

Andrzej SZEWCZUK, Janusz WIERCIŃSKI,
Elżbieta KRUPA

Oznaczanie metioniny konstytucyjnej oraz metioniny — dodatku w paszach pochodzenia roślinnego

Обозначение конституционного метионина и добавочного метиона в кормах
(кормовая смесь) растительного происхождения

Determination of Constitutional Methionine and Methionine — Addition in Feeds
of Vegetal Origin

Metionina jest jednym z tych aminokwasów, które nie są syntetyzowane przez organizmy zwierząt gospodarskich, a muszą być dostarczane w pokarmach. W warunkach intensywnej hodowli pasze powinny być źródłem dostatecznej ilości metioniny, zapewniającej wraz z innymi czynnikami optymalny rozwój i produktywność zwierząt.

Stosowane obecnie metody oznaczania metioniny w paszach (2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16) są mało precyzyjne oraz zbyt skomplikowane i pracochłonne. Wynika to z trudności związanych z uwalnianiem metioniny w procesie hydrolizy składników białkowych lub wypłukiwania z paszy. W momentach tych dochodzi do jej strat albo pojawiania się, przeszkadzających w przebiegu oznaczania, substancji barwnych lub opalizujących.

Oznaczanie metioniny w analizatorach aminokwasów nie wyklucza błędów metodycznych związanych z hydrolizą (1), a pobieranie do tych oznaczeń bardzo małych odważek zwiększa różnice w stosunku do rzeczywistej jej zawartości w związku z trudnościami pobrania próby reprezentatywnej. Decydujące znaczenie ma fakt wysokich kosztów takiej analizy, długi czas jej trwania i niemożliwość przeprowadzania jej w każdym laboratorium.

Naszym celem było opracowanie takiej metody, która nie byłaby obciążona stratami metioniny w procesie jej uwalniania oraz błędami wynikłymi z pojawiania się czynników przeszkadzających w pomiarze absorpcji powstałego kompleksu metionina-nitroprusydek. Ponadto mieliśmy na uwadze maksymalne uproszczenie postępowania analitycznego. Opracowana metoda spełnia wszystkie powyższe zamierzenia i jest dogodna do przeprowadzania oznaczeń seryjnych.

OZNACZANIE METIONINY KONSTYTUCYJNEJ

Oznaczanie metioniny konstytucyjnej jest uwarunkowane przeprowadzeniem tego aminokwasu do roztworu w procesie hydrolizy składników białkowych. Często stosowana do tego celu hydroliza z 6 n HCl prowadzi do strat

metioniny wskutek tworzenia się połączeń aminokwasowo-węglowodanowych o charakterze humin. W naszym laboratorium stwierdzono, że wielkość strat metioniny w procesie hydrolizy zależy od zawartości węglowodanów w próbce i może sięgać nawet 70%. Ten sposób uwalniania metioniny doprowadza również do wytwarzania się barwnych produktów hydrolizy, które często uniemożliwiają bezpośrednie pobieranie hydrolizatu do dalszych etapów oznaczania. Barwne produkty hydrolizy możliwe są wprawdzie do usunięcia na kolumnie z florisilem 60—100 mesh, ale czynność ta niepotrzebnie komplikuje proces analityczny. Ostatnio ogólnie stosowana jest hydroliza kwaśna po wstępnym utlenieniu składników paszy kwasem nadmanganowym (17, 18). W wyniku tego procesu metionina przechodzi w sulfon, który podczas hydrolizy białek uwalniany jest w ok. 100%. Niestety takie przygotowanie próbek uniemożliwia wykorzystanie specyficznych metod oznaczania uwolnionej metioniny: nitroprusydkowej (2, 3, 15) i oksydoredukcyjnej (5, 7). W związku z tym zdecydowano się na zastąpienie etapu kwaśnej hydrolizy — hydrolizą enzymatyczną przy pomocy papainy. Enzym ten nie doprowadza wprawdzie do całkowitego uwalniania metioniny, a tylko do oswobodzenia w niej grupy czynnej, lecz stanowi to wystarczający warunek do przeprowadzenia ilościowej reakcji z nitroprusydem (9, 11).

