

KVANTITATÍVNE STANOVENIE VOĽNÝCH A VIAZANÝCH AMINOKYSELÍN V OVOCNÝCH ŠŤAVÁCH

A. PRÍBELA, L. ŠORMAN, F. STRMISKA

Katedra chemickej technológie uhlohydrátov Slovenskej vysokej školy technickej v Bratislave

Celkový obsah dusíka v čerených šťavách sa pohybuje v rozmedzí 16 až 160 mg%, čo odpovedá 100—1000 mg% hrubého proteínu [1, 2]. Prevažný podiel tohto dusíka pripadá na aminokyseliny, ktoré sú v ovocných šťavách jednak voľné, jednak viazané. Podiel voľných aminokyselín je oveľa menší než viazaných aminokyselín.

Niektorí autori [3, 4] venujú pozornosť aminokyselinám ovocných štiav z nutričného hľadiska. Aminokyseliny hrajú úlohu pri neenzymatickom hnednutí ovocných štiav a najmä koncentrátov [5, 6]. Ďalej aminokyseliny stoja v popredí záujmu tých prác [7, 8], ktoré sa zaoberajú otázkami skvasovania štiav.

Pri analytických stanoveniach aminokyselín sa v starších prácach využívajú klasické metódy, založené na esterifikácii aminokyselín a ich destilácii [9]. V poslednom čase sa uplatňujú fyzikálno-chemické metódy, najmä elektroforéza a chromatografia. Jedným z hlavných problémov stanovenia voľných aminokyselín v ovocných šťavách je vysoká koncentrácia sprievodných látok, ktoré rušivo pôsobia pri ich oddeľovaní a identifikácii. Na celkovom extrakte ovocných štiav participujú voľné aminokyseliny iba 0,2—0,6 %. Táto skutočnosť je príčinou rôznorodých a často protichodných výsledkov, s ktorými sa stretávame v rozličných prácach. Okrem toho väčšina doterajších prác (okrem malých výnimiek) sleduje len kvalitatívne zastúpenie jednotlivých voľných aminokyselín v ovocných šťavách.

Problematika stanovenia viazaných aminokyselín je menej zložitá, pretože vlastnému stanoveniu predchádza ich izolácia, pri ktorej sa sprievodné látky z veľkej časti odstraňuje.

S prihliadnutím na uvedené ťažkosti zamerali sme sa v tejto práci predovšetkým na vypracovanie vhodného analytického postupu na stanovenie voľných aminokyselín a určili sme obsah obidvoch typov aminokyselín v niektorých ovocných šťavách.

Experimentálna časť

Metodika

Na izoláciu a koncentráciu voľných aminokyselín v ovocných šťavách sme použili vymieňače iónov, na ktorých sa aminokyseliny zachytili a po odstránení sprievodných látok uvoľnili amoniakom. Aminokyseliny sme rozdelili pomocou papierovej chromatografie a chromatogramy sme kvantitatívne vyhodnotili fotometricky. Pre prácu sme použili ovocné šťavy vyrobené v závode Fatra, n. p., výrobná Krupina v takom stave,

v akom sa dodávajú na spotrebiteľský trh. Aminokyseliny použité ako štandardy vyrobila firma Lachema. Chromatografický papier Schleicher-Schüll 2043 b bol impregnovaný siloxánom Dowex 1107.

Spomedzi väčšieho počtu vymieňačov iónov ako najvýhodnejší sa ukázal katex Zerolit 225. Ide o sulfónový polystyrén s vysokou kapacitou a výbornou chemickou a fyzikálnou stabilitou. Obsahuje jednu aktívnu skupinu $-\text{SO}_3\text{H}$. Je veľmi stály voči oxydačným a redukčným činidlám a horúcim alkáliám.

Po napučaní katexu sme ním naplnili sériu sklenených kolónok o priemere 12 mm. Výška katexového stĺpca bola 20 cm a množstvo katexu 10 g. Pre prácu sme použili štandardné roztoky pripravené z čistých aminokyselín. Obsah aminokyselín v uvedených roztokoch sme stanovili titračne podľa S. P. L. Sørensenä [10].

