

## ОСНОВНІ ПУБЛІКАЦІЇ

УДК 577.112.3:620.11:543.544:637+631.56

О. Л. НОВАК, С. Д. МЕЛЬНИЧУК

### УДОСКОНАЛЕНА МЕТОДИКА КИСЛОТНОГО ГІДРОЛІЗУ БІЛКІВ У НАТУРАЛЬНИХ ЗРАЗКАХ ТА ПІДГОТОВКА ГІДРОЛІЗАТІВ ДО АМІНОКИСЛОТНОГО АНАЛІЗУ

*Детально рассмотрен процесс кислотного гидролиза белков в натуральных образцах для последующего определения аминокислотного состава на анализаторе аминокислот. Подчеркнута необходимость предварительного представления о составе образца (концентрации белков, углеводов, липидов, влажности) для эффективного проведения гидролиза белков. Изучен вопрос определения, необходимого для проведения гидролиза белков объема 6 н. НСІ. Изучен вопрос применения антиоксидантов в процессе гидролиза. Предложен метод проведения кислотного гидролиза белков в закрытых колбах, размещенных в эксикаторе, вместо сложного метода гидролиза в запаянных ампулах. Предложена вакуумная установка для упаривания проб после гидролиза, которая может заменить роторный испаритель.*

*The process of acid hydrolysis of proteins in natural samples for the following amino-acid determination on amino-acid analyzers was reviewed in detail. The need of knowledge of sample content (protein, carbohydrates, lipid and moisture contents) was emphasized. The issue of determination of the 6N hydrochloric acid volume, needed for protein hydrolysis and antioxidant application in this process was studied. There was proposed the method of acid hydrolysis of proteins using closed flasks within exiccator instead of applying more complicated hydrolysis method using soldered ampoules. The vacuum set for sample epeporation, which may be used instead of rotor vapor, was also suggested.*

Аналіз амінокислот має важливе значення як для наукових досліджень, так і для практичних потреб. Класичним методом визначення амінокислотного складу будь-якого об'єкта є рідинна іонообмінна хроматографія,

на основі якої працюють аналізатори амінокислот – прилади, що винайшли у 1958 р. видатні американські біохіміки: С. Мур (S. Moore) і В. Стайн (W. Stein), які одержали Нобелівську премію з хімії за 1972 рік.

Загальне визнання цього методу забезпечують: значна роздільна здатність (до 50 компонентів), висока чутливість (від 50 пікомолей), мала похибка визначення (1–3 %) та повна автоматизація процесу аналізу.

Визначення більшості амінокислот у білках проводиться за допомогою кислотного гідролізу 6 н. соляною кислотою.

Для наукових досліджень проводиться, насамперед, виділення білків, яке здійснюється із застосуванням одного з видів екстракції з наступним їх осадженням (або вилученням методами іонообмінної хроматографії) та подальшим випарюванням водяних розчинів [1].

У випадку проведення масових аналізів харчових продуктів та кормів, а саме для проведення кислотного гідролізу білків, беруть їх натуральні зразки.

Важливим є питання щодо необхідного об'єму 6 н. соляної кислоти для проведення гідролізу.

Деякі автори визначають цей об'єм за відношенням до маси зразка [2, 3, 4]. Інші автори беруть відношення об'єму 6 н. соляної кислоти до маси білка, що міститься у зразку [1]. Ці співвідношення, які дуже відрізняються (від 4000 [2, 3] до 50 [4]), мають принципове значення і вимагають чіткої відповіді.

Успішному проведенню гідролізу білків у натуральних зразках може заважати наявність у них великої кількості вологи, ліпідів і вуглеводів. Рекомендації щодо позбавлення впливу цих факторів часто є неповними і тому потребують уточнення, як і проведення самого процесу гідролізу з використанням 6 н. соляної кислоти.

