

✓ Zloženie aminokyselín v sušenej lucerne siatej

M. BAČOVÁ, J. ZELINKA

Oddelenie biochémie mikroorganizmov Biologického ústavu Slovenskej akadémie vied, Boleráz

Za použitia automatického analyzátora sa stanovili aminokyseliny v hydrolyzovaných vzorkách lucernej siatej. Najvyššie hodnoty pri stanovení cystínu a metionínu sa získali oxidáciou vzorky kyselinou peroxymravčou pred jej hydrolyzou a najvyššie hodnoty pri stanovení tyrozínu po hydrolyze kyselinou jodovodíkovou. Zloženie aminokyselín lucernej siatej závisí od podmienok vegetácie.

Rozvoj krmovinárskeho priemyslu na vedeckom základe nie je mysliteľný bez znalosti obsahu aminokyselín v bielkovinách používaných v krmných zmesiach. Na stanovenie podkladov pre optimálne zloženie bielkovinovej časti krmných koncentrátov dnes už nestačí znalosť obsahu bielkovín ($N \times 6,25$), ani tzv. „stráviteľných bielkovín“, ale je nevyhnutné poznať exaktné zloženie aminokyselín tej-ktorej bielkovinovej zložky. Len za takýchto podmienok je možné vedecky pripraviť efektívne krmné zmesi, prípadne ich správne dopĺňať niektorými esenciálnymi aminokyselinami.

Preto sme začali so systematickým rozborom obsahu aminokyselín niektorých bielkovinových komponentov krmných zmesí mikrobiálneho, rastlinného i živočíšneho pôvodu. Keďže ide o práce metodicky veľmi náročné, nachádzame týchto údajov v literatúre pomerne málo. Ucelenú prácu o zložení aminokyselín v bielkovinách uverejnili R. J. Block a K. W. Weiss [1]. A. E. Harper a H. J. H. De Muelenaere [2] sa zapodievali nutričnou hodnotou bielkovín obilnín z hľadiska využiteľnosti aminokyselín. Väčšina údajov o zložení aminokyselín v bielkovinách je však založená na starších, značne nepresných metodikách.

Materiál a metódy

Na analýzy sa použili dve vzorky umele sušenej lucernej siatej zo Štátneho majetku v Bajči. Vzorka 1 je lucerna z tretej kosby (28. 8. 1963), vzorka 2 je lucerna zo štvrtej kosby (15. 10. 1963). Vzorky sa pred hydrolyzou 6 hodín extrahovali éterom v Soxhletovom prístroji, aby sa odstránili tuky a pigmenty. Celkový dusík sa stanovil Kjeldahlovou metódou a sušina vysušením do konštantnej váhy pri 105 °C.

Po extrakcii sa vzorky hydrolyzovali predestilovanou 6 N kyselinou soľnou p. a., a to jednak na vodnom kúpeli so spätným chladičom po dobu 40 hodín, jednak v zatavenej čiastočne evakuovanej ampulke v množstve 0,1 g preparátu po dobu 20 hodín v laboratórnej sušiarňi pri 110 °C. Okrem toho sa vzorky hydrolyzovali zmesou 6 N kyseliny soľnej a 6 N kyseliny mravčej v pomere 1 : 1 v zatavenej ampulke za tých istých podmienok za účelom stanovenia cystínu [3]. Pri stanovení metionínu sa podobne v zatavenej ampulke

vzorky hydrolyzovali za použitia 80 násobného nadbytku kyseliny jodovodíkovej [4]. V ďalších pokusoch sa pri stanovení cystínu a metionínu vzorky pred hydrolyzou oxidovali kyselinou peroxymravčou podľa S. Moora [5], ktoré sa podľa tejto metodiky po hydrolyze 6 N kyselinou solnou vhodnejšie stanovujú vo forme kyseliny cysteovej a metionínsulfónu.

Získaný hydrolyzáť sa odparil na vodnom kúpeli do sucha, odparovanie sa opakovalo po pridaní destilovanej vody trikrát a odparok sa cez noc nechal stáť v exsíkátore nad hydroxidom draselným, aby sa zneutralizovali zvyšky kyseliny. Potom sa hydrolyzáť kvantitatívne preliat do 10 ml odmernej banky a doplnil sa destilovanou vodou po značku. Vlastné stanovenie aminokyselín sa robilo podľa D. H. Spackmana, E. H. Steina a S. Moora [6] na automatickom analyzátoe aminokyselín skonštruovanom vo Vývojových dielňach ČSAV v Prahe. 2 ml vzorky z 10 ml odmernej banky sa riedili 1 : 1 a 1 : 2 tlmivým roztokom o pH 2,2 a z takto pripraveného roztoku sa na kolónu nanášali 2 ml.

