparát na destiláciu s vodnou parou, odmerné banky, erlenmayerové banky, byrety
Použitie reakčných činidiel malej koncentrácie, napr. 1% roztok CuSO <sub>4</sub>	Použitie koncentrovaných reakčných činidiel (konc. kyselina sírová, sodný alkalický roztok cca. 30%, soli medi a hliníka)
Malá spotreba reakčných činidiel (cca 6 ml rôznych činidiel na jedno stanovenie)	Značná spotreba reakčných činidiel (cca. 200 ml rôznych činidiel na jedno stanovenie)
Použité činidlá nespôsobujú zhoršenie životného prostredia	Použitie činidiel môžu spôsobiť zhoršenie životného prostredia, nevyhnutnosť ich utilizácie
Fólinovo činidlo reaguje s nebielkovinými zložkami, kvôli ktorým sú výsledky stanovenia bielkovín touto metódou podstatne vyššie, ako pri metóde Barnsteina a Schulzeho	Počas stanovenia celkového dusíka dochádza k spoločnému vyzrážaniu aminokyselín
Nevyhnutnosť výberu bielkoviny na zostrojenie kalibračnej krivky (obvykle sa používa albumín), ktorý nie je adekvátny s bielkovinou nachádzajúcou sa v cukrovej repe a šťavách	
Popísané štatistické hodnoty sa menej využijú v prípade Lowryho metódy, ako v prípade metódy Barnsteina a Schulzeho (tab. V. a tab. VI.)	

## Súhrn

Obsah bielkovín v surovej a ťažkej šťave stanovených metódou Lowryho bol podstatne väčší ako obsah bielkovín v týchto šťavách stanovených metódou Barnsteina a Schulzeho, ktorá sa používa v cukrovarníckej analytike. Okrem značných rozdielov stanovenia bielkovín týmito metódami, metóda Lowryho môže však byť použitá na stanovenie bielkovín v cukrovarníckych roztokoch vzhľadom na jej jednoduchý pracovný postup a krátky čas vykonania analýzy. Je potrebné však zobrať do úvahy, že výsledky stanovenia bielkovín touto metódou môžu obsahovať aj stanovenia niektorých necukrov, ako sú napr. tyrozín a tryptofan.

**Kľúčové slová:** Lowryho metóda, Barnstein a Schulzeho metóda, bielkoviny, ťažká šťava, ľahká šťava.

*Preklad: Alexander Dandár*

## Literatúra

- AJDARI RAD, M., SENGE, B.: Kontrolowanie przebiegu procesu oczyszczania soku metodą inline i online. *Gaz. Cukrown.*, 111, 2003, s. 11–18.
- BOŻYK, Z.; RUDZKI, W.: *Metody statystyczne w badaniu jakości produktów żywnościowych i chemicznych*. Warszawa: WNT, 1997, s. 84, 369.
- BUTWIŁOWICZ, A.: *Metody analityczne kontroli produkcji w cukrowniach*. Warszawa: IPC, 1997, s. 64.
- DOBRYCZY, J.: *Analiza chemiczna w cukrownictwie*. Warszawa: WNT, 1978, s. 197.
- KOŁAKOWSKI, E.; BADNARZYK, B.; NOWAK, B.: Oznaczenie produktów hydrolizy białka zmodyfikowana metodą Lowryego. In *XXXI Sesja Naukowa KtChZ PAN „Żywność w dobie ekspansji naukowej: potencjał, oczekiwania, perspektywy”*. Poznań, 2000, s. 125.

6. KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ, L.: *Ćwiczenia z biochemii*. Warszawa: PWN, 1999, s. 249.

7. TOCZKO, M.; GRZELIŃSKA, A.: *Materiały do ćwiczeń z biochemii*. Warszawa: SGGW, 1995, s.20.

## Wnuk B.: Trials on the Application of the Lowry Method for Determination of Protein Content in Sugar Beet Juices

The protein content determined by the Lowry method in raw and thick juices was significantly higher than the protein content in the same juices determined by means of the Barnstein and Schulze method, which is the recommended analytical method for use in the sugar industry. Despite the substantial differences in the results of the two methods applied, the Lowry method can be used for the determination of the protein content in sugar solutions because of its simple procedure and short result waiting time. However, it must be taken into consideration that determination of the protein using the Lowry method, includes also determination of some of non-sugar components such as, among others, tyrosine and tryptofan.

**Keys words:** Lowry method, Barnstein and Schulze method, proteins, thick juice.

## Kontaktná adresa – Contact address:

Dr Inż. Bożena Wnuk, Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Instytut Chemicznej Technologii Żywności, Zakład Cukrownictwa, ul. B. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź, Polska, e-mail: bozena.wnuk@p.lodz.pl