

DANUTA PIENIAŻEK

Instytut Żywności i Żywienia w Warszawie

PRZEGLĄD METOD STOSOWANYCH W BADANIACH  
NAD PRZYSWAJALNOŚCIĄ AMINOKWASÓW I PRÓBA  
ICH OCENY

Block i Mitchell (6) udowodnił, że wartość odżywcza białka jest przede wszystkim uzależniona od jego składu aminokwasowego. Zaproponowali oni, aby wartość odżywczą badanego produktu określać na podstawie zawartości niezbędnego (essential) aminokwasu, którego jest najmniej w porównaniu z jego ilością w białku całego jaja kurzego, przyjętego za wzorzec. Aminokwas taki określono jako ograniczający, a metodę — metodą wskaźnika aminokwasu ograniczającego (Chemical Score-CS). Ma ona duże znaczenie w ocenie jakości białek naturalnych (20, 54).

Badania zarówno *in vivo* jak i *in vitro* wykazały, że niektóre procesy technologiczne powodują obniżenie przyswajalności aminokwasów, a więc stopnia wykorzystania ich przez organizm. Obecnie uważa się, że przyczyną gorszego wykorzystania aminokwasów z białka mogą być:

- 1) reakcje wolnych grup aminowych, głównie  $\epsilon$ -aminowych grup lizyny, z węglowodanami lub produktami utlenienia tłuszczów;
- 2) reakcje między resztami aminokwasów w obrębie cząsteczki białka,
- 3) reakcje prowadzące do utlenienia aminokwasów siarkowych.

Przeprowadzone przez Forda i Saltera (23) doświadczenia nad wpływem drastycznego ogrzewania filetów z dorsza na poziom aminokwasów, wykorzystywanych przez mikroorganizmy do wzrostu, wykazały znaczne ich obniżenie w porównaniu z białkami nieogrzewanymi. Natomiast całkowita ilość aminokwasów w białku, traktowanym wysoką temperaturą w zasadzie się nie obniżyła (tab. 1). Powyższa różnica wynika z faktu, że stosowana hydroliza kwaśna do oznaczeń całkowitej ilości aminokwasów powoduje rozerwanie wszystkich wiązań — zarówno peptydowych jak i połączeń aminokwasów z innymi składnikami, np. węglowodanami, tłuszczami — a w tym i tych, które mogą być odporne na działanie enzymów proteolitycznych.

Ponadto przy oznaczaniu aminokwasów siarkowych stosowane jest

Tabela 1

Zawartość (g/16 g N) metioniny, waliny, leucyny, izoleucyny, histydyny i lizyny w filetach z dorsza oznaczone mikrobiologicznie po uprzedniej hydrolizie białka za pomocą pepsyny, pankreatyny i erypsyny. Dla porównania podano również całkowitą ilość aminokwasów, określoną mikrobiologicznie po hydrolizie kwaśnej (23)

Proces	Metionina *		Walina *		Leucyna *		Izoleucyna *		Histydyna *		Lizyna †	
	O	P	O	P	O	P	O	P	O	P	O	P

bez ogrzewania	3,17	3,18	5,68	4,95	8,50	7,81	5,15	5,33	1,95	1,73	9,65	8,48
ogrzewanie: 135°, 18 godzin	3,05	2,65	6,15	4,72	9,04	7,53	5,31	5,02	2,05	1,62	8,50	3,83
145°, 18 godzin	2,90	2,06	5,93	4,25	8,64	7,14	5,30	4,56	1,94	1,33	7,30	2,18

O — Ogólna

P — przyswajalna

\* — oznaczono za pomocą *Streptococcus zymogens*

† — oznaczona za pomocą *Streptococcus durans*

uprzednie utlenienie białka kwasem nadmanganowym w celu przeprowadzenia metioniny w sulfon metioniny a cysteiny w kwas cysteinowy. Zabieg ten pozwala uniknąć destrukcji labilnych aminokwasów siarkowych podczas dalszej hydrolizy kwaśnej białka, ale uniemożliwia odróżnienie metioniny i cysteiny od ich form utlenionych pod wpływem stosowanych procesów technologicznych i nieprzyswajalnych dla organizmu (16, 38, 43).

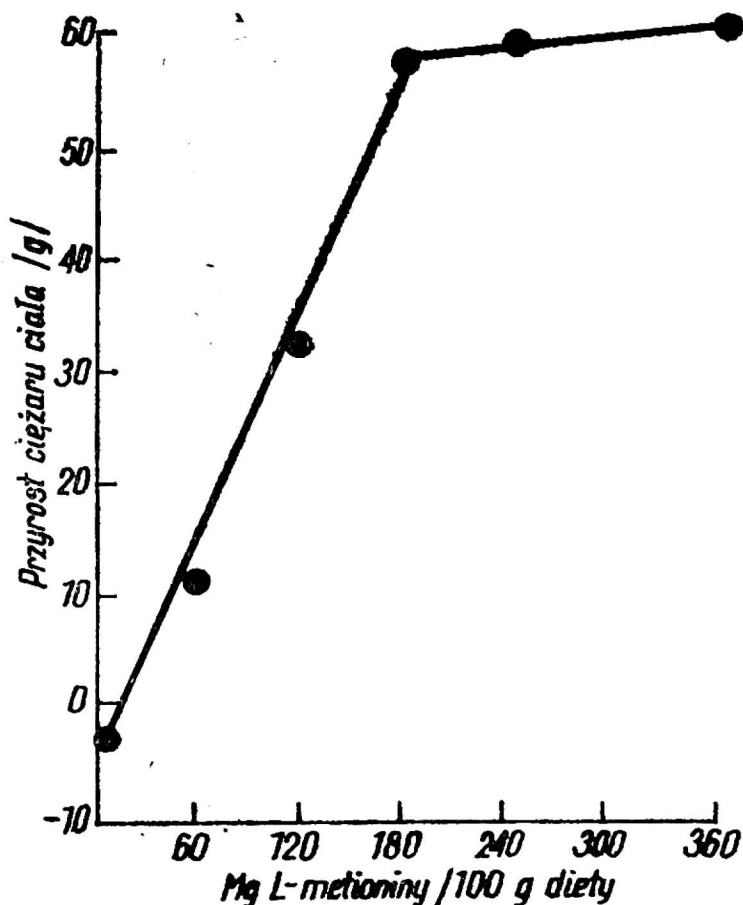
Ponieważ na podstawie składu aminokwasowego oznaczonego po hydrolizie kwaśnej białek produktów przetworzonych przemysłowo nie można wnioskować o stopniu wykorzystania aminokwasów przez organizm, rozwijane są różne metody badania ilości przyswajalnych, tj. faktycznie wykorzystanych przez organizm aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym.