POSTĘPOWANIE

A. Hydroliza. Naważkę uprzednio przygotowanej do analizy paszy, zawierającą około 150 mg azotu ogólnego, przenosi się ilościowo do kolbki miarowej poj. 100 ml i zadaje 25 ml 0,5% roztworu papainy w buforze cytrynianowym 0,2 M o pH 7,0. Próbkę hydrolizuje się w temp. pokojowej przez 16 godz. okresowo mieszając. Po zakończonej hydrolizie zawartość kolbki uzupełnia się wodą do kreski i dokładnie miesza. Hydrolizat sączy się następnie przez miękki sączek (przesącz nie musi być zupełnie klarowny).

B. Oznaczenia kolorometryczne. Do dalszego oznaczania pobiera się 10 ml przesączu do kolbki stożkowej poj. ok. 50 ml. Dodaje się 2 ml 5N NaOH, 0,2 ml świeżo przyrządzonego 10% roztw. nitroprusydku sodu i 4 ml 3% roztw. glicyny i zawartość kolbki dokładnie miesza. Roztwór inkubuje się w łaźni wodnej o temp. 35—40°C przez 10 minut. Następnie mieszaninę szybko chłodzi się w wodzie z lodem i dodaje kroplami 2 ml 85% H_3PO_4 intensywnie mieszając. Roztwór przesącza się przez średni sączek i oznacza jego absorpcję wobec próby zerowej przy 510 nm. Wyniki oblicza się metodą krzywej wzorcowej.

OMÓWIENIE

Opisaną metodą oznaczano zawartość metioniny w różnych paszach. Wyniki tych oznaczeń zestawiono w tab. 1 i porównano z rezultatami oznaczeń według postępowania Schrama (15), uzyskanymi na automatycznym analizatorze aminokwasów AAA 881 prod. Mikrotechna — Praha. Z porównania tych rezultatów wynika, że opracowana metoda daje wartości metioniny bardzo bliskie wyników otrzymanych z analizatora. W większości przypadków różnice między nimi leżą w granicach 2,3—7,5% i mieszczą się w przedziale błędów popełnianych podczas oznaczania metioniny przy pomocy automatycznego analizatora aminokwasów. Duża precyzja opracowanej metody, jej prostota i pominięcie kosztownej aparatury predysponują ją do szerokiego wprowadzenia do laboratoriów kontrolnych.

Tab. 1. Zawartość metioniny w białku prób paszowych oznaczona opracowaną metodą oraz na analizatorze aminokwasów, wyrażona w % białka próby
 Content of methionine in feeds protein determined by means of the elaborated method and on the aminoacids analyser, expressed in per cent

Pasza	Metoda opracowana	$\bar{x}$	S	Analizator aminokwasów
Celamin	1,86	1,77	0,11	1,84
	1,82			
	1,60			
	1,79			
	1,68			
	1,84			
Siano z koniczyny	1,83	1,70	0,08	1,58
	1,61			
	1,67			
	1,70			
	1,76			
	1,63			
Mieszanka dla karpia	1,78	1,76	0,06	1,68
	1,86			
	1,67			
	1,81			
	1,72			
	1,70			
Mieszanka dla kurcząt	2,20	2,18	0,14	2,14
	1,98			
	2,39			
	2,15			
	2,09			
	2,28			
Mieszanka dla loszek	0,95	0,78	0,11	0,88
	0,69			
	0,72			
	0,86			
	0,70			
	0,74			
Drożdże past.	0,87	0,86	0,05	0,94
	0,82			
	0,90			
	0,89			
	0,88			
	0,79			

OZNACZANIE METIONINY — DODATKU

Wypłukiwania wolnej metioniny — dodatku paszowego dokonuje się zwykle w prostym procesie wymywania aminokwasu roztworami HCl (2). W procesie tym dochodzi jednak do przechodzenia do roztworu trudnych do usu-

nięcia koloidów i zawiesin, uniemożliwiających dokładne oznaczenie metioniny. Doświadczenia wykazały, że niedogodności tych można uniknąć, bez ujemnego wpływu na dalszy proces oznaczania, stosując do wypłukiwania metioniny roztwory kwasu tróchlorooctowego.