Ako vlastný experimentálny materiál sme upotrebili ovocné šťavy, ktoré sme najprv prefiltrovali cez azbest. Zo vzorky sme odpipetovali 100 ml šťavy a nechali pretekať cez kolónku s katexom rýchlosťou 50 ml za hodinu. Stĺpec sme potom premyli destilovanou vodou.

Elúciu aminokyselín sme uskutočnili 100 ml amoniak zriedeného destilovanou vodou v pomere 1:1. Eluát sme zachytili do porcelánovej misky a na vodnom kúpeli zahustili do sirupovitej konzistencie. Po trojnásobnom zriedení vzorky destilovanou vodou a opätovnom odparení sme eluát definitívne zahustili na objem 5 ml.

V štave zbavenej voľných aminokyselín sme bielkoviny vyzrážali 96 % alkoholom v pomere 1:6. Zrazeninu sme 24 hodín hydrolyzovali stonásobným množstvom 5 N-HCl. Nadbytok HCl sme potom odparili na vodnom kúpeli. Odparok sme rozpustili v 5 ml destilovanej vody a roztok sme prefiltrovali. Takto pripravené vzorky voľných a viazaných aminokyselín sme nanášali na chromatografický papier. Chromatogramy sme vyvíjali zostupne zmesou butanol—kyselina octová—voda 4:1:5. Po trojnásobnom až päťnásobnom vyvíjaní sme dosiahli dostatočné rozdelenie aminokyselín.

Chromatogramy sme vyvolali ninhydrínom a vysušili pri 60 °C. V prechádzajúcom svetle vyfotografované chromatogramy sme kvantitatívne vyhodnotili registračným fotometrom podľa Kohla. Plochy pod krivkami sa zmerali planimetrom a z kalibračných kriviek sme odčítali množstvá jednotlivých aminokyselín vo vzorkách.

Výsledky a diskusia

Stanovenie v modelových roztokoch

V prvej časti experimentálnej práce sme študovali kvantitatívne pomery pri zachytávaní a elúcii aminokyselín na katexe Zerolit 225. Výsledky sú zhrnuté v tab. 1 a 2.

Z tab. 1 vidieť, že počas dvojhodinového pretekania modelového roztoku jednotlivých aminokyselín nedochádza vo všetkých prípadoch k ich úplnému viazaniu na použitý katex. Úplne sa viaže glycín, prolín, tryptofán a leucín, pomerne dobre valín a alanín. Menej uspokojivé výsledky sme v tomto smere dosiahli pri asparagíne, kde sa nezachytilo 20,5 %, ďalej pri kyseline asparágovej, kde sme zistili straty 14,5 %.

Z výsledkov uvedených v tab. 2 vyplýva, že elúciou zriedeným amoniakom sa najľahšie vytláča kyselina asparágová a asparagín, najťažšie tryptofán, valín a leucín.

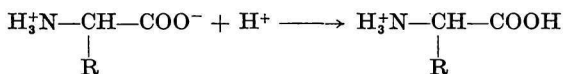
Tabuľka 1
Zachytávanie aminokyselín na katexe Zerolit 225

Poradové číslo	Aminokyselina	Použité množstvo (mg)	Zachytené	
			mg	%
1	arginín	10,0	8,90	89,0
2	asparagín	10,0	7,95	79,5
3	kyselina asparágová	10,0	8,55	85,5
4	glycín	10,0	10,00	100,0
5	alanín	10,0	9,50	95,0
6	kyselina glutamová	10,0	8,80	88,0
7	glutamín	10,0	8,88	88,8
8	prolín	10,0	10,00	100,0
9	tryptofán	10,0	10,00	100,0
10	valín	10,0	9,85	98,5
11	leucín	10,0	10,00	100,0
12	cystín	10,0	9,30	93,0