W niniejszej pracy dokonano przeglądu najczęściej stosowanych metod biologicznych, mikrobiologicznych, chemicznych i enzymatycznych oraz przeprowadzono próbę ich oceny.

## Metody biologiczne

### 1. Metoda wzrostowa

W oznaczeniach przyswajalności aminokwasów metodą wzrostową wykorzystuje się wprost proporcjonalną zależność (w określonych ilościowo granicach) między spożyciem aminokwasu wolnego lub z białka, a przyrostem ciężaru ciała zwierząt doświadczalnych, takich jak młode czy dorosłe szczury oraz kurczęta (56, 37). Przyswajalną ilość aminokwasu w białku badanego produktu oblicza się na podstawie krzywej wzrastania zwierząt żywionych dietą z różnym, ale znanym dodatkiem czystego aminokwasu. Dla przykładu przytoczono za Schweigert i Gutheneck (56) krzywą wzrastania szczurów przy różnym poziomie metioniny w diecie (rys. 1).



Rys. 1. Zależność przyrostu ciężaru ciała od ilości metioniny w diecie

Metodą wzrostową najczęściej oznaczane są dwa aminokwasy: metionina i lizyna.

W przypadku oznaczeń przyswajalnej metioniny tą metodą Schweigert i Gutheneck (56) stosowali dietę, w której kazeina utleniona była głównym źródłem aminokwasów, z wyjątkiem metioniny, cysteiny, try-

ptofanu i treoniny, które w procesie utlenienia białka ulegają bądź inaktywacji (metionina, cysteina), bądź destrukcji (tryptofan, treonina). Ponieważ wyżej wymienione aminokwasy należą do egzogennych, niezbędne było dodanie do diety cysteiny, treoniny oraz tryptofanu, zgodnie z zapotrzebowaniem zwierząt. Źródłem metioniny był oczywiście badany produkt. Powyższa metoda słuszna w swoich założeniach, jest jednak bardzo pracochłonna, jak również kosztowna. Niewątpliwie z tych dwóch powodów jest ona obecnie rzadko stosowana.

W oznaczeniach przyswajalnej lizyny w białkach produktów spożywczych metodą wzrostową stosuje się dietę, w której głównym źródłem aminokwasów jest najczęściej gluten pszeniczny lub sezam (55). Zawiera on jednak nie tylko znikome ilości lizyny, ale również izoleucyny, leucyny, waliny, metioniny, histydyny i treoniny, które muszą być dodane do diety. Źródłem lizyny jest badany produkt. Metoda ta, podobnie jak w przypadku metioniny, stosowana jest sporadycznie.

Metodą wzrostową Schweigert i Gutheneck (55, 56) określili procent wykorzystania metioniny i lizyny przez szczury z kazeiny, laktoalbuminy, odtłuszczonego mleka w proszku, kiełków pszenicy, płatków owsianych, różnych przetworów z soi i sezamu a także świeżego i puszkowanego mięsa wieprzowego i wołowego. Rakowska i wsp. (53) zastosowali tę metodę do oznaczania sumy przyswajalnej metioniny i cysteiny w wybranych białkach produktów przetworzonych przemysłowo (tab. 2).

Tabela 2

*Zawartość przyswajalnych aminokwasów siarkowych (g/16 g N) w białkach produktów przetwarzanych przemysłowo oznaczona biologicznie. Dla porównania podano również całkowitą ilość aminokwasów siarkowych (53)*

Produkt	Suma aminokwasów siarkowych	
	całkowita po hydrolizie kwaśnej	przyswajalna test wzrostowy na szczurach
Mleko suszone rozpyłowo	3,81	3,79
Mleko suszone walcowo	3,75	3,13
Serwatka suszona rozpyłowo	5,41	5,66
Serwatka suszona walcowo	5,22	4,31
Makrela mrożona	4,08	4,89
Makrela sterylizowana, 126°	4,25	2,71

Stwierdzili spadek przyswajalnych aminokwasów siarkowych w mleku i serwatce suszonych walcowo oraz w makreli sterylizowanej w 126°.



Wyniki uzyskane metodą wzrostową mogą być uzależnione od takich czynników jak zbilansowanie aminokwasów, poziom białka, rodzaj węglowodanów czy obecność niezidentyfikowanych czynników wzrostu w diecie.

De Muelenaere i wsp. (13), badając zawartość przyswajalnej lizyny w ryżu otrzymali wyniki wyższe niż 100%. Dalsze badania wykazały, że wartość dla przyswajalnej lizyny oszacowano zbyt wysoko ze względu na obecność niezidentyfikowanego węglowodanu w ryżu, który działał stymulująco na wzrost zwierząt. 120% zawartości przyswajalnych aminokwasów siarkowych (metionina + cysteina) w nieprzetworzonej makreli stwierdziła Pieniążek (44). Nie wiadomo jednak co było w tym przypadku powodem tak intensywnego wzrostu szczurów.

## 2. Bilans azotowy

Zasada oznaczania przyswajalności aminokwasów w oparciu o bilans azotu jest podobna do metody wzrostowej. Różnica polega na tym, że kryterium oceny jest retencja azotu metodą bilansową a nie przyrost ciężaru ciała zwierząt.

Stosując tę technikę Linkswiler i wsp. (32) udowodnili, że walina, leucyna, fenylalanina i treonina w kukurydzy są w pełni przyswajalne przez człowieka.

Metoda ta jednak jest bardzo czasochłonna, kosztowna a przy tym obciążona dużym błędem i z tego względu ma ograniczone zastosowanie w rutynowych oznaczeniach.

## 3. Oznaczenie strawności aminokwasów

W metodzie tej zawartość aminokwasów wykorzystywanych przez organizm określa się na podstawie ilości aminokwasów wydalonych (z kałem) do pobranych z diety.

Ilość endogennych aminokwasów w kale, uwzględniana w obliczeniach oznacza się podczas kontrolnego okresu, w czasie którego zwierzęta otrzymują dietę bezbiałkową, nisko białkową lub zawierającą białko całkowicie trawione.

Kuiken i Lyman w 1948 r. (28) określili stosując powyższą metodę, zawartość 10 przyswajalnych aminokwasów w różnych białkach produktów spożywczych a Kuiken w 1952 roku (27), zademonstrował za pomocą tej metody, wpływ procesów technologicznych na poziom przyswajalnych aminokwasów w białku nasion bawełny. Watts i wsp. (61, 62) zaadaptowali tę metodę do badań przyswajalności aminokwasów u ludzi.

Dalsze badania wykazały, że uzyskiwane tą metodą wartości są znacznie wyższe niż otrzymywane w testach mikrobiologicznych lub chemicz-

nych (24). Sugerowało to, że mikroflora jelitowa wykorzystuje niestrawione peptydy czy kompleksy aminokwasów z innymi związkami i stąd nie pojawiają się one w kale i tym wpływają na zbyt wysokie wartości wyników (42). Hipoteza ta została potwierdzona zarówno w badaniach *in vitro* (17) jak i *in vivo* (18).