Pri použití nového ninhydrínového činidla sa kolóny naplnené Amberlitom IR-120 vždy znovu kalibrovali. Aby sa zabezpečila dostatočná presnosť váženia, štandardná zmes aminokyselín sa pripravila nasledujúcim spôsobom: Spoločne sa navázilo 1250 $\mu\text{mólov}$ z každej aminokyseliny (Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio) do 500 ml odmernej banky s prídavkom 5 ml predestilovanej koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej p. a. za účelom ich lepšieho rozpustenia. Z cystínu sa navázilo len 625 $\mu\text{mólov}$. Tento roztok, ktorý obsahoval v každom ml 2,5 $\mu\text{mólov}$ každej aminokyseliny, slúžil ako základný kalibračný roztok a prechovával sa v chladničke. Pred každým nanášaním na kolóny sa základný roztok zriedil v pomere 1 : 4 tlmivým roztokom o pH 2,2. Z takto pripraveného roztoku sa na kolóny nanášali 2 ml, čo je 1 $\mu\text{mól}$ každej aminokyseliny (v prípade cystínu 0,5 $\mu\text{mólu}$). Každá kalibrácia sa robila najmenej štyrikrát. Po dosiahnutí dostatočne zhodných výsledkov (prípustná chyba analýzy je $\pm 3\%$ pri stanovení v rozsahu 0,1–3 $\mu\text{mólov}$ každej aminokyseliny; ich priemerné hodnoty sa používajú ako

Tabuľka 1

Analýza lucerny siatej z tretej kosby, hydrolyzovanej na vodnom kúpeli po dobu 40 hodín

(Hodnoty aminokyselín sa udávajú v percentách na sušinu vzorky)

Aminokyselina	Analýza 1. hydrolyzy	Analýza 2. hydrolyzy	Priemer
Lys	0,60	0,54	0,56
His	0,28	0,24	0,26
Arg	0,43	0,38	0,40
Asp	1,80	1,93	1,86
Thr	0,30	0,33	0,31
Ser	0,42	0,46	0,44
Glu	1,03	1,09	1,07
Pro	0,39	0,44	0,41
Gly	0,68	0,70	0,69
Ala	0,61	0,66	0,64
Val		0,25	0,25
Met		0,09	0,09
Ileu	0,29	0,32	0,30
Leu	0,54	0,56	0,55
Tyr	0,32	0,34	0,33
Phe	0,35	0,37	0,36

konštanty pri výpočte stanovenia analyzovaných vzoriek) sa nanášali hydrolyzáty vlastných vzoriek bielkovín. Analytické údaje sa získali vo forme vrcholov záznamu na semilogaritmickom papieri, ktoré prislúchajú jednotlivým aminokyselinám. Hodnoty plôch, ktoré zodpovedajú príslušnej aminokyseline, vypočítali sa násobením výšky vrcholu šírkou v polovičnej výške [6]. Z vrcholov štandardnej krivky sa počítajú konštanty, ktorými sa delia hodnoty získané zo záznamu analyzovanej vzorky. Takýmto výpočtom sa získa množstvo aminokyselín v $\mu\text{móloch}$ pre daný návažok, z čoho sa ďalej vypočíta percento jednotlivých aminokyselín na sušinu vzorky.

Tabuľky vo väčšine prípadov udávajú výsledky analýz dvoch rozličných hydrolyzátovej istej vzorky za tých istých podmienok, pritom Cys je prepočítaný ako 1/2 cystín.

