

## TESTAREA UNOR MICROMETODE RAPIDE PENTRU DETERMINAREA PROTEINELOR DIN SEMINȚE DE INTERES ALIMENTAR

Conf. dr. Marcel Avramiuc  
Universitatea "Ștefan cel Mare" Suceava

### Rezumat

Folosind trei micrometode diferite pentru determinarea conținutului proteic al unor semințe vegetale, lucrarea de față testează eficiența, rapiditatea și acuratețea acestora în raport cu o metodă de referință (micro-Kjeldahl). Datele obținute arată că fiecare din cele trei micrometode testate (turbidimetrică, a biuretilor și cu ninhidrină) a înregistrat, la cel puțin una din speciile analizate, un conținut proteic seminal foarte apropiat valoric de cel obținut prin metoda de referință. Metoda turbidimetrică s-a dovedit cea mai ieftină, mai simplă și mai productivă, putând înlocui metoda de referință (micro-Kjeldahl) în determinările de serie, efectuate pe semințe de grâu și porumb. Metoda biuretilor, puțin mai laborioasă, mai costisitoare și mai lentă decât cea turbidimetrică, a fost utilă în cazul semințelor de porumb și de bob, iar metoda cu ninhidrină costisitoare și greu de folosit la determinări de serie, a fost utilă în dozările de proteină brută pe semințe de secară.

### Abstract

Using three different biochemical micromethods (turbidimetric, biuret and ninhydrine) for measuring the crude protein content of some cereal and pulse seeds, this paper tests the efficiency, rapidity and accuracy of these methods compared to a blank one (micro-Kjeldahl). The data show that each one of the three tested micromethods has registered (at least to one of the analysed species) a protein content very close to that one obtained through blank method (micro-Kjeldahl). The turbidimetric method, which was the cheapest, the simplest and the most productive, could replace micro-Kjeldahl method on serial determinations accomplished on wheat and maize seeds. The biuret method, more laborious, more expensive and slower than the turbidimetric one, was useful for maize and broad bean seeds, while the ninhydrine method, expensive and difficult to use on serial determinations, was useful for crude protein measuring carried out on rye seeds.

## INTRODUCERE

Componente structurale și funcționale de o deosebită importanță pentru organismele vii, proteinele reprezintă o permanentă preocupare pentru mulți cercetători în domeniu. Deși mai sărace decât la animale, țesuturile multor plante oferă o mare diversitate de substanțe proteice încă necunoscute, ale căror însușiri ar putea fi valorificate în folosul omului.

Întrucât orice cercetare legată de această tematică începe cu identificarea și dozarea substanțelor proteice din țesutul vegetal investigat, în lucrarea de față sunt testate trei micrometode rapide și simple

de determinare a conținutului proteic seminal, în scopul evidențierii eficienței acestora în raport cu o micrometodă de referință.

## MATERIALUL ȘI METODELE DE CERCETARE

Materialul biologic a constat în eșantioane, conținând minimum 100 de semințe, de la 5 specii de plante cultivate (grâu, secară, porumb, fasole și bob), care au fost fin măcinate la o moară de laborator. Din făina fiecărei probe de semințe, s-a determinat cantitatea de proteină brută la 100 g substanță uscată cu ajutorul a 4 micrometode, care au mai fost utilizate în cadrul unor cercetări privind

evaluarea calității unor semințe conservate (Drochioiu și colab., 1996; Nimigean și colab., 1996).

(1) Metoda micro-Kjeldahl

100 mg de făină se mineralizează în baloane Kjeldahl cu 2 g de amestec catalizator (3 părți  $K_2SO_4$  și o parte  $CuSO_4$ ) și 3 ml  $H_2SO_4$  concentrat timp de aproximativ o oră. Aspectul incolor al produsului obținut indică finalul acestei prime etape. În continuare, proba se distilă cu 25 ml soluție 40% NaOH care conține și 5%  $Na_2S_2O_3$ . Distilatul se prinde în acid boric și se titrează cu  $H_2SO_4$  0,02 n, notându-se numărul de mililitri folosiți la titrare. Aceleași etape le parcurge și o probă martor, la care materialul biologic este înlocuit cu apă distilată. Calculul se efectuează conform formulei:

Proteină la %  $SU = (V - V_0) \cdot 0,28 \cdot 6,25 / S.U.$ , în care:

V = numărul de mililitri folosiți la titrare;

$V_0$  = numărul de mililitri folosiți la titrarea probei martor;

S.U. = umiditatea probei.