Równorzędna koncepcja zakładała, że peptydy odporne na działanie enzymów proteolitycznych, głównie z powodu obecności w nich lizyny z zablokowaną grupą  $\epsilon$ -aminową, są częściowo absorbowane w jelicie, a następnie wydalane w moczu. Pierwsze dowody wykazujące słuszność założenia przedstawione zostały przez Forda i Saltera (23), a Prończuk i wsp. (51) potwierdzili, że w moczu szczurów żywionych ogrzewaną kazeiną lub spieczonymi ciastkami wzrasta frakcja wysokocząsteczkowych peptydów (zakres c.c.z.: 250—2500) w porównaniu z białkiem nieogrzewanym.

Podobne wyniki uzyskali Ford i Shorrock (24) dla ogrzewanych białek produktów spożywczych.

Metoda oznaczania aminokwasów w kale nie może być zatem stosowana do badań poziomu przyswajalnych aminokwasów w białkach, ponieważ nie uwzględnia ani działalności mikroflory jelitowej ani też możliwości przenikania peptydów przez barierę jelitową i wydalania ich w moczu.

Wyżej wysunięte zarzuty stanowiły podstawę modyfikacji tej metody, polegającej na oznaczeniu aminokwasów wchłoniętych do końca jelita cienkiego — tzw. ileal digestibility (9). Technika ta według Carpentera (9) może być użyteczna do wykrywania zmian w łańcuchu polipeptydowym ale wymagane jest udoskonalenie metody w kierunku zwiększenia jej precyzji.

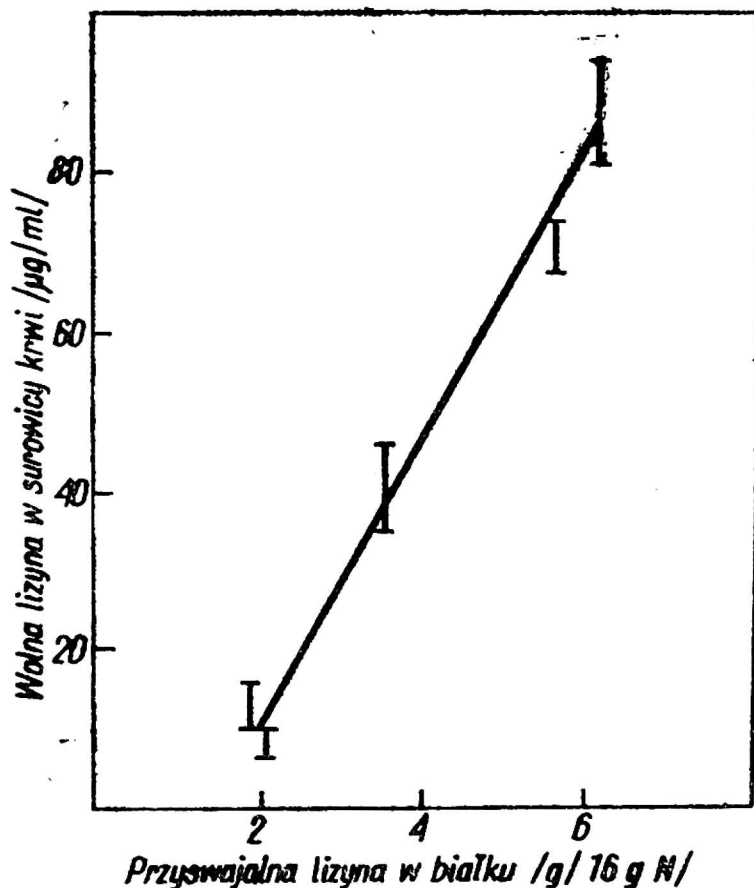
#### *Poziom wolnych aminokwasów w plazmie krwi (Plasma Amino Acids Methods-PAA) i w mięśniach a zawartość przyswajalnych aminokwasów w białku*

Poziom wolnych aminokwasów we krwi jest wynikiem różnicy między ilością pobraną przez tkanki a ilością dostarczoną z diety lub tkanek endogennych.

Zasada metody polega na oznaczeniu stężenia wolnych aminokwasów w odbiałczonej surowicy krwi po upływie określonego czasu od spożycia posiłku. Oznaczoną zawartość porównuje się następnie z ilością wolnych aminokwasów w surowicy krwi zwierząt otrzymujących dietę bezbiałkową lub pozbawionych pożywienia przez pewien okres czasu. Wymaga to ścisłego przestrzegania warunków głodzenia jak również spożycia określonej ilości diety. Ponieważ jednak aminogram surowicy

krwi zwierząt głodzonych może wykazywać zbyt wysokie stężenie niektórych aminokwasów, wynikające z katabolizmu białka (3) i tym samym wpływać na interpretację wyników w wielu laboratoriach odnośnikiem jest aminogram surowicy krwi zwierząt żywionych dietą z pełnowartościowym białkiem.

Przydatność tej metody do badań poziomu przyswajalnych aminokwasów w białku jest cały czas przedmiotem dyskusji. Zależność pomiędzy poziomem wolnych aminokwasów w surowicy krwi zwierząt a zawartością aminokwasów w białku spożytym przez nie stwierdził między innymi Pion i wsp. (49), Buraczewski i wsp. (7). Smith i Scott (59, 60) obserwowali, że stężenie wolnej lizyny i treoniny w surowicy krwi kurcząt było niższe podczas żywienia zwierząt ogrzewanym białkiem ryby niż podczas żywienia nieogrzewanym produktem. Narayana Rao i Mc Laughlan (39) stwierdzili prostoliniową zależność między ilością lizyny



Rys. 2. Zawartość przyswajalnej lizyny w białku a ilość wolnej lizyny w surowicy krwi

w surowicy krwi szczurów a zawartością przyswajalnej lizyny (FDN-lizyna) w kazeinie ogrzewanej z glukozą (rys. 2). Nie stwierdzono natomiast korelacji dla metioniny.

Natomiast Levenson i wsp. (31), Nasset i wsp. (41) nie stwierdzili korelacji między składem aminokwasowym skarmianego białka a pozio-

mem aminokwasów we krwi psów. Podobne rezultaty otrzymał Eggum (cyt. wg Björna i Egguma (5), przeprowadzając doświadczenia na świnich z 10 różnymi białkami.