Výsledky a diskusia

Z porovnania tab. 1 a 2 je zrejmé, že hydrolyza na vodnom kúpeli so spätným chladičom nie je dostatočná, pričom sa získajú podstatne nižšie hodnoty aminokyselín než po hydrolyze v čiastočne evakuovanej zatavenej ampulke za kratšiu dobu. Porovnaním tab. 2 a 3 môžeme konštatovať, že lucerna siatej

Tabuľka 2

Analýza lucernej siatej z tretej kosby, hydrolyzovanej v zatavenej ampulke po dobu 24 hodín

(Hodnoty aminokyselín sa udávajú v percentách na sušinu vzorky.
Sušina 92,5 %, N celkový 3,26 %)

Aminokyselina	Spôsob hydrolyzy							Maximálne hodnoty stanovení	
	6 N-HCl				HI	6 N-HCl + 6 N-HCOOH			
	Analýza 1. hydrolyzy	Analýza 2. hydrolyzy	Priemer	Hydrolyza po oxidácii		Analýza 1. hydrolyzy	Analýza 2. hydrolyzy		Priemer
Lys	1,57	1,63	1,60						1,60
His	0,67	0,72	0,69						0,69
Arg	1,25	1,30	1,27						1,27
Asp	2,52	2,60	2,56		2,10	2,19	2,19	2,19	2,56
Thr	0,98	1,03	1,00		0,86	0,70	0,78	0,74	1,00
Ser	0,93	1,05	0,99		0,77	0,84	0,95	0,89	0,99
Glu	2,08	2,24	2,16		1,82	1,78	1,90	1,84	2,16
Pro	1,01	1,06	1,04		1,04	0,91	0,96	0,93	1,04
Gly	1,08	1,14	1,11		0,97	1,00	0,98	0,99	1,11
Ala	1,15	1,22	1,18		1,09	1,15	1,16	1,15	1,18
Cys		0,14	0,14	0,39					0,39
Val	1,03	1,20	1,11				0,94	0,94	1,11
Met		0,06	0,06	0,50	0,07	0,16	0,12	0,14	0,50
Ileu	0,97	1,05	1,01		0,89	0,69	0,71	0,70	1,01
Leu	1,51	1,66	1,58		1,43	1,32	1,42	1,37	1,58
Tyr	0,58	0,63	0,60		1,07	0,53	0,64	0,58	1,07
Phe	1,12	1,20	1,16		1,12	0,73	0,81	0,77	1,16

Tabuľka 3

Analýza lucernej sietej zo štvrtej kosby, hydrolyzovanej v zatavenej ampulke po dobu 20 hodín

(Hodnoty aminokyselín sa udávajú v percentách na sušinu vzorky.
Sušina 94,22 %, N celkový 2,81 %)

Aminokyselina	Spôsob hydrolyzy								Maximálne hodnoty stanovení
	6 N-HCl				HI	6 N-HCl + 6 N-HCOOH			
	Analýza 1. hydrolyzy	Analýza 2. hydrolyzy	Priemer	Hydrolyza po oxidácii		Analýza 1. hydrolyzy	Analýza 2. hydrolyzy	Priemer	
Lys	1,08	1,10	1,09						1,09
His	0,45	0,45	0,45						0,45
Arg	0,82	0,85	0,83						0,83
Asp	1,81	1,82	1,82		1,53	1,50	1,51	1,50	1,82
Thr	0,68	0,72	0,70		0,58	0,50	0,49	0,49	0,70
Ser	0,74	0,74	0,74		0,58	0,56	0,58	0,57	0,74
Glu	1,49	1,50	1,49		1,31	1,24	1,22	1,23	1,49
Pro	0,76	0,74	0,75		0,76	0,62	0,65	0,63	0,75
Gly	0,81	0,82	0,81		0,73	0,65	0,63	0,64	0,81
Ala	0,78	0,85	0,81		0,73	0,68	0,66	0,67	0,81
Cys	0,06	0,09		0,21		0,06	0,06	0,06	0,21
Val	0,77	0,77	0,77		0,71	0,63	0,62	0,62	0,77
Met				0,25	0,05	0,045	0,049	0,047	0,25
Ileu	0,62	0,61	0,61		0,59	0,45	0,46	0,46	0,61
Leu	1,11	1,04	1,07		0,94	0,81	0,80	0,81	1,07
Tyr	0,39	0,38	0,38		0,46	0,40	0,37	0,38	0,46
Phe	0,67	0,66	0,66		0,65	0,45	0,47	0,46	0,66

z tretej kosby má vyšší obsah všetkých aminokyselín než lucerna zo štvrtej kosby, čomu zodpovedá i vyšší obsah celkového dusíka. S ohľadom na rovnakú fenologickú fázu lucernej z tretej a štvrtej kosby nie je možné vysvetliť vyšší obsah aminokyselín vplyvom rozličných fenologických fáz. Počas rastu lucernej medzi druhou a tretou kosbou boli celkové zrážky 26 mm, zatiaľ čo v priebehu rastu medzi tretou a štvrtou kosbou boli celkové zrážky 244 mm. Podľa toho by značný vplyv na obsah aminokyselín v lucernej sietej mali celkové zrážky vo vegetačnom období.