(2) Metoda turbidimetrică

Câte 100 mg de făină se tratează cu 10 ml soluție 0,005 n de KOH, apoi se agită timp de 45 de minute, după care se filtrează. Într-o eprubetă, conținând un mililitru de filtrat, se adaugă 5 ml acid sulfosalicilic 1,5%, iar în altă eprubetă, cu același conținut, 5 ml de apă, după care se agită energic. După o oră, se citesc extincțiile opalescenței soluțiilor rezultate, la 440 nm în cuve de sticlă de 1 cm. Se calculează diferența dintre valoarea extincției opalescenței soluției cu apă și cea corespunzătoare soluției de acid sulfosalicilic. Valoarea rezultată se folosește la determinarea proteinei brute cu ajutorul unei curbe de etalonare, care folosește valori obținute prin metoda micro-Kjeldahl.

(3) Metoda biuretelui – variantă (Drochioiu, 1986)

În vase Erlenmeyer de 50 ml se introduc câte 200 mg făină și se adaugă câte 10 ml soluție alcalin-alcoolică (18 g

KOH, 450 ml alcool etilic și apă până la 1000 ml). Se agită, apoi se închid baloanele cu dopuri de cauciuc și se lasă peste noapte în repaus. A doua zi, se adaugă cca. 100 mg fosfat de cupru sau carbonat bazic de cupru, de uz veterinar, în fiecare balon și se agită cu un agitator mecanic orizontal timp de o oră. După agitare, baloanele sunt lăsate în repaus 30 de minute, apoi se filtrează conținutul lor prin hârtie de filtru uscată. Extincția colorației biuretelui se citește la 540 nm, în cuve de sticlă de 0,5 cm. După efectuarea determinărilor, alcoolul etilic din filtrat se poate recupera prin distilare. Calculul rezultatelor se face cu ajutorul unei curbe de etalonare realizată cu valori ale unor probe reprezentative obținute cu metoda micro-Kjeldahl.

(4) Metoda cu acid percloric și ninhidrină (Drochioiu și Mihordea, 1987)

Se introduc în eprubete simple câte 2 ml reactiv de mineralizare.

*Reactivul de mineralizare* se obține prin dizolvarea a 100 mg selenit acid de sodiu în 0,5 ml apă, peste care se adaugă câțiva ml acid sulfuric concentrat și 5 ml acid percloric ( $d=1,67$ ), după care se completează la 100 ml cu acid sulfuric ( $d=1,84$ ).

Eprubetele se țin pe o baie de nisip la  $200 + 10^\circ C$ , aproximativ 10 minute, până ce conținutul lor devine incolor. Reactivul se amestecă cu materialul biologic cu o oră înaintea reacției pentru evitarea exploziilor. După mineralizare, se transferă conținutul eprubetelor în baloane cotate de 100 ml și se completează la semn cu apă. Din soluția astfel obținută, se iau câte 0,5 ml care se introduc în alte eprubete, peste care se adaugă câte 2 ml de reactiv cu ninhidrină.

*Reactivul cu ninhidrină* se prepară prin dizolvarea a 100 mg ninhidrină și 100 mg hidridantină în aproximativ 20 ml etilenglicol, la încălzire ușoară. Separat, se dizolvă la cald 27,2 g  $CH_3COONa \cdot 2H_2O$  în 25 ml apă și se adaugă în continuare 400 mg  $Cd(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$ , agitând până la

completa dizolvare. Se adaugă 5 ml acid acetic glacial și se completează la 50 ml cu apă. Într-un balon cotat de 100 ml se amestecă soluția cu ninhidrină cu 25 ml soluție de acid acetic-acetat și se completează la 100 ml cu etilenglicol.