Rozważana jest również możliwość oceny poziomu przyswajalnych aminokwasów w białkach poprzez oznaczenie stężenia wolnych aminokwasów w tkankach zwierzęcych. Pion (48) stwierdził, że koncentracja wolnych aminokwasów (zwłaszcza lizyny i treoniny) w mięśniach jest znacznie wyższa niż we krwi i że mięsień jest lepszym wskaźnikiem zawartości i przyswajalności tych aminokwasów. Dla innych aminokwasów wyniki nadal są jednoznaczne.

Wydaje się, że za pomocą metody PAA czy oznaczeń wolnych aminokwasów w mięśniach będzie można określać całkowitą ilość przyswajalnej lizyny w białkach.

### *Metody mikrobiologiczne*

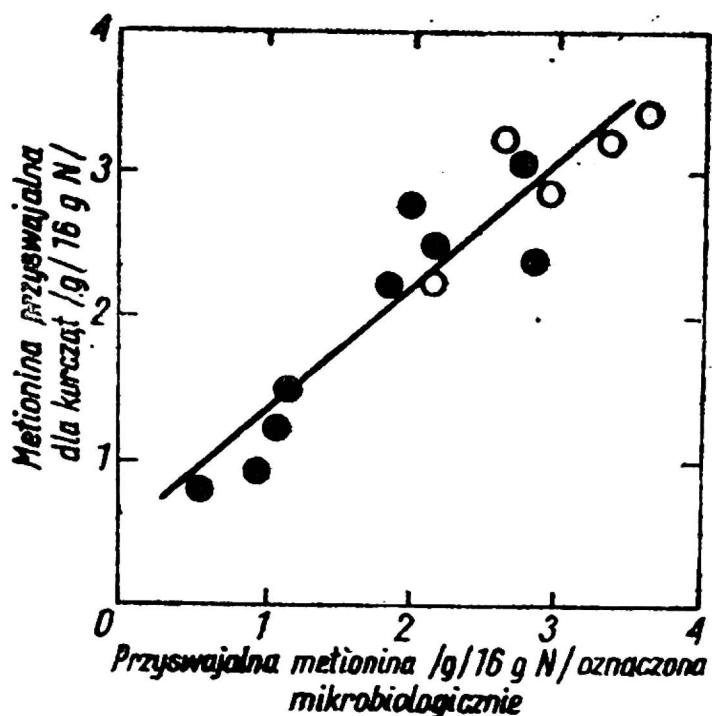
Opierają się one na porównaniu pomiaru intensywności przyrostu proteolitycznych mikroorganizmów, wymagających do wzrostu, w zależności od szczepu, różnych aminokwasów, na podłożu zawierającym badane białko, z intensywnością wzrostu na podłożu ze znanymi stężeniami aminokwasu.

Ford (21) po raz pierwszy w 1962 roku oznaczył za pomocą *Streptococcus zymogenes* poziom przyswajalnej metioniny, histydyny, leucyny, izoleucyny, argininy, tryptofanu i waliny w wielu białkach produktów spożywczych. Dalsze badania wykazały, że ze względu na niską wydajność proteolityczną mikroorganizmów niezbędne jest wstępne nadtrawienie białka za pomocą enzymów proteolitycznych. Carpenter i wsp. (12) Narayana Rao i wsp. (40) stwierdzili, że wstępna hydroliza białka za pomocą papainy podwyższa wyniki przyswajalnej metioniny, oznaczonej za pomocą *S. zymogenes*. Najlepsze rezultaty wg Forda (22) uzyskuje się przy stosowaniu do trawienia 0,36% roztworu papainy.

Metodą mikrobiologiczną najczęściej oznaczane są trzy aminokwasy: lizyna, tryptofan i metionina. Prowadzone są również badania nad oznaczaniem cysteiny ale dotąd nie otrzymano szczepu, który jednocześnie wymagałby cysteiny do wzrostu i posiadał właściwości proteolityczne. Dvorak (15) proponuje zastosowanie pełnej enzymatycznej hydrolizy białka i następnie oznaczanie ilości przyswajalnej cysteiny (uwolnionej przez enzymy) za pomocą szczepu nieproteolitycznego.

W wielu przypadkach stwierdzono korelację między metodą mikrobiologiczną a biologiczną (wzrostową) (37) (rys. 3).

Pongpaew i Guggenheim (50) natomiast (tab. 3) nie stwierdzili za-



Rys. 3. Porównanie zawartości przyswajalnej metioniny oznaczonej metodą mikrobiologiczną i biologiczną

Tabela 3

Zawartość tryptofanu w wybranych białkach produktów spożywczych, oznaczona metodą chemiczną oraz procent jego przyswajalności określony w testach na zwierzętach i mikrobiologicznie (50)

	M e t o d y			
	chemiczna	biologiczna	Mikrobiologiczne *	
	(mg/1 g N)	(na szczu- rach)	<i>Strepto- coccus zymogenes</i>	<i>Lactoba- cillus arabinosus</i>
Kazeina	87		94	91
Białko jaja	90	100	103	86
Chude mleko w proszku	93	88	94	75
Ryba	78	35	99	82
Ogrzewana mąka sojowa	82	87	96	60
Mąka sezamowa	87	92	99	83
Mąka pszenna	64		88	58
Mąka ryżowa	81		96	67
Autoklawowany groch włoski	70	27	81	67
Zeina	27		93	37

\* Po trawieniu za pomocą pepsyny, trypsyny i erypsyny.



leżności między metodą mikrobiologiczną a biologiczną w oznaczeniach przyswajalnego tryptofanu w białkach produktów spożywczych. Ponadto wskazali oni na istotne różnice w wynikach w zależności od stosowanego szczepu: *S. zymogenes* dawał wyniki znacznie wyższe niż *Lactobacillus arabinosus*, chociaż białko w obu przypadkach było wstępnie trawione pepsyną, trypsyną i erypsyną.

Dvorak (14) sugeruje zastosowanie do wstępnego trawienia białka pepsyny, aminopeptydazy leucynowej i prolidazy, a więc układu enzymatycznego, który uważany jest za najbardziej wydajny w uwalnianiu aminokwasów z łańcucha polipeptydowego. Stosując powyższy układ wykazał on na przykładzie oznaczania przyswajalnej leucyny w mięśni wołowym, zgodność wyników uzyskiwanych przy stosowaniu różnych szczepów bakteryjnych.

Nadal jednak pozostaje niewyjaśniona sprawa, dlaczego w wielu przypadkach wyniki uzyskane metodą mikrobiologiczną są znacznie wyższe niż otrzymane biologicznie (tab. 3). Być może związane jest to z błędami metodycznymi, odmiennymi reakcjami organizmów na inhibitory, często występujące w produkcji, jak również z faktem, że bakterie mogą wykorzystywać peptydy niestrawne dla organizmów wyższych.

