

## WPŁYW HYDROLIZY KWAŚNEJ I ENZYMATYCZNEJ NA WYNIKI OZNACZEŃ TIAMINY W KONSERWACH RYBNYCH

J. WIERZCHOWSKI, Z. GANOWIAK

Katedra Bromatologii Wydziału Farmaceutycznego, Akademia Medyczna, Gdańsk

Przeprowadzone badania nad oznaczaniem tiaminy w krajowych konserwach rybnych wykazały zależność otrzymanych wyników od rodzaju stosowanej hydrolizy. Istnieją duże różnice poglądów na sposób przeprowadzenia hydrolizy materiału biologicznego przy oznaczaniu tiaminy.

Dla określenia zawartości tiaminy całkowitej niezbędne jest poddanie badanej próby hydrolizie enzymatycznej. Hydrolizą kwaśną doprowadza się do uzyskania w hydrolizacie jedynie tzw. tiaminy wolnej. Na potrzebę wykorzystania hydrolizy enzymatycznej pierwszy zwrócił uwagę Lohman (3) przy badaniu dwufosfotiaminy, koenzymu karboksylazy.

Dotąd nie przeprowadzano oznaczenia zawartości tiaminy w krajowych konserwach rybnych. Temat ten podjęła Katedra Bromatologii Akademii Medycznej w Gdańsku. W badaniach własnych zwrócono między innymi uwagę na opracowanie metody hydrolizy konserw rybnych. Uzyskane wyniki sprawdzano zarówno metodą tiochromową jak i mikrobiologiczną. Tematem niniejszego doniesienia są badania nad wpływem hydrolizy kwaśnej i enzymatycznej na wyniki oznaczeń tiaminy w konserwach rybnych przy zastosowaniu metody mikrobiologicznej. Przyjęto klasyczną metodykę mikrobiologicznego oznaczania tiaminy Saretta i Chelidelina (4) przy użyciu szczepu *Lactobacillus fermenti* 36 (ATCC nr 9338).

Po homogenizacji treść konserwy w ilości 1,0 g poddawano hydrolizie kwaśnej dodając 0,1 n  $H_2SO_4$  w ilości 25 ml.

Hydrolizę przeprowadzano w autoklawie w temp.  $120^\circ C$  przez okres 20 minut. Po ochłodzeniu doprowadzano hydrolizaty do pH 4,5 roztworem 2,5 M octanu sodu wobec wskaźnika zieleni bromokrezolowej.

Mimo rozbieżnych danych dotyczących stosowania kwasu (mrówkowy, solny, siarkowy) jak i jego stężenia (6 N, 2 N, 1 N, 0,1 N) i czasu działania, sposobem podanym powyżej uzyskiwano optymalne wyniki ozna-

czeń tiaminy wolnej. Należy podkreślić, że użycie silniejszego kwasu siarkowego w zmienionej proporcji (1 : 10) powodowało pewne zbrunatnienie hydrolizatów, które utrudniało następnie dalszy tok analizy.

W hydrolizie enzymatycznej istnieje duża dowolność stosowanych preparatów enzymatycznych. Wypróbowano różnorodne zestawy dla wypracowania metody. Początkowo stosowano układ papaina-takadiastaza zalecany szeroko w hydrolizie enzymatycznej środków spożywczych (2, 5). Następnie porównano wyniki uzyskane z hydrolizy papainą i diastazą. Uzyskane wyniki nie wykazywały znacznych różnic. Zastępując połowę użytej papainy pepsyną przy zachowaniu diastazy zauważono specyficzną wybiórczość pepsyny w odniesieniu do trawienia substratów pochodzenia rybnego.

W związku z tym w dalszych badaniach używano mieszaniny pepsyny i diastazy. Hydrolizę enzymatyczną przeprowadzano w termostacie w temp. 37° C przez okres 17 godz.

Na 1 g naważki użyto po 20 mg pepsyny i 20 mg diastazy.

Po unieczynnieniu enzymów na łaźni wodnej w temp. 100° C przez okres 10 minut, hydrolizaty sączono przez bibułę Whatmana nr 1. Otrzymany w ten sposób przesącz mógł być użyty zarówno do oznaczeń fizyko-chemicznych jak i mikrobiologicznych.

Załączona tabela przedstawia wyniki oznaczeń tiaminy uzyskane metodą mikrobiologiczną, różnymi zestawami hydrolizy enzymatycznej w konserwie rybnej „Dorsz w sosie pomidorowym”.

Tabela 1

## Wpływ hydrolizy na zawartość tiaminy.

Konserwa: „Dorsz w sosie pomidorowym” (mcg tiaminy w 100 g konserwy)

Seria oznaczeń	Rodzaj hydrolizy	KOD	Ilość konserw	Oznaczenia kolejne							X
				1	2	3	4	5	6	7	
A	0,1 n H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> papaina + takadiastaza	IV 6. 12. 61 15	2	7,20	8,10	6,22	6,02	7,25	6,10	7,20	6,87
B	0,1 n H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> papaina + diastaza	IV 6. 12. 61 15	2	6,57	7,02	7,12	7,05	6,81	5,73	6,12	6,63
C	0,1 n H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pepsyna + papaina + + diastaza	IV 6. 12. 61 15	2	11,00	11,72	10,96	10,92	10,74	10,36	9,92	10,82
D	0,1 n H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pepsyna + diastaza	IV 6. 12. 61 15	2	11,62	11,70	12,05	11,03	11,21	11,12	10,16	11,27

Próby pobrane z jednej zhomogenizowanej konserwy poddane trawieniu pepsyną wykazały około 11 mcg % tiaminy podczas gdy z prób hydrolizowanych papainą uzyskano 6,6 mcg %.

Występująca tutaj różnica sięga ca 40%. Na celowość stosowania pepsyny w hydrolizie materiału pochodzenia zwierzęcego zwraca również uwagę Barton-Wright (1).

Przeprowadzone badania i uzyskane wyniki potwierdzają zasadnicze znaczenie procesu hydrolitycznego, a szczególnie wpływu hydrolizy enzymatycznej z użyciem pepsyny na wynik oznaczenia.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Barton - Wright E. C.: The Microbiological Assay of the Vitamin B-complex and Amino-acids, Pitman, London 1952.
2. Harris L., Wang I.: The Bioch. Journal. **25**, 1068, 1941.
3. Lohman K.: Naturwiss., **25**, 26, 1937.
4. Sarett H. P., Cheldelin V. H.: J. Biol. Chem., