

МОДИФИЦИРАН СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕН МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЕНИЕ НА ДОСТЪПЕН
МЕТИОНИН В МЕСО И МЕСНИ ПРОИЗВЕДЕНИЯ

Н. С. КТН. ИНЖ. ИВ. ЗАХАРИЕВ, СТ. Н. С. КТН. ИНЖ. ХР. ЮРУКОВ

НАУЧЕН ИНСТИТУТ ПО ГАСТРОЕНТЕРОЛОГИЯ И ХРАНЕНИ - МА, СОФИЯ, БЪЛГАРИЯ

Основен показател при оценяване качеството на белтъка е количественото съдържание на аминокиселините, и по-точно тяхната достъпност-състояние при което е възможно разорбирането им в храносмилателният тракт. В английската литература означено като "Availability of Amino Acids"

Достъпността на сърдържащата, термолабилна и често пъти лимитираща аминокиселина-метионин, служи като индикатор за прогнозиране биологичната стойност на белтъка (1,2,16).

В условията на промишлената преработка, при производството на храни (смилане, екстракция, повишенна влажност, температура и др.), известна част от метионина преминава в неусвоима форма-метионинсулфон, сулфоксилни и сулфонови производни, които организма не усвоява (7,13,15).

Съществуващите в литературата данни (табл.2) показват, че процентното намаление на достъпния метионин в определени случаи достига до 50-55 % в зависимост от вида на приложената технологична обработка (4,8,16,17).

Използваните методи за определяне достъпността на метионина са най-често според обстоятелствата: вид на изследвания субстрат, изисквания към възпроизводимостта на резултатите, достъпност на реактивите и техническа сложност на методите при рутинни анализи. От методично гледище могат да се разделят на: химични (1,4,6,16) микробиологични (9,10,11), ензимни (12,16) и биологични (1,14).

Един от най-използвани методи за определяне на достъпния метионин са химичните. Тази група методи, за разлика от останалите, дават добри резултати, но са недобри за рутинна работа поради продължителността си - 72 часа, и дефицита на използваните реактиви.

Интерес представлява химичният метод на Pieniazek и сътр. (16) с предварителна ензимна хидролиза. Методът може да бъде успешно приложен за рутинна работа след въвеждането на някои целесъобразни модификации, а именно:

1. Анализът се затруднява от наличието на мазнини, пигменти и свободни аминокиселини. Това налага тяхното отстраняване чрез познатите за целта методи (2,5).

2. Времетраснето на белтъчната хидролиза значително се съкраща чрез хомогенизиране и стриване на пробата с HCl с оглед по-бързо достижане до продукти с ниско молекулно тегло и разкриване на функционалните групи на белтъка.

3. По-високата температура се отразява по-благоприятно на взаимодействието между Na-nитропросид и $-S-CH_3$ - групите на метионина.

4. Използването на бистър филтрат на наситен разтвор на NaOH и 10% р-р на Na-nитропросид в амониев сулфат способствува за по-доброто стабилизиране на цветната реакция.

Реакцията за метионина е твърде специфична. При използване на настоящата хидролиза, тя е негативна за всички други аминокиселини, включително и окислените форми на метионина. Така, че получените резултати са абсолютни стойности за метиониновото

съдържание в белтъка.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

-Хомогенизиране на изходния материал

Около 6 g от изследвания материал се смила и хомогенизира за около 15 min в хомогенизатор при 6000 об/min (при необходимост се добавя дестилирана вода) до получаването на хомогенна каша.

-Обезмасливане на материала

Хомогенизираният материал се залива с 20 ml разтвор на n-бутанол/вода в съотношение 5:1(обемно). Разбръква се на бъркалка в продължение на 5 min и се ценетробутира при 6000 об/min за 10 min. Супернатантната течност се изхвърля и операциите се повтарят, докато надутаечната течност стане безцветна. Към получената утайка се прибавят 20 ml смес от етилов алкохол и етер 1:1(обемно). Последната манипулация се повтаря два пъти. Прави се промиване на утайката още веднаж с етер и се поставя в камина в продължение на около 60 min до пълно излитане на етера. Преди работа се определя влагата на така подгответия материал, за да се вземе под внимание при изчисленията.

-Пепсинова хидролиза

От изсушения материал 0,1 g се поставя в чашката на стъклен или тefлонов хомогенизатор. Добавя се 1,0 ml 0,1 n.HCl и се стрива в продължение на 3 min. След това към хомогената при внимателно разбръкване се внасят 40 mg пепсин(1:2,500). С помощта на 4 ml 0,1 n.HCl (прибавена на малки порции) хомогенатът се прехвърля в градуирана епруветка и с 0,1 n.HCl се довежда до обем 6 ml. Хомогенатът се инкубуира три часа при 45°C с разклащащо през 20 min. След изтичане на определеното време хомогенатът се охлажда до 20°C. Довежда се до pH-7(с 5% р-р на Na₂HPO₄) и се центрифишира 10 min при 5000 об/min.

- Определение на метионина

Отпепитирват се 1 ml от субстрата в епруветка и се прибавят 0,2 ml 14,3 n NaOH(57,2 g от NaOH в d. H₂O до 100ml), 0,2 ml от 1% воден р-р на глицин и 0,006 ml от 10% р-р на Na-нитропросид(Na-нитропросид + 0,4% воден р-р на амониев сулфат) и се разклаща след всяко накапване. Поставяме епруветката на водна баня при 40°C за 10 min, после се изстудява в ледена вода за 2 min и се прибавя 1 ml смес от HCl и H₃PO₄(9 части к. HCl + 1 част 85% H₃PO₄) със разклащащо при прибавяне на киселината. Разклащащето трае 1 min и след това се изстудява във вода със стайна температура за 15 min.