Z tab. 2 a 3 je ďalej zrejmé, že najvyššie hodnoty pri stanovení cystínu a metionínu sa získajú po oxidácii vzorky kyselinou peroxymravčou pred jej hydrolyzou a najvyššie hodnoty pri stanovení tyrozínu po hydrolyze kyselinou jodovodíkovou.

СОСТАВ АМИНОКИСЛОТ В СУШЕНОЙ КУЛЬТУРНОЙ ЛЮЦЕРНЕ

М. Бачова, Я. Зелинка

Отдел биохимии микроорганизмов Биологического института Словацкой академии наук,
Болераз

С помощью автоматического анализатора изучался состав аминокислот культурной люцерны после гидролиза образцов, проведенного различными способами. При определении серных аминокислот получились высшие результаты, если образцы предварительно окислялись перекисью муравьиной кислоты перед собственным гидролизом, в сравнении с гидролизом смесью HCl и HCOOH или иодистоводородной кислотой. При определении тирозина, из испытанных методов гидролиза, самые лучшие результаты получились гидролизом иодистоводородной кислотой. Гидролиз с HCl в течение 40 часов под обратным холодильником дал гораздо низшие результаты, чем гидролиз в течение одних суток в запаянных частично эвакуированных ампулах.

В таблицах приведен состав аминокислот люцерны, который в значительной мере зависит от условий вегетации.

Preložil M. Fedoroňko

ZUSAMMENSETZUNG DER AMINOSÄUREN IN GETROCKNETER SAATLUZERNE

M. Bačová, J. Zelinka

Abteilung Biochemie der Mikroorganismen des Biologischen Instituts
der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, Boleráz

Mit Hilfe eines automatischen Analysators wurde die Zusammensetzung der Aminosäuren der Saatluzerne bei Anwendung verschiedener Methoden der Hydrolyse der Proben untersucht. Bei der Bestimmung der schwefelhaltigen Aminosäuren wurden dann höhere Ergebnisse erhalten, wenn die Probe vor der eigentlichen Hydrolyse zunächst mit Perameisensäure oxidiert wurde, im Vergleich mit einer Hydrolyse durch ein Gemisch von Chlorwasserstoffsäure und Ameisensäure, oder durch Jodwasserstoffsäure. Bei der Bestimmung des Tyrosins gab unter den durchgeprüften Hydrolysenmethoden die Hydrolyse durch Jodwasserstoffsäure die besten Resultate. Die Hydrolyse durch Chlorwasserstoffsäure gab nach 40 Std. unterm Rückflußkühler weitaus niedrigere Ergebnisse als eine 24stündige Hydrolyse in zugeschmolzenen, teilweise evakuierten Ampullen.

In Tabellen wird die Zusammensetzung der Aminosäuren der Luzerne angeführt, die sich durch den Einfluß von Vegetationsbedingungen sehr unterscheidet.

Preložil K. Ullrich

LITERATÚRA

1. Block R. J., Weiss K. W., *Amino Acid Handbook*. C. Thomas, Publisher, Springfield, Illinois 1956.
2. Harper A. E., De Muelenaere H. J. H., *Symposium No VIII, Vth International Congress of Biochemistry*, Moscow 1961.

3. Block R. J., *Anal. Chem.* **22**, 1327 (1946); cit. [7].
4. Brandt E., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **47**, 186 (1946); cit. [7].
5. Moore S., *J. Biol. Chem.* **238**, 235 (1963).
6. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S., *Anal. Chem.* **30**, 1190 (1958).
7. Hais I. M., Macek K. a spolupracovníci, *Papírová chromatografie*, 482. Nakladatelství ČSAV, Praha 1959.

Do redakcie došlo 6. 7. 1965

V revidovanej podobe 30. 4. 1966

Adresa autorov:

Prom. chem. Mária Bačová, doc. inž. Ján Zelinka, CSc., Biologický ústav SAV, Boleráz.