POSTĘPOWANIE

Próbkę paszy zawierającą do 25 mg metioniny — dodatku przenosi się do kolbki miarowej poj. 100 ml i uzupełnia do kreski 5% roztworem kwasu tróchlorooctowego. Próbkę dokładnie miesza się i sączy przez twardy sączek. Z przesącza pobiera się 10 ml roztworu i postępuje dalej analogicznie, jak przy oznaczaniu metioniny konstytucyjnej (pkt B).

Tab. 2. Opis w tekście
Description in the text

Dodano mg metioniny na 1 g paszy	Oznaczono mg metioniny na 1 g paszy	$\bar{x}$	S	Odzysk metioniny w %
2,00	1,97	1,97	0,04	98,5
2,00	2,05			
2,00	1,95			
2,00	1,96			
2,00	1,93			
2,00	1,98			
4,00	3,90	3,93	0,04	98,3
4,00	3,94			
4,00	3,88			
4,00	3,98			
4,00	3,94			
4,00	3,95			
6,00	5,92	5,94	0,06	99,0
6,00	5,90			
6,00	6,01			
6,00	5,94			
6,00	6,02			
6,00	5,86			
8,00	7,95	7,95	0,06	99,4
8,00	7,85			
8,00	8,00			
8,00	7,94			
8,00	7,92			
8,00	8,02			
10,00	9,96	9,90	0,05	99,0
10,00	9,82			
10,00	9,90			
10,00	9,85			
10,00	9,86			
10,00	9,92			

OMÓWIENIE

Opracowaną metodą oznaczano zawartość metioniny — dodatku w mieszance treściwej dla kurcząt rzeźnych — DK-A Starter. (W warunkach wyplukiwania wolnej metioniny przy pomocy HCl mieszanka ta była źródłem pojawiania się wszystkich opisanych czynników pogarszających precyzję oznaczania aminokwasu). Mieszanke wzbogacano metioniną w granicach od 2,00 do 10,0 mg/g suchej masy próby. Rezultaty tych oznaczeń zestawiono w tab. 2. Wskazują one na to, że odzysk metioniny w badanych próbach waha się w przedziale 98,3—99,4%. Wysoki procent odzysku aminokwasu oraz wykluczenie czynników utrudniających pomiar absorpcji jego kompleksu z nitroprusydkiem świadczą o dużej przydatności opracowanego postępowania do analizy dodatków metioniny w paszach.