Отчита се срещу стандартен р-р(третиран по същия начин) при 520 nm.

Паралелно с работните преби се подготвя и стандартен разтвор, който съдържа определено количество метионин, пригответ по следния начин: 0,5 g -метионин се разтваря до 100 ml дестилирана вода, от тях два, четири и шест миллилита се довеждат до 50 ml в мерителна колба. В един ml от тези разтвори се съдържат съответно 0,0002 g, 0,0004 g, 0,0006 g метионин. Те се включват към серията работни преби, при изпълнение процедурите на цветната реакция.

Изчисленията за съдържанието на достъпния метионин в изследвания материал се извършват по формулата:

$$\% \text{ достъпен метионин} = \frac{(C_1 + C_2 + C_3) \cdot W \cdot E \cdot 100}{E_1 + E_2 + E_3 \cdot C_{\text{II}}}$$

където:

C₁ + C₂ + C₃ -сума от количеството на метионина в трите стандартни определения, изразени в грамове.

E₁ + E₂ + E₃ -сума от екстинциите на трите стандартни определения.

- W - степен на разреждане.
 E - екстинция на изследваната проба.
 C П - количество на взетата за анализ обезмаслена и изсушена проба в грамове.
 На таблица 1 са представени резултати от 10 паралелни определения, извършени по предлагания от нас метод и по химичния метод с ензимна хидролиза на Pianiazek (16).

Математическата обработка на резултатите от анализите е извършена по вариационния метод на Стюдънт-Фишер на ЕИМ. Анализът на резултатите показва, че между средните статистически стойности на паралелните определения на съпоставимите два метода няма достоверна разлика ($p < 0,05$). Доверителният интервал на стандартното отклонение който е мярка за възпроизводимостта на метода е по-тесен при предлагания от нас метод. Относителната случайна грешка (кофициента на вариация) е също по-малка.

Изложените данни ни дават основание да считаме, че предлагания модифициран спектрофотометричен метод може успешно да се приложи като рутинен за определяне на достъпен метионин, тъй като дава по-задоволителни резултати. От друга страна е свързан с извършването на по-малко манипулации, при което вероятността от грешки (от технически характер) намалява. И не на последно място цялостния анализ се извършва за по-кратко време. Внесените модификации дават възможност процедурата на ензимната хидролиза да бъде съкратена от 48 часа на 3 часа. Изложените предимства дават възможност предлагания модифициран спектрофотометричен метод да бъде използван както за научно изследователска работа, така и за текущия лабораторен контрол.

Възпроизводимост на резултатите

Таблица 1

Статистически показател	нов модифициран метод	метод на Pianiazek (16)
Брой на изследваните преби	10	10
Получени max и min стойности	2,14 - 1,98	2,17 - 1,84
Доверителен интервал на средната аритметична стойност на 99% случаите	$2,04 \pm 0,11$	$2,10 \pm 0,27$
Стандартно отклонение (абсолютна случайна грешка)	0,15	0,55
Доверителен интервал на стандартното отклонение (абсолютна случайна грешка)	0,11 - 0,09	0,5 - 0,24
Относителна (процентна) случайна грешка	6,1	31,6

Съдържание на достъпен метионин в различни видове храни след технологична обработка

Таблица 2

Продукт	Намаление съдържанието на достъпен метионин в %	Автор
Картофи	32	17
Концензирано мляко	11	16
Сухо мляко	22	16
Суроватка	14	16
Казеин	50	8
Рибено брашно	19	4
Месокостно брашно	53	4

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ангелова, Л., Д. Мирчева, М. Джарова, Д. Димитров - Методи за определяне достъпните аминокиселини, Обзор, 1980, С.
2. Чарлапанова, М., Ив. Захариев - Метод за количествено определяне на достъпен лизин в месо, месни и месо-растителни продукти. Изобр. и рационализация в медицината, MA, XVI, 1982, 1.
3. Bodwell C.E., J.S. Adkins, D.T. Hopkins - Protein Quality Humans, 1981 g, U.S.A
4. Carpenter K., A. Woodham - Br.J.Nutr., 32, 3, 1974, 647 - 660.
5. Cancon M. - Analit.Biochem., 66, 1975, 460 - 480.
6. Deveny T., J. Bati, B. Hallstrom, Ch. Tragardh, F. Kralovahzky, T. Matrai - Ausführung der Bestimmung von verfügbaren Lysin, 1974.
7. Ellinger G.M., R. Palmer - Proc.Nutr.Soc, 28, 1969, 42 A.
8. Erbersdobler H.-Protein Metabolism and Nutrition, EAAP, 16, Butterworth, London, Boston ton, 1976, 139-158.
9. Ford J.-Br.J.Nutrition, 1962, 16, 409-415.
10. Ford J.-Br.J.Nutrition, 1960, 14, 485 -490.
11. Gebel H.-Wyzszej Szkoly Rolniczej w Poznan, Katedra Technologii Rolney, 1971.
12. Kerese J, Jn: Jn vitro study of food and protein, Vth Intern.Symposium on Amino Acid, Febr. 21-26, Budapest, 1974.
13. Miller D.S, P. Samuel-Proc.Nutr.Soc, 1968, 27, 21A.
14. Meler H.-Untersuchungen tiber die Aminosäurenresorption aus verschiedenen Proteinträgern beim Schwein bei Ratten und beim Geflügel, Rostok, Univ.Diss, 1970.
15. Njaa L.R-Br.J.Nutr, 1962, 16, 571.

16. Pieniążek D, M. Rakowska, W. Szkiładziowa, Z. Grobarek-Br.J.Nutr, 1975, 34,
17. Rossbach F.-Zum Aminosäurenlieferungsvermögen von Kartoffeln für Mastschweine, Rostok, Univ.Diss, 1974.