Eprubetele se țin pe o baie de apă la fierbere timp de 30 minute. După răcire, se adaugă în fiecare eprubetă câte 5 ml etanol 40% (v/v). Intensitatea colorației soluțiilor se măsoară la 550 nm, în cuve de 0,5 cm, față de un martor realizat numai cu reactivi.

Curba de etalonare se întocmește cu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  în domeniul 0-10 mg N/ml, din care se iau în lucru câte 0,5 ml.

Rezultatele obținute se multiplică cu un factor de transformare caracteristic (ex. 5,83 pentru grâu, secară și 6,25 pentru porumb, fasole, bob) și se raportează la substanța uscată.

Pentru interpretarea rezultatelor s-a utilizat analiza varianței, în care valorile proteinei brute obținute prin metoda micro-Kjeldahl au fost cele de referință (martor).

## REZULTATE OBȚINUTE

În tabelul 1 sunt reproduse valorile proteinei brute din semințele unor plante cultivate, aparținând la 5 specii diferite.

Tabelul 1

### Valori medii ale proteinei brute (% S.U.) în semințele unor plante cultivate

Specia	Grâu		Secară		Porumb		Fasole		Bob	
	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S
Micro-Kjeldahl	14,57	MT	13,60	MT	10,17	MT	23,13	MT	32,60	MT
Turbidimetrică	14,71		13,38	oo	10,24		22,80	o	31,97	o
Biuretlui	15,05	***	13,45	oo	10,21		22,40	ooo	32,13	
cu ninhidrină	14,81	*	13,65		10,04	o	21,87	ooo	29,80	ooo
<b>DL 5%</b>	0,16		0,09		0,10		0,26		0,48	

M = media; S = semnificația diferențelor (\*\*\* /ooo = foarte semnificativ; \*\* /oo = distinct semnificativ; \* /o = semnificativ); MT = martor (metoda de referință); DL = diferență limită

Pentru grâu, conținutul în proteină brută ( $N \times 5,83$ ) a înregistrat diferențe nesemnificative față de martor (metoda micro-Kjeldahl) doar în cazul metodei turbidimetrice. Valorile obținute cu ajutorul metodei biuretlui și a celei cu ninhidrină au depășit, cu anumite grade de semnificație, martorul. Testul F a avut valoarea de 13,65, la DL 5% = 0,16.

La secară, metoda cu ninhidrină a dat o valoare medie a proteinei brute ( $N \times 5,83$ ) foarte apropiată de cea a martorului (diferență nesemnificativă), spre deosebire de metoda turbidimetrică și cea a biuretlui care au dat valori inferioare, distinct semnificative față de același martor. Testul F a înregistrat o valoare de 16,04, la DL 5% = 0,09.

Din determinările efectuate pe semințe de porumb s-au obținut medii

foarte apropiate ale conținutului proteic ( $N \times 6,25$ ) la metodele micro-Kjeldahl, turbidimetrică și la cea cu ninhidrină, diferențele dintre valori fiind nesemnificative. Metoda cu ninhidrină, a înregistrat un conținut al proteinei brute inferior și semnificativ diferit de al metodei de referință (micro-Kjeldahl). Aici, calculul matematic a înregistrat cea mai mică valoare a testului F (6,30), cu DL 5% = 0,10.

Analiza conținutului proteic al eșantioanelor de fasole ( $N \times 6,25$ ) arată diferențe semnificative între metoda de referință și celelalte trei metode utilizate. Deși, din punct de vedere al calculului statistic, diferența este semnificativă, valorile proteinei brute, determinate prin metodele micro-Kjeldahl și turbidimetrică,

au fost cele mai apropiate. Testul F a fost 37,06, la  $DL5\% = 0,26$ .