### *Metody chemiczne*

Do rutynowanych badań stosowane są najczęściej szybkie metody chemiczne, polegające na oznaczeniu wybranego aminokwasu w białku za pomocą wybiórczej reakcji chemicznej. Metody te muszą być selektywne tzn. w reakcji nie mogą brać udziału formy aminokwasów, które powstały w trakcie przetwarzania białka i które nie są wykorzystane (przyswajalne) przez organizm. Do tej pory w oparciu o powyższe założenia zostały opracowane metody oznaczania przyswajalnej lizyny (8), tryptofanu (58), metioniny i cysteiny (45), a więc tych aminokwasów, które jak wykazał Autret i wsp. (1) najczęściej ograniczają wartość odżywczą białek. Czy wyniki uzyskane za pomocą metod chemicznych są wiarygodne, tzn. czy określają one jaki jest faktyczny poziom aminokwasów przyswajalnych w białku? Analizie poddano metody oznaczeń przyswajalnej lizyny, metioniny i cysteiny. Na temat oznaczenia przyswajalnej lizyny niejednokrotnie już pisano. Wiadomo, że polega ona na oznaczeniu wolnych  $\epsilon$ -aminowych grup lizyny w łańcuchu polipeptydowym, najczęściej za pomocą 1-fluoro-2, 4-dwunitrobenzenu (FDNB) (8).

Grupa  $\epsilon$ -aminowa w białkach produktów przetworzonych przemysłowo jest często zablokowana bądź w wyniku reakcji Maillarda (33), bądź interakcji z lipidami (30) lub na skutek reakcji tej grupy z grupą amidową asparaginy lub glutaminy białek (4). W powyższych przypadkach

powstają wiązania chemiczne, które albo nie są trawione przez enzymy albo trawienie jest wolniejsze tak, że biologiczna dostępność lizyny może być znacznie obniżona (52).

Badania poziomu przyswajalnej lizyny w białkach produktów spożywczych za pomocą metody chemicznej były przeprowadzone na różnorodnym materiale (białka mleczne, mięsne, roślinne, rybne) w wielu ośrodkach (11). Wykazały one, że wyniki uzyskane metodą chemiczną są wysoko skorelowane z danymi uzyskanymi w testach biologicznych zwłaszcza w przypadku białek mlecznych (tab. 4). Świadczy to, że za pomocą tej metody można oznaczać całkowitą ilość przyswajalnej lizyny w białkach tej grupy produktów.

Tabela 4

Porównanie zawartości przyswajalnej lizyny (g/16 g N) w mleku poddanemu różnej obróbce termicznej (11)

	Lizyna (g/16 g N)			
	całkowita	przyswajalna		
		FDN-lizyna *	strawność <i>in vitro</i> + dializa	test na szczurach
Liofilizowanie	8,3	8,4	8,3	8,4
Suszenie rozpyłowe	8,0	8,2	8,3	8,1
Odparowanie	7,6	6,4	6,2	6,1
Suszenie walcowe:				
2	7,1	4,6	5,4	5,9
4	6,8	3,8	4,5	4,0
6	6,3	2,5	3,1	2,9
8	6,1	1,9	2,3	2,0

\* Wg metody Carpentera (8)

Nadal jednak jest sprawą dyskusyjną w jakim stopniu wiarygodne mogą być wyniki oznaczeń przyswajalnej lizyny za pomocą metody chemicznej dla innego rodzaju białek. W wielu przypadkach stwierdzono bowiem, że wynik zawartości przyswajalnej lizyny, szczególnie w białkach mięsnych i rybnych, był niższy, gdy stosowano do oznaczeń metody biologiczne czy mikrobiologiczne w porównaniu z metodą chemiczną (9, 57). Różnice w wynikach przyswajalnej lizyny, dla niektórych białek, przytoczono za Carpenterem i Booth'em (9) w tabeli 5 oraz Shorrockiem i Fordem (57) w tabeli 6.

Tabela 5

Porównanie wyników zawartości przyswajalnej lizyny uzyskanych za pomocą metody chemicznej oraz testów biologicznych.

Wartości podane są w % nieogrzewanego białka (11)

Badany materiał	Przyswajalna lizyna wg metody	
	chemicznej	biologicznej
Filety wątlusza ogrzewane w 135° C, 18 godz. w stanie powietrznie suchym	59	42 <sup>a</sup> , 39 <sup>b</sup>
Filety wątlusza ogrzewane w 121°C, 24 godz. w stanie powietrznie suchym	62	37 <sup>a</sup>
Filety wątlusza ogrzewane w 115°C, 27 godz. przy wilgotności próby 1,3 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> przy wilgotności próby 14 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>	72 67	52 <sup>c</sup> 63 <sup>b</sup>
Wołowina ogrzewana w 121°C, 12 godz.	83	63
Mięśnie kurcząt ogrzewane w 116°C, 27 godz. przy wilgotności próby 14 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>	78	56 <sup>c</sup> , 50 <sup>f</sup>

a — wg metody mikrobiologicznej z użyciem *S. durans*

b — test wzrostowy na szczurach.

c — test wzrostowy na kurczętach.

f — strawność na kurczętach (ideal digestibility).

Jedna z hipotez tłumaczy powyższe różnice obecnością lizyny z wolną ε-aminową grupą w peptydach niestrawnych dla organizmu. Aminokwas w tej formie nie jest wykorzystywany przez organizm, ale jest oznaczany metodą chemiczną.

Chemiczne metody oznaczania poziomu przyswajalnych aminokwasów siarkowych: metioniny i cysteiny w białkach produktów spożywczych zostały zaadaptowane przez Pieniążek i wsp. (45). Polegają one na oznaczeniu wolnych grup SCH<sub>3</sub> metioniny i SH cysteiny w łańcuchu polipeptydowym, po uprzedniej częściowej hydrolizie enzymatycznej białka za pomocą pankreatyny. Ilość oznaczonych wolnych grup jest miarą przyswajalności aminokwasów siarkowych w białku. Stwierdzono bowiem, że utleniona metionina (sulfon i sulfotlenek) i cysteina (kwas cy-

Tabela 6

Zawartość przyswajalnej lizyny (g/16 g N) w różnych białkach produktów spożywczych oznaczona chemicznie w reakcji z FDNB, mikrobiologicznie za pomocą *Tetrahymeny* oraz w testach wzrostowych na szczurach (57)

	<i>Tetrahymena</i> *	FDNB	Test wzrostowy na szczurach
Ryba, FM 101	4,8	6,1	6,9
Mięso, MM 101	1,1	4,1	4,3
Mięso wielorybie, WM 1	1,2	4,1	4,2
WM 3	2,7	6,1	6,7
WM 7	0,8	3,0	1,8
Drożdże, HY 101	1,9	5,7	7,0
HY 104	2,6	5,8	7,1
Orzeszki ziemne, CN 101	2,4	2,6	3,5
GN	2,1	3,0	3,2
Orzeszki ziemne ogrzewane HGN	0,6	1,3	1,0
Soja, SB	4,2	5,4	5,0
Soja ogrzewana, HSB	1,0	2,4	1,3
Mięsień wątlusza, nieogrzewany, CM	6,4	8,5	10,9
Mięsień wątlusza, ogrzewany, HCM	1,0	5,6	4,3
Kazeina	8,1	8,4	8,6

\* Oznaczenia przeprowadzono bez wstępnego trawienia enzymatycznego

steinowy) a więc formy, w których grupy SCH<sub>3</sub> i SH zostały zmienione nie są wykorzystywane jako źródło aminokwasów siarkowych przez organizm i nie biorą one również udziału w tych reakcjach chemicznych.