Способи гідролізу 6 н. HCl досить різноманітні. Ряд авторів пропонують робити кислотний гідроліз харчових продуктів і кормів у автоклаві. Ми не мали можливості перевірити цей спосіб. Інші автори пропонують здійснювати гідроліз у колбах (зі шліфом і зворотним холодильником), в яких наважки зразків кип'ятять у 6 н. HCl.

Найбільш вживаним способом гідролізу є його здійснення у запаяних скляних ампулах. У цьому випадку наважку зразка поміщають на дно ампули з довгою шийкою, заливають 6 н. HCl і запаюють у вакуумі (або в атмосфері аналітично чистого азоту чи аргону). Гідроліз проводять при температурі 110 °C протягом 20–22 год.

На наш погляд, здійснення гідролізу білків у запаяних ампулах є занадто складною операцією. По-перше, скляні ампули не випускаються промисловістю і, отже, повинні бути виготовлені складувом. Коштують вони недешево, тим більше, що одна ампула може бути використана щонайбільше 4 рази. По-друге, відсмоктування повітря з ампули здійснюється масляним вакуумним насосом. Оскільки хлористий водень, що відсмоктується насосом разом з повітрям, швидко виводить насос з ладу, між ампулою і насосом потрібно

ставити уловлювач хлористого водню. Для запаювання ампул потрібні пальник, балони з пропаном і киснем. У варіанті, коли з ампули видаляється повітря, необхідне попереднє заморожування розчинів проб у ампулах рідким азотом. При використанні інертного газу застосовують ампули великого об'єму для запобігання їх руйнуванню під дією значного тиску газу.

Автори пропонують власну методику проведення гідролізу білків у зразках як рослинного, так і тваринного походження, яка протягом багатьох років застосовується ними у лабораторії, дає добрі результати і не вимагає спеціального коштовного обладнання.

### Підготовка зразків до гідролізу

Перед проведенням гідролізу необхідно знати дані (з точністю  $\pm 5\%$ ) про зразки (концентрацію білків, вуглеводів, ліпідів та загальну вологість). Концентрацію білків потрібно знати для визначення об'єму HCl, якою здійснюється гідроліз білків. При цьому об'єм 6 н. соляної кислоти треба брати відносно маси білка.

Раніше [2] вміст амінокислот визначався у білках, які виділяли з досліджуваного матеріалу (за масу наважки при цьому приймали масу виділених білків). У подальшому для аналізу натуральних зразків кислотний гідроліз почали проводити без попереднього виділення білків. При цьому визначення об'єму 6 н. HCl для гідролізу необхідно було виконати після перерахунку маси зразків на масу білків, які входять до їх складу, але цього не було зроблено. Легко можна довести, що для натуральних зразків співвідношення кислота : наважка веде до неправильної інтерпретації результатів [4].

Кількість білків, що виділяють для наукових досліджень, становить міліграми або їхні частки. Збільшення у 4000 разів означає, що на 1 мг білка припадає 4 см<sup>3</sup> 6 н. HCl.

Для аналізу натуральних зразків через неоднорідність їх складу масу наважки доводиться брати у грамах або частках грама, і тому вказане співвідношення виглядає дещо нереальним. Ряд авторів [3, 4] вказують на достатність для харчових продуктів і кормів співвідношення 6 н. HCl : білок, як 200 : 1. Наш досвід підтверджує правильність цього співвідношення. При цьому слід мати на увазі, що його збільшення (навіть у багато разів) не тільки допустиме, але й бажане. Під час аналізу зразків підвищеної вологості необхідно їх попереднє висушування, яке потрібно здійснювати у кліматичних умовах лабораторії, а не у сушильній шафі при температурі 102–105 °С. Ми пропонуємо висушувати зразки за допомогою ротормого випарювача або вакуумної установки (рис. 1) при температурі 60–65 °С. Це дає можливість значно прискорити процес висушування і запобігає змінам у зразку, які впливають на склад амінокислот.