Tabuľka 2
Vytlačanie aminokyselín z katexu Zerolit 225 amoniakom

Poradové číslo	Aminokyselina	Použité množstvo (mg)	Vytlačené	
			mg	%
1	arginín	20,0	18,2	91,0
2	asparagín	20,0	20,0	100,0
3	kyselina asparágová	20,0	20,0	100,0
4	glycín	20,0	17,0	85,0
5	alanín	20,0	18,1	90,5
6	kyselina glutamová	20,0	17,6	88,0
7	glutamín	20,0	17,5	87,5
8	prolín	20,0	18,6	93,0
9	tryptofán	20,0	15,8	79,0
10	valín	20,0	16,4	82,0
11	leucín	20,0	16,1	80,5
12	cystín	20,0	18,6	93,0

Rozdielna afinita jednotlivých aminokyselín k silne kyslému katexu sa vysvetľuje rozdielnou disociačnou konštantou karboxylových skupín (K') aminokyselín, resp. rozdielnymi hodnotami pK'_i . Aminokyseliny, ktoré vniknú difúziou v roztoku na povrch zrníčka silne kyslého katexu alebo do jeho vnútra, strácajú v silne kyslom prostredí svoj záporný náboj a chovajú sa ako katióny:



Ku katexu sú potom pútané tým väčšou silou, čím alkalickéjšie majú charakter, čiže čím menšie sú hodnoty disociačných konštant karboxylových skupín (K'),

resp. čím väčšie sú číselné hodnoty ich pK_1' . Spomedzi skúmaných aminokyselín najvyššie hodnoty pK_1' má tryptofán (2,38), leucín (2,36) a valín (2,34). Naopak najnižšie hodnoty pK_1' má kyselina asparágová (1,88) a asparagín (2,02). Ako vidieť z tab. 1, prvá skupina aminokyselín sa zachytáva na katexe najlepšie, druhá najhoršie. Značnú odchýlku od tohto teoretického zdôvodnenia vykazuje prolín. Niektorí autori [12] ju vysvetľujú van der Waalsovými silami, ktoré sa obzvlášť silne uplatňujú medzi jadrom aromatickej aminokyseliny (prolín) a benzénovými jadrami katexu (sulfónovaný polystyrén). Tieto sily spôsobujú oveľa väčší stupeň pútania aromatickej aminokyseliny ku katexu, než by to zodpovedalo jej disociačnej konštante. Vplyv van der Waalsových síl možno relatívne k vplyvu disociačných konštánt potlačiť prácou pri zvýšenej teplote. Okrem uvedenej nepravidelnosti v chovaní prolínu dosiahnuté výsledky dobre súhlasia s teóriou o väčšej afinitě bázičnejších aminokyselín ku kyslému katexu.

Stanovenie v ovocných šťavách

Opísanou metodikou sme v ďalšom študovali obsah voľných a viazaných aminokyselín v rozličných druhoch ovocných štiav. Výsledky stanovení sme zostavili do tab. 3. Na rozdiel od údajov zahraničných autorov [11] sme zistili podstatne väčší počet prítomných aminokyselín, ako aj ich množstiev. Táto skutočnosť je zrejme dôsledkom zlepšeného pracovného postupu, ktorý podstatne znižuje straty jednotlivých aminokyselín pri ich stanovení. Nepochybne sa tu tiež pozitívne uplatnilo skoncentrovanie analyzovaných aminokyselín.

V skúmaných šťavách pochádzajúcich z jadrového a kôstkového ovocia dominujúcou aminokyselinou je asparagín. Pozoruhodný je aj obsah alanínu v jablčnej šťave, kyseliny asparágovej v čerešňovej šťave a prolínu vo višňovej šťave. V šťavách z bobuľového ovocia je najbohatšie zastúpený alanín. Tab. 3 sme sa pokúsili zostaviť tak, aby bolo približne zachované poradie najbohatšie sa vyskytujúcich aminokyselín.

Iste nie je bez zaujímavosti, že pomer medzi voľnými a viazanými aminokyselinami je v skúmaných šťavách približne 1:10. Z analyzovaných druhov ovocných štiav najväčší obsah voľných aminokyselín vykazujú hybridy, ďalej višne a citrusová šťava.