Stosując powyższe metody Pieniżek i wsp. (47) wykazali, że procesy technologiczne stosowane w przetwarzaniu żywności takie jak pasteryzacja, zagęszczanie i sterylizacja, suszenie walcowe, sterylizacja w 126° prowadzą do obniżenia zawartości przyswajalnej metioniny i cystyny w niektórych produktach mlecznych i rybnych. Dokładne dane przedstawiono w tabeli 7.

Wyniki badań *in vitro* zostały potwierdzone w testach wzrostowych na zwierzętach (tab. 2) i na tej podstawie uważa się, że spadek poziomu przyswajalnych aminokwasów siarkowych, stwierdzony za pomocą me-

to chemicznych ma istotny wpływ na wykorzystanie białka przez zwierzęta. Wydaje się, że powyższe metody mogą znaleźć zastosowanie nie tylko jako szybkie metody wskaźnikowe, pozwalające określić zmiany w poziomie przyswajalnej metioniny i cysteiny w białkach produktów spożywczych, przetworzonych przemysłowo, ale również oceniać całkowitą zawartość przyswajalnych aminokwasów siarkowych w białku.

Tabela 7

Zawartość ogólnej i przyswajalnej metioniny i cysteiny (g/16 g N) w wybranych białkach produktów spożywczych (47)

Produkt	Ogólna				Przyswajalna			
	Me- tionina	stra- ta * %	Cy- ste- ina	stra- ta * %	Me- tio- nina	stra- ta * %	Cy- ste- ina	stra- ta * %
Mleko:								
świeże	2,97	—	0,92	—	2,90	—	0,92	—
skondensowane:								
słodzone	2,82	3	0,90	2	2,47	15	0,63	32
niesłodzone	2,82	3	0,88	4	2,58	11	0,88	4
suszone:								
rozpyłowo	2,97	0	0,84	9	2,93	0	0,83	9
walcowo	2,90	0	0,85	8	2,26	22	0,83	9
Serwatka:								
świeża:	2,30	—	3,00	—	2,44	—	2,95	—
suszona:								
rozpyłowo	2,37	0	3,03	—	2,37	3	2,90	0
walcowo	2,53	0	2,99	0	2,10	14	2,87	3
Makrela:								
świeża	2,92	—	1,06	—	2,87	—	1,24	—
parowana	3,10	0	1,15	0	2,81	0	1,26	0
sterylizowana:								
115°	3,02	0	1,12	0	2,95	0	0,44	65
126°	2,96	0	1,29	0	2,31	19	0,31	75
parowana i sterylizowana:								
115°	3,11	0	1,03	0	2,92	0	0,44	65
126°	3,16	0	1,12	0	2,31	19	0,32	75

\* W stosunku do białka nieprzetworzonego

Mechanizmy zmian w białku prowadzące do powstania nieprzyswajalnych form metioniny i cysteiny są do tej pory poznane w niewielkim stopniu. Obecnie uważa się, że pod wpływem czynników utleniających metionina i cysteina zawarte w białkach są przekształcane w formy utlenione. Njaa (43) przeprowadzając badania nad wartością odżywczą suszonych ryb wykazał znaczny spadek ilości przyswajalnej metioniny



w białkach poddanych działaniu wysokiej temperatury. Wyszunął hipotezę, że inaktywacja metioniny może być w tym przypadku związana z przekształceniem tego aminokwasu do sulfonu metioniny. Lea i wsp. (29) przypuszczają, że sulfotlenek metioniny może powstawać w obecności produktów utlenienia tłuszczów.

Prac dotyczących przekształceń cysteiny w białkach pod wpływem procesów technologicznych w zasadzie nie ma. Jedynie Carpenter i Bjarnason (10), a także Bender (2) wysunęli hipotezę, że aminokwas ten może zostać utleniony do kwasu cysteinowego pod wpływem obróbki termicznej białka.

Nie zostało dotychczas wyjaśnione, czy zmodyfikowane formy aminokwasów siarkowych tzn. z zablokowaną grupą  $SCH_3$  i  $SH$  hamują hydrolizę enzymatyczną białka w przewodzie pokarmowym i tym samym unieczynniają wolną metioninę i cysteinę, które występują w ich sąsiedztwie?

Z badań *in vitro* przeprowadzonych między innymi przez Pieniążek i wsp. (46) wynika, że sulfon metioniny jest uwalniany przez enzymy proteolityczne z białka w 80%. Natomiast obecność sulfotlenku metioniny w łańcuchu polipetydowym hamuje hydrolizę enzymatyczną (16, 26). Również kwas cysteinowy, jak wykazały między innymi badania Pieniążek i wsp. (46), Wilkesa i wsp. (63) nie jest uwalniany z białka podczas trawienia enzymatycznego.

Biorąc pod uwagę fakt, że utlenione formy aminokwasów siarkowych mogą występować w białkach produktów spożywczych należy podkreślić konieczność przeprowadzenia większej ilości badań nad przydatnością metod chemicznych do oznaczeń całkowitej ilości przyswajalnej metioniny i cysteiny.

### *Metody enzymatyczne*

Równoległe z rozwojem metod biologicznych, mikrobiologicznych i chemicznych prowadzone były badania nad zastosowaniem hydrolizy enzymatycznej białka *in vitro* do oceny poziomu przyswajalnych aminokwasów. Do badań stosowano zarówno pojedyncze enzymy jak i układy enzymatyczne a uwolnione aminokwasy oznaczono metodami chemicznymi lub mikrobiologicznymi. Niepełna hydroliza enzymatyczna białka za pomocą wybiórczych enzymów np. pepsyny, papainy, trypsyny pozwala jedynie określić różnice w uwalnianiu poszczególnych aminokwasów w białku przed i po stosowanym zabiegu termicznym. Evans i Butts (19) zademonstrowali na przykładzie autoklawowania białka soi, że proces ten obniża uwalnianie aminokwasów przez enzymy. Mauron (35)

przeprowadził hydrolizę białka za pomocą pepsyny i pankreatyny w połączeniu z dializą. Uwolnione aminokwasy oznaczał na analizatorze aminokwasów. Metoda ta wg Maurona może mieć duże znaczenie w jakościowej kontroli mleka przetwarzanego przemysłowo. Stwierdził on bowiem istotne różnice, zwłaszcza w poziomie lizyny w mleku, w zależności od stosowanego procesu technologicznego.