PIŚMIENNICTWO

1. Davies M. G., Thomas A. J.: An Investigation of Hydrolytic Techniques for the Amino Acids Analysis of Foodstuffs. *J. Sci. Food Agric.*, **24**, 1525, 1973.
 2. Ferrel R. E., Fellers D. A., Shepherd A. D.: Determination of Free Lysine and Methionine in Amino Acid-Fortified Wheat. *Cereal Chem.*, **46**, 614, 1969.
 3. Heathcote J. G., Haworth C.: An Improved Techniques for the Analysis of Amino Acids and Related Compounds on Thin Layer of Cellulose II. The Quantitative Determination of Amino Acids in Protein Hydrolysates. *J. Chromatogr.*, **43**, 84, 1969.
 4. Hirs C. H. W.: The Oxidation of Ribonuclease with Performic Acid. *J. Biol. Chem.*, **219**, 611, 1956.
 5. Kyriacou D.: Rapid Voltametric Determination of Methionine with the Platinum Electrode. *Nature*, **211**, 519, 1966.
 6. Lewis O. A. M.: Short Ion-Exchange Column Method for the Estimation of Cysteine and Methionine. *Nature*, **209**, 239, 1966.
 7. Lorenzo-Andreu A., Bach E., Frandsen K. J.: Studies on the Variation in Content and Production of Nitrogen and Some Essential Amino Acids in Forage Plants. *Acta Agric. Scand.*, **12**, 49, 1962.
 8. Maček V.: Quantitative Estimation of Amino Acids in Urine. *Cas. Lekaru Ceskich*, **104**, 1402, 1965.
 9. Machowicz E., Sarnecka-Keller M.: Papaina. *Postępy Biochemii*, **18**, 95, 1972.
 10. McCarty M., Sullivan O.: A New and Highly Specific Colorimetric Test for Methionine. *J. Biol. Chem.*, **141**, 871, 1941.
 11. Pawlik J.: Zastosowanie papainy przy oznaczaniu metioniny w niektórych materiałach roślinnych. *Chemia Analit.*, **18**, 963, 1973.
 12. Ramirez de Guglielmone A. E., Gomez C. J.: Determination of Amino Acids in Biological Samples. *Rev. Assoc. Bioquim. Arg.*, **30**, 178, 1965.
 13. Rerat A., Henry Y.: Estimation of the Sulphur Amino Acids Requirement of the Growing Rat. *Ann. Biol. Animale Biochim. Biophys.*, **5**, 469, 1965.
 14. Rudra M. N., Choudhury L. M.: The Colorimetric Determination of Methionine. *Analyst*, **76**, 432, 1951.
 15. Schram E., Moore S., Bigwood E. J.: Chromatographic Determination of Cystine as Cysteic Acid. *Biochem. J.*, **57**, 33, 1954.
 16. Sławiński P., Karpińska B., Matyka S.: Oznaczanie metioniny w paszach. *Biuletyn Informacyjny Przem. Pasz.*, **1**, 15, 1973.
 17. Wójciak M., Petryszyn J., Stencka K.: Metody oznaczania składu aminokwasowego pasz. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, **101**, 227, 1970.
 18. Wunsche J.: Einfluss der Hydrolyse auf die Ergebnisse der mikrobiologischen Zystinbestimmung in Futtermitteln. *Arch. Tierernähr.*, **21**, 49, 1971.
- Wpl. 10 IV 74.

РЕЗЮМЕ

В данной работе представлен простой способ спектрофотометрического обозначения связанного метионина и добавочного метионина, обогащающего корм.

Для того, чтобы обозначить связанный метионин, нужно его сперва освободить, употребляя энзиматический гидролиз с папаином. Выполаскивание добавочного метионина проводится при помощи раствора трихлороуксусной кислоты. Освобожденный в обоих случаях метионин спектрофотометрически обозначается после объединения его в цветной комплекс с нитропруссидом натрия.

Представленный метод упрощает аналитический способ, если сравним его с до сих пор применяемым методом и исключает ошибки, вытекающие из применения HCl при гидролизу и выколакиванию метионина из кормов.

Результаты обозначения метионина в кормах, полученные при помощи описанного метода, сопоставлено с результатами, полученными на автоматическом анализаторе аминокислот.

SUMMARY

A simple procedure for a spectrophotometric determination of constitutional methionine and methionine—enriching addition in feeds has been described in this paper.

In case of determining constitutional methionine its release is achieved by enzymatic hydrolysis with papaine. Washing out methionine—addition is performed by means of trichloroacetic acid solution. Methionine released in both cases is determined spectrophotometrically after bounding it into a colour complex with sodium nitroferri cyanide.

The described method simplifies analytic procedure in relation to the methods used so far and it excludes mistakes resulting from using HCl during the hydrolytic process and washing out methionine from feeds.

The results of the determination of methionine in feeds obtained by means of the described method were compared with the results obtained on the automatic aminoacid analyser.