Pokiaľ ide o stanovisko tých autorov, ktorí sa usilujú hodnotiť obsah aminokyselín v ovocných šťavách z nutričného hľadiska, sme toho názoru, že tieto potravinárske produkty sú napriek pestrému zastúpeniu jednotlivých aminokyselín ako zdroja dusíka prakticky bezvýznamné. Možno poznamenať, že napríklad 2 dcl višňovej šťavy, ktorá je podľa našich zistení relatívne bohatá na aminokyseliny, prispievajú k celodennej potrebe bielkovín, prípadne aminokyselín asi 1,8 % a rovnaké množstvo jablčnej šťavy len 0,5 %. Z hľadiska

Tabuľka 3
Obsah voľných a viazaných aminokyselín v skúmaných ovocných šťavách

Číslo	Aminokyselina	Jablčná štava mg %			Čerešňová štava mg %			Višňová štava mg %			Ríbezľová štava mg %			Černí- cová štava mg %	Hybri- dová štava mg %	Citru- sová štava mg %
		voľ.	viaz.	celk.	voľ.	viaz.	celk.	voľ.	viaz.	celk.	voľ.	viaz.	celk.	voľ.	voľ.	voľ.
1	asparagín	8,1	96,2	104,3	20,0	194,2	214,2	44,0	340,0	384,0	4,4	34,7	39,1	1,7	—	8,2
2	alanín	1,9	48,6	50,5	1,9	30,5	32,4	2,7	27,8	30,5	6,5	68,0	74,5	5,8	56,0	0,7
3	prolín	3,4	6,9	10,3	5,8	34,7	40,5	12,2	175,0	187,2	3,3	16,6	19,9	1,1	8,2	22,3
4	kyselina asparágová	1,2	41,6	42,8	3,2	116,5	119,7	9,7	87,5	97,2	2,0	41,6	43,6	3,9	9,3	8,8
5	tyrozín	0,7	6,9	7,6	3,3	20,8	24,1	6,5	48,0	54,5	5,8	48,6	54,4	stopy	16,3	2,7
6	kyselina glutamová	1,1	12,5	13,6	3,3	41,6	44,9	7,2	76,2	83,4	2,4	41,6	44,0	1,2	10,0	1,4
7	treonín	3,3	—	3,3	0,8	—	0,8	2,2	—	2,2	1,7	—	1,7	0,6	3,6	0,2
8	glycín	0,3	—	0,3	1,9	—	1,9	1,9	—	1,9	—	—	—	5,5	3,1	0,9
9	valín	0,1	2,1	2,2	—	stopy	—	0,4	1,4	1,8	0,3	4,8	5,1	1,2	6,3	0,3
10	lyzín	0,1	1,4	1,5	0,3	5,5	5,8	0,6	6,9	7,5	0,1	2,1	2,2	0,9	0,3	5,9
11	leucín	stopy	—	—	—	—	—	0,7	1,4	2,1	0,3	2,8	3,1	stopy	12,7	0,8
12	serín	—	—	—	—	—	—	1,8	—	1,8	1,0	—	1,0	1,1	3,0	0,9
13	cysteín	—	—	—	—	—	—	0,5	4,8	5,3	—	3,5	3,5	—	0,2	—
14	histidín	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,5	5,6	6,1	—	2,0	—
15	glutamín	stopy	—	—	—	2,8	2,8	—	34,6	34,6	—	4,8	4,8	stopy	8,2	—
16	arginín	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,3	9,0	1,6
17	taurín	—	—	—	—	—	—	—	48,3	48,3	—	—	—	—	—	—
18	kyselina γ -aminomaslová	—	—	—	stopy	stopy	—	stopy	stopy	—	stopy	—	—	stopy	stopy	stopy
Celkový obsah		20,2	216,2	236,4	40,5	446,6	487,1	90,4	851,9	942,3	28,3	274,7	302,0	26,3	148,2	54,7
Pomer voľných/viaza- ných aminokyselín		1 : 10,7			1 : 10,9			1 : 9,5			1 : 9,7					

úhrady nevyhnutných aminokyselín je situácia v prípade skúmaných ovocných štiav ešte menej priaznivá.