Na podstawie ilości uwolnionych aminokwasów podczas częściowej hydrolizy enzymatycznej nie można ocenić całkowitego poziomu aminokwasów przyswajalnych, ponieważ wiele z nich może występować w peptydach, niestrawnych w warunkach *in vitro* natomiast rozkładanych *in vivo*. Dlatego też prowadzone są w wielu ośrodkach badania nad opracowaniem warunków kompletnej hydrolizy enzymatycznej białka (25, 34).

Obecnie uważa się, że najoptymalniejszym układem enzymatycznym do trawienia białka *in vivo* jest papaina (lub pankreatyna), aminopeptydaza leucynowa i prolidaza.

Tabela 8

Porównanie strat aminokwasów (%) w kazeinie ogrzewanej, określonych po hydrolizie kwaśnej oraz enzymatycznej. Oznaczenia przeprowadzono na analizatorze aminokwasów (46)

Aminokwas	Kazeina (% strat po hydrolizie)			
	ogrzewana (90°, 24 godz.)		ogrzewana (90°, 24 godz.) + glukoza	
	kwaśnej	enzymatycznej	kwaśnej	enzymatycznej
Kwas cysteinowy	17	—	14	—
Sulfon metioniny	16	—	10	—
Metionina	—	75	—	88
Kwas asparaginowy	0	36	0	43
Treonina	0	38	0	46
Seryna	9	44	3	61
Kwas glutaminowy	0	24	0	46
Prolina	3	14	6	23
Glicyna	0	28	0	52
Alanina	0	14	0	40
Walina	1	4	2	54
Izoleucyna	0	0	0	58
Leucyna	0	3	2	48
Tyrozyna	10	0	12	32
Fenylalanina	5	0	7	15
Lizyna	13	15	22	32
Histydyna	0	25	0	46
Arginina	10	22	12	38

Badania Pieniążek i wsp. (46) wykazały, że ogrzewanie kazeiny ma istotny wpływ na obniżenie poziomu aminokwasów uwalnianych przez pankreatynę, aminopeptydazę leucynową i prolidazę (tab. 8). Ponieważ nie stwierdzono w zasadzie destrukcji aminokwasów (oznaczanie po hydrolizie kwaśnej) obniżenie ilości uwalnianych aminokwasów z kazeiny ogrzewanej było związane z powstaniem peptydów opornych na działanie stosowanych enzymów proteolitycznych (46). Nasuwa się pytanie czy peptydy te są hydrolizowane w warunkach *in vivo*? Badania nad tym zagadnieniem są w toku a od ich wyniku uzależnione będzie stosowanie proponowanego układu enzymatycznego do hydrolizy białek przetworzonych przemysłowo.

Zastosowanie układów enzymatycznych do badania całkowitego poziomu przyswajalnych aminokwasów rozważane jest w stosunku do izolatów i koncentratów białkowych oraz białek produktów spożywczych takich jak produkty mleczne, mięsne i roślinne.

Zasadniczym problemem jest umożliwienie enzymom dostępu do białek, które najczęściej są nierozpuszczalne w odczynnikach, stosowanych do hydrolizy. Zwiększenie stosunku enzym: substrat jak 1:10 częściowo tylko rozwiązuje tę sprawę. Prowadzone są również badania nad zastosowaniem endopetydaz grzybowych o szerszym spektrum działania niż pankreatyna czy papaina.

Wydaje się, że kompletna hydroliza enzymatyczna pozwoliłaby najbardziej obiektywnie, ze znanych metod *in vitro* określić całkowity poziom przyswajalnych aminokwasów.

### Podsumowanie

Metody oznaczeń zawartości przyswajalnych aminokwasów w białkach rozwijają się zasadniczo w dwóch kierunkach.

Zadaniem pierwszego jest szybka ocena zmian w ilości wybranego aminokwasu w białku przetworzonym w stosunku do surowca. Służą do tego metody chemiczne np. metoda Carpentera dla lizyny (8). Mc Cartiego i Sullivana (36) w adaptacji Pieniążek i wsp. (45) dla metioniny a także metody enzymatyczne, polegające na porównaniu ilości aminokwasu, uwolnionego w czasie częściowej hydrolizy enzymatycznej z białka przetworzonego i nieprzetworzonego.

Drugi kierunek zajmuje się opracowaniem i zastosowaniem metod oceny całkowitej ilości przyswajalnych aminokwasów w białku. Są to głównie metody mikrobiologiczne i biologiczne. Te ostatnie mimo, że dają najpełniejszą ocenę są ze względu na czasochłonność i kosztowność stosowane sporadycznie. Dlatego też prowadzone są badania nad możli-

wością zastosowania szybkich metod chemicznych do oznaczeń całkowitej ilości przyswajalnych aminokwasów w białku. Uważa się, że metodą Carpentera można określić całkowity poziom przyswajalnej lizyny w białkach produktów mlecznych, ale dla innych grup produktów metoda wymaga jeszcze dalszych modyfikacji. Użyteczność metod do oznaczeń całkowitej ilości przyswajalnej metioniny i cysteiny jest w trakcie badania (p. metody chemiczne).

Należy nadmienić, że za pomocą metod biologicznych, mikrobiologicznych czy chemicznych oznaczany jest poziom wybranego aminokwasu i na jego podstawie określa się jakość białka. Ponieważ wiadomo, że o tym decyduje nie tylko ilość np. przyswajalnej lizyny czy metioniny, ale zawartość innych, egzogennych aminokwasów dla organizmu, rozwijany jest jeszcze jeden kierunek, który zajmuje się opracowaniem metod do oznaczeń możliwie największej ilości przyswajalnych aminokwasów w białku. Szczególną uwagę poświęca się kompletnej hydrolizie enzymatycznej białka w warunkach *in vitro*. Obecnie uważa się, że metoda ta pozwoliłaby najbardziej obiektywnie ocenić poziom wszystkich przyswajalnych aminokwasów w białku.