Pentru semințele de bob doar metoda biuretului a avut valori ale proteinei brute ( $N \times 6,25$ ) foarte apropiate de martor (diferență nesemnificativă). Ca și în cazul fasolei, conținutul în proteină brută al eșantioanelor de bob, determinat prin metoda turbidimetrică și metoda cu ninhidrină, a înregistrat valori inferioare celor obținute cu metoda de referință. Testul F a fost 60,15, la  $DL 5\% = 0,48$ .

După cum reiese din datele tabelului de mai sus, fiecare din cele trei micrometode testate a înregistrat, la cel puțin una din speciile analizate, un conținut proteic seminal foarte apropiat valoric de cel obținut prin metoda de referință (micro-Kjeldahl). Ținând cont de diferențele dintre metode, referitoare la: complexitate, productivitate, rapiditate, costul reactivilor, reproductibilitatea rezultatelor în aceleași condiții de lucru etc., este necesar să facem unele observații.

## CONCLUZII

1. Folosirea a patru micrometode de analiză, pentru determinarea conținutului proteic al unor semințe de întres alimentar, a evidențiat diferențe cu anumite grade de semnificație între valorile obținute.

2. Metoda turbidimetrică s-a dovedit pe cât de ieftină pe atât de simplă și productivă, putând înlocui metoda de referință (micro-Kjeldahl), cel puțin în determinările de serie efectuate pe semințe de grâu și porumb.

Metoda turbidimetrică s-a dovedit pe cât de ieftină pe atât de simplă și productivă, putând fi utilizată cel puțin în determinările de serie efectuate la grâu și porumb.

Metoda biuretului, deși puțin mai laborioasă, mai costisitoare și mai lentă decât cea turbidimetrică a fost utilă în cazul semințelor de porumb și de bob, când s-au înregistrat diferențe nesemnificative față de metoda micro-Kjeldahl. Metoda biuretului se poate folosi și pentru determinarea rapidă a triptofanului și lizinei prin adăugarea unor reactivi de culoare la soluția de biuret reziduală.

Metoda cu ninhidrină, bazată pe mineralizare rapidă cu selenit de sodiu și acid percloric, a fost foarte productivă, dar destul de costisitoare și greu de folosit la determinări de serie. S-a dovedit utilă la determinările pe secară, cu valori foarte apropiate de cele obținute cu metoda micro-Kjeldahl.

3. Metoda biuretului, puțin mai laborioasă, mai costisitoare și mai lentă decât cea turbidimetrică, a fost utilă în cazul semințelor de porumb și de bob, cu diferențe nesemnificative față de metoda de referință.

4. Deși destul de costisitoare și greu de folosit la determinări de serie, metoda cu ninhidrină a fost utilă în dozările de proteină brută pe semințe de secară, putând înlocui, în acest caz, metoda micro-Kjeldahl.

## BIBLIOGRAFIE

1. Drochioiu, G., 1986 - *Determinarea proteinelor din plante cu o variantă a metodei biuretului*. Lucr. șt. vol. omagial S.C.A. Suceava, București.
2. Drochioiu, G., Mihordea Didina., 1987 - *Metodă colorimetrică rapidă de determinare a proteinei brute*. Brevet rom. nr. 93183 din 23. 07. 1987.
3. Drochioiu, G., Cristea, M., Murariu Danela, Avramiuc, M., 1996 - *Contribuții la îmbunătățirea metodologiei de determinare a proteinelor din semințele speciilor de plante, supuse conservării în Banca de Gene Suceava*. Simp. I Nat. Res. Gen. Veg. Suceava, vol.I, 65-68.
4. Nimigean Mirela, Drochioiu, G., Avramiuc, M., Murariu Danela, 1996 - *Variabilitatea conținutului în metionină a unor probe de bob, conservate în Banca de Gene Suceava*. Simp. I Nat. Res. Gen. Veg. Suceava, vol.I, 71-73
5. Villegas, E., Mertz, E.T., 1975 - *Simple chemical and biological methods used at Purdue University to evaluate cereals for protein quality*. St. Bull., no 70, USA