Для зразків, що мають у своєму складі багато крохмалю (вуглеводів), – наприклад зерно, борошно та ін., – потрібно перед проведенням гідролізу додавати антиоксиданти для подолання реакції взаємодії амінокислот з вуглеводами. Звичайно рекомендують додавати антиоксиданти у межах 5–10 %

[4]. Ми висунули припущення щодо можливості збільшення концентрації антиоксидантів до рівня вуглеводів. Для дослідження довільно брали овес і тритікале. Як антиоксиданти використовували гідроксиламін (1-й варіант) і фенілгідазин (2-й варіант) у концентраціях, починаючи з 10 %.

Для вівса сума амінокислот у першому варіанті збільшилась на 10 %, у другому варіанті – на 14 %. Вихід окремих амінокислот помітно збільшився: аспарагіну (асп) – на 21 %, серину (сер) на – 22 % (в обох варіантах). Вихід аргініну (арг) збільшився в 1-му варіанті на 3 %, в другому – на 15 %.

Для тритікале додавання гідроксиламіну та фенілгідазину (10 %) призвело до деякого зменшення виходу більшості амінокислот: у 1-му варіанті (в сумі) на 21,0 %, у другому – на 6,9 %).

Проте додавання цих антиоксидантів у кількості 50 %, що приблизно дорівнює концентрації вуглеводів у зразку, призвело до збільшення концентрацій майже всіх амінокислот: у 1-му варіанті (в сумі) на 3 %, в другому – на 6,6 %, аргініну – на 30,9 %.

Отже, додавання антиоксидантів у процесі гідролізу зразків, які містять значну кількість вуглеводів, може помітно збільшити вихід амінокислот, але оптимальну концентрацію антиоксидантів треба підбирати для кожного матеріалу окремо. В усіх випадках додавання фенілгідазину дає помітно більший ефект порівняно з гідроксиламіном. Для зразків, які містять значну кількість жиру (ліпідів), наприклад олійних культур, необхідне попереднє їх знежирювання екстракцією діетиловим ефіром у апараті Сокслета. Знежирювання необхідне для зразків, що містять більше ніж 5 % жиру у перерахунок на суху речовину [5].

### Проведення гідролізу

Перед гідролізом необхідно правильно визначити і підготувати середній зразок. Для харчових продуктів і кормів через неоднорідність складу його маса коливається в межах 0,1–1,0 г.

Ми пропонуємо проводити гідроліз у скляних круглодонних колбах зі шліфом № 29 і притертою пробкою. У колбу поміщають наважку зразка, яку заливають 6 н. соляною кислотою. У багатьох випадках для проведення гідролізу беруть 1 г зразка і, якщо концентрація білка не перевищує 25 %, достатньо взяти 50 см<sup>3</sup> 6 н. HCl.

У цих випадках для гідролізу беруть колби місткістю 100 см<sup>3</sup>, яку продувають аргоном чи азотом аналітичної чистоти.

Потім колбу закривають скляною пробкою і ставлять в ексікатор. Якщо скляна пробка легка і може піднятися під час нагрівання колби в ексікаторі, на неї одягають перевернутий фарфоровий стакан. Перед гідролізом через колбу пропускають аргон або азот аналітичної чистоти. На дно ексікатора кладуть вуглекислий натрій Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, який заливають водою (для ексікатора діаметром 250 мм беруть приблизно 75 г Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> і 150 см<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O). Закривають ексікатор кришкою і разом з колбами для гідролізу ставлять його в сушильну