Voľné aminokyseliny majú podľa názoru mnohých autorov určitú úlohu pri technológii výroby a spracovania ovocných štiav. Často sa zdôrazňuje ich úloha najmä pri neenzymatickom hnednutí samotných štiav, ako aj z nich vyrobených koncentrátov, ďalej pri skvasovaní štiav a pod. Treba však poznamenať, že úloha jednotlivých aminokyselín je doteraz málo objasnená, keďže sám obsah jednotlivých aminokyselín je zatiaľ v štádiu začiatočného výskumu.

Súhrn

Opísali sme metodiku kvantitatívneho stanovenia voľných a viazaných aminokyselín v ovocných šťavách. Zistili sme straty, ku ktorým dochádza pri izolácii aminokyselín na katexe Zerolit 225. Uvedeným postupom sme stanovili obsah voľných a viazaných aminokyselín v niektorých druhoch konzumných ovocných štiav.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ И ВЯЗАННЫХ АМИНОКИСЛОТ В ФРУКТОВЫХ СОКАХ

A. ПРИБЕЛА, Л. ШОРМАН, Ф. СТРИСКА

Кафедра химической технологии углеводов Словацкой высшей технической школы в Bratislave

Выводы

Мы описали методику количественного определения свободных и связанных аминокислот в фруктовых соках. Определили также и потери, которые получаются при изоляции аминокислот на катионообменнике Зеролит 225. Описанным способом мы определили содержание свободных и связанных аминокислот в некоторых сортах потребляемых фруктовых соков.

Поступило в редакцию 10. 9. 1960 г.

QUANTITATIVE BESTIMMUNG FREIER UND GEBUNDENER AMINOSÄUREN IN OBSTSAFTEN

A. PRÍBELA, L. ŠORMAN, F. STRMISKA

Lehrstuhl für chemische Technologie der Kohlenhydrate an der Slowakischen Technischen Hochschule in Bratislava

Zusammenfassung

Die Autoren beschreiben eine Methodik der quantitativen Bestimmung freier und gebundener Aminosäuren in Obstsaften. Es wurden die Verluste festgestellt, welche bei

der Isolierung der Aminosäuren auf dem Katex Zerolit 225 entstehen. Mit Hilfe des angeführten Verfahrens bestimmten die Autoren den Gehalt an freien und gebundenen Aminosäuren in einigen Sorten von Konsumobstsäften.

In die Redaktion eingelangt den 10. 9. 1960

LITERATÚRA

1. Mehlitz A., *Süssmost*, Braunschweig 1940. — 2. Lerailliez P., *La conservation industrielle des fruits*, Paris 1952. — 3. Rockland L. B., *Food Res.* 24, 160 (1959). — 4. Täufel K., Iwainisky H., *Biochem. Z.* 323, 299 (1952). — 5. Büchi W., Symposium Fruchtsaft-Konzentrate, Bristol 1958, 125—144. — 6. Hodge J. E., *Agr. Food Chem.* 1, 928 (1953). — 7. Burroughs L. F., *J. Sci. Food Agr.* 8, 122 (1957). — 8. Elbert M. E., Esselen B. W., *Food Res.* 24, 352 (1959). — 9. Waldschmidt-Leitz E., *Chemie der Eiweisskörper*, Stuttgart 1950. — 10. Cerevitinov F. V., *Chemické složení a fyzikální vlastnosti ovoce a zeleniny*, Praha 1952. — 11. Pollard A., *Flüssiges Obst* 26, X/17 (1959). — 12. Davies C. W., *Biochem. J.* 45, 38 (1949).

Do redakcie došlo 10. 9. 1960

Adresa autorov:

Inž. Alexander Pribela, inž. Ladislav Šorman, RNDr. František Strmiska, C. Sc., Bratislava, Kollárovo nám. 2, Chemický pavilón SVŠT.