#### LITERATURA

1. Autret M., Perisse J., Sizaret F., Cresta M.: Nutr. Newsletter 6, 1, 1968.
2. Bender A.E.: Evaluation of Novel Proteins Products. Proceedings of IBP, s. 319, 1968.
3. Bergen W.G., Purser D.B.: J. Nutr. 95, 333, 1968.
4. Bjarnason J., Carpenter K.J.: Br. J. Nutr. 24, 313, 1970.
5. Bjorn O., Eggum B.O.: Proteins in Human Nutrition, ed. Porter J. W. G. and Rolls B. A., Ac. Press London and New York, 317, 1973.
6. Block R.J., Mitchell H.H.: Nutr. Abst. Revs. 16, 249, 1947.
7. Buraczewski S., Porter J.W.G., Westgarth D.R., Williams A.P.: Proc. Nutr. Soc. 26, viii-ix, 1967.
8. Carpenter K.J.: Biochem. J. 77, 604, 1960.
9. Carpenter K.J.: Protein in Human Nutrition. Acad. Press London and New York, ed. Porter J. W. G. and Rolls B. A., s. 343, 1973.
10. Carpenter K.J., Bjarnason I.: Evaluation of Novel Protein Products. Proceedings of IBP Werner-Gren Center, Symposium held in Stockholm, s. 161, September 1968.
11. Carpenter K.J., Booth V.H.: Nutr. Abst. Revs. 43, 424, 1973.
12. Carpenter K.J., Lea C.H., Parr L.J.: Br. J. Nutr. 17, 151, 1963.
13. De Muelenaere H.J.H., Chen M.L., Harper A.E.: J. Arg. Fd. Chem. 15, 310, 1967.
14. Dvorak Z.: J. Sci. Fd. Agric. 19, 77, 1968.
15. Dvorak Z.: Metodical Conference of Food Analysis, part I — Protein, Slesin



16. Ellinger G.M., Palmer R.: Proc. Nutr. Soc. 28, 42 A, 1969.
17. Erbersdobler H., Gunsser I., Weber G.: Zentbl. Vet. Med. A 17, 573, 1970.
18. Erbersdobler H., Weber G., Gunsser I.: Z. Tierphysiol. Tierernahr. Futtermittelk. 29, 325, 1972.
19. Evans R.J., Butts H.A.: J. Biol. Chem. 178, 543, 1949.
20. FAO/WHO Expert Group: Protein Requirements, Publ. No 301, 1965.
21. Ford J.E.: Br. J. Nutr. 16, 409, 1962.
22. Ford J.E.: Br. J. Nutr. 18, 449, 1964.
23. Ford J.E., Salter D.N.: Br. J. Nutr. 20, 843, 1966.
24. Ford J.E., Shorrocks C.: Br. J. Nutr. 26, 311, 1971.
25. Hill R., Schmidt W.R.: J. Biol. Chem. 237, 389, 1962.
26. Horn M.J.: J. Arg. Fd. Chem. 16, 741, 1968.
27. Kuiken K.A.: J. Nutr. 46, 13, 1952.
28. Kuiken K.A., Lyman C.M.: J. Nutr. 36, 359, 1948.
29. Lea C.H., Parr L.J., Carpenter K.J.: J. Nutr. 14, 91, 1960.
30. Lea C.H., Parr L.J., Estrangel J.L., Carpenter K.J.: Br. J. Nutr. 20, 123, 1966.
31. Levenson S.M., Rosen H., Upjohn H.K.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 101, 178, 1959.
32. Linkswiler H., Fox H.M., Fry P.C.: J. Nutr. 72, 389, 1969.
33. Maillard L.C.: Compt. Rend. 154, 66, 1912.
34. Margoliash E., Kimmer R.J., Hill R.: J. Biol. Chem. 237, 250, 1962.
35. Mauron J.: Nesle Research News, s. 50, 1971.
36. McCarthy T.E., Sullivan M.K.: J. Biol. Chem. 141, 871, 1941.
37. Miller E.L., Carpenter K.J., Morgan C.B., Boyne A.W.: Br. J. Nutr. 19, 249, 1965.
38. Miller D.S., Samuel P.: Proc. Nutr. Soc. 27, 21, A, 1968.
39. Narayana Rao M., McLaughlan J.M.: J.A.O.A.C. 50, 704, 1967.
40. Narayana Rao M., Sreenivas M., Carpenter K.J., Morgan C.B.: J. Sci. Fd. Agric. 14, 544, 1963.
41. Nasset E.S., Ganapathy S.N., Goldsmitd D.P.: J. Nutr. 81, 343.
42. Nesheim M.C., Carpenter K.J.: Br. J. Nutr. 21, 399, 1967.
43. Njaa L.R.: Suppl. Ins. J. 2/4, 2, 1966/1967.
44. Pieniążek D.: Praca doktorska. Biblioteka Inst. Biologii Stosowanej A.R., Kraków, 1974.
45. Pieniążek D., Grabarek Z., Rakowska M.: Nutr. Metabol. 18, 16, 1975.
46. Pieniążek D., Rakowska M., Kunachowicz H.: Br. J. Nutr. 34, 163, 1975.
47. Pieniążek D., Rakowska M., Szkiłładź W., Grabarek Z.: Br. J. Nutr. 34, 175, 1975.
48. Pion R.: Proteins in Human Nutrition, ed. Porter J. W. G. and Rolls B. A., Ac. Press London and New York s. 329. 1973.
49. Pion R., Fauconneau G., Rerat A.: Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 4, 383, 1964.
50. Pongpaew P., Guggenheim K.: Nutrition Dieta 10, 297, 1954.
51. Prończuk A., Pawłowska D., Bartnik J.: Nutr. Metabol. 15, 171, 1973.
52. Raczyński G.: Post. Nauk Roln. 6, 127, 1972.
53. Rakowska M., Szkiłładź W., Pieniążek D.: Roczn. PZH XXVI, 39, 1975.



54. Report of Joint FAO/WHO ad Hoc Expert Committee Rome, 1971. Energy and Protein Requirements, Rome 1973.
55. Schweigert B.S., Guthneck B.T.: J. Nutr. 49, 277, 1953.
56. Schweigert B.S., Guthneck B.T.: J. Nutr. 54, 333, 1954.
57. Shorrock C., Ford J.E.: Proteins in Human Nutrition, ed. Porter J. W. G. and Rolls B. A., Ac. Press London and New York s. 207. 1973.
58. Skibińska T., Kakowska-Lipińska I.: Roczn. PZH XXI, 303, 1970.
59. Smith R.E., Scott H.M.: J. Nutr. 86, 31, 1965.
60. Smith R.E., Scott H.M.: J. Nutr. 86, 45, 1965.
61. Watts J.H., Booker L.K., McAfee J.N., Graham D.C.W., Jones Jr. F.: J. Nutr. 67, 497, 1959.
62. Watts J.H., Booker L.K., McAfee J.N., Williams E.G., Wright W.G., Jones Jr. F.: J. Nutr. 67, 483, 1959.
63. Wilkes S.H., Bayliss M.E., Preskott J.: Eur. J. Bioch. 34, 459, 1973.