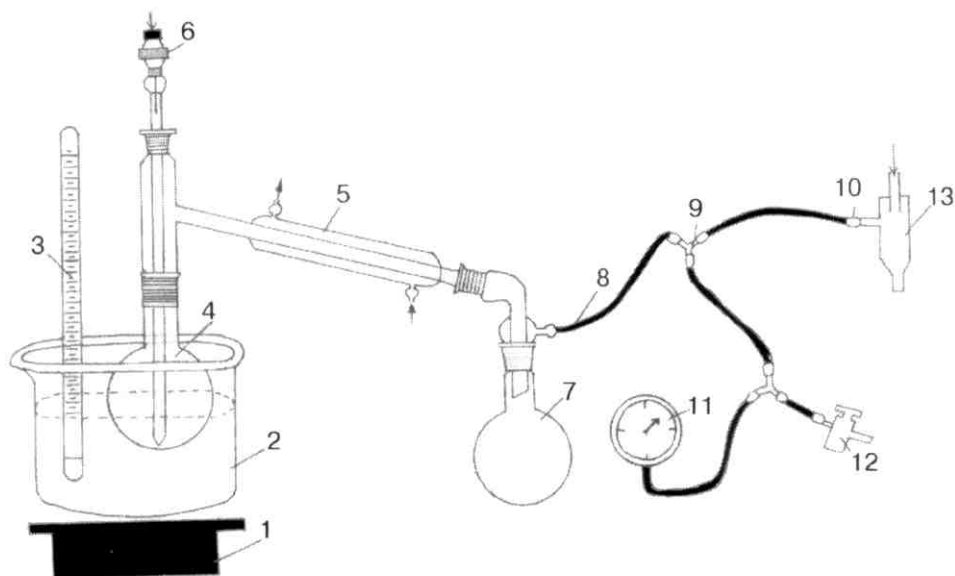
шафу, яку повільно нагрівають до температури 106 °С, і витримують протягом 24 год. Суміш при цьому не повинна кипіти.

Хлористий водень, який виділяється з колб, взаємодіє з вуглекислим натрієм. У результаті цієї реакції виділяється вуглекислий газ, який у даному середовищі є нейтральним. Досвід показав, що втрати хлористого водню з колб є мінімальними (менше ніж 0,5 %) і не позначаються на процесі гідролізу, оскільки  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в ексикаторі вистачає для проведення десятків гідролізів. За межі ексикатора хлористий водень не виділяється зовсім.

### Підготовка зразків до амінокислотного аналізу після проведення гідролізу

Охолоджений гідролізат відфільтровують на скляному фільтрі (пори – 16–40 мкм), потім кількісно переносять його в мірну колбу місткістю 500 см<sup>3</sup> і доводять дистильованою водою до мітки. З одержаного розчину відбирають 50,0 см<sup>3</sup> рідини, яку переливають у колбу роторного випарювача, під'єданого до водоструминного насоса, і випарюють рідину при 50 °С.

У разі відсутності роторного випарювача (або виходу його з ладу) пропонується здійснювати випарювання у розробленій нами установці для випарювання у вакуумі (рис. 1).



**Рис. 1. Установа для випарювання у вакуумі**

- 1 – електроплитка з регульованим нагрівом;
- 2 – водяна баня;
- 3 – термометр;
- 4 – круглодонна колба;
- 5 – холодильник Лібіха;
- 6 – гвинтовий затискач;
- 7 – круглодонна колба;
- 8 – товстостінні гнучкі гумові або ПВХ-шланги;
- 9 – скляні переходи;
- 10 – хомути;
- 11 – вакуумметр;
- 12 – скляний кран;
- 13 – водоструминний насос

Як відгінну в установці використовують круглдонну колбу зі шліфом № 29, місткістю 100 см<sup>3</sup>. Шліф герметизують гумовою пробкою, в яку вставляють скляну трубку (внутрішній діаметр 10 мм) і мікропіпетку, що дістає майже до дна колби і відіграє роль капіляра для подавання бульбашок газу аргону або азоту у рідину. На мікропіпетку зверху натягують невеличку еластичну гумову трубку, в отвір якої вставляють тоненьку мідну дротину з гвинтовим затискачем. Пара рідини конденсується у холодильнику Лібіха. До складу установки входить вакуумметр і кран для з'єднання чи роз'єднання з атмосферним повітрям. Звичайно, випарування рідини в установці відбувається повільніше, ніж у роторному випарювачі, але для невеликих об'ємів рідини (50 см<sup>3</sup>) це не є великим недоліком. Робота на установці має перевагу перед роторним випаровувачем, оскільки дозволяє пропускати інертний газ за допомогою мікропіпетки безпосередньо крізь рідину. Цю ж установку використовують для висушування зразків і визначення їх вологості. Для багатьох зразків час висушування не перевищує 2 год.

### Статистична обробка результатів

Ми вивчали результати аналізів амінокислотного складу для довільно обраного зразка комбікорму привикористанні вищезгаданої вакууммної установки. Після розчинення гідролізату комбікорму у мірній колбі місткістю 500 см<sup>3</sup> з неї 5 разів відбирали проби по 50,0 см<sup>3</sup>, які випаровували на установці, потім розчиняли у пробовому буфері (рН = 1,8 або 2,2) і аналізували на аналізаторі амінокислот марки ААА-339-М виробництва фірми "Мікротехна-Прага".

Згідно з інструкцією на аналізатор, похибка аналізу виражена у відтворюваності, що (іншими словами) являє собою коефіцієнт варіації, який розраховується на основі десятків паралельних визначень і для більшості амінокислот не перевищує 3 %. У згаданих аналізах коефіцієнт варіації для 15 амінокислот змінювався від 1,64 % для тирозину до 4,00 % для серину, для деяких амінокислот трохи перевищував 3 % (мет – 3,2 %, арг – 3,19 %). Для інших амінокислот коефіцієнт варіації складав менше за 3 %.

Була також перевірена ефективність запропонованого нами методу кислотного гідролізу для довільно обраного зразка жита. Чотири зразки жита окремо готувались і аналізувались. Для більшості амінокислот похибка була меншою ніж 3 %, для асп – 3,18 %, тре – 3,26 %, глі – 3,78 %.

Одержані результати є цілком прийнятими.

### Висновки

Для того, щоби правильно підготувати натуральний зразок до кислотного гідролізу білків, у ньому, необхідно попередньо знати концентрацію і загальну вологість білків, вуглеводів, ліпідів.

Від концентрації білків залежить об'єм 6 н. соляної кислоти, якою проводиться гідроліз білків. Об'єм 6 н. HCl треба брати стосовно концентрації білків у зразку, а не до маси зразка (як це пропонується у багатьох роботах).

Для здійснення гідролізу білків у харчових продуктах і кормах достатнім є співвідношення кислота: білок, як 200:1, хоча збільшення цього співвідношення навіть у десятки разів є не тільки допустимим, але і бажаним.

Для зразків з великим вмістом вуглеводів до соляної кислоти слід додавати антиоксиданти (фенілгідразин). Оптимальну концентрацію антиоксидантів, яка впливає на вихід амінокислот, слід підбирати до кожного матеріалу окремо.

Замість складного методу гідролізу білків у запаяних скляних ампулах, запропоновано здійснювати його у закритих скляних круглодонних колбах зі шліфом, які разом з наважкою зразка і 6 н. HCl розміщують в ексікаторі.

Доведено, що випаровування проб після гідролізу можна здійснювати не тільки у роторному випарювачі, а й у запропонованій вакуумній установці.

### *Література*

1. **Т. Д. Козаренко, С. Н. Зуев, Н. Ф. Муляр.** Ионообменная хроматография аминокислот. Новосибирск.: Наука, Сибирское отделение, 1981. – С. 83.
2. **Блок Р.** Аминокислотный анализ белковых гидролизатов. “Аналитические методы белковой химии”. М.: ИЛ, 1963. – С. 465.
3. Аминокислотный анализ протеина кормов и продуктов животноводства. М.: – 1968 г. – С. 12.
4. **В. Г. Рядчиков.** Улучшение зерновых белков и их оценка. М.: Колос, 1978. – С. 85–92.
5. Химический состав пищевых продуктов. Под редакцией И. М. Саурихина, М. Н. Волгарева. М.: Агропромиздат, 1987. – С. 284.

*Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК.*

*Отримано 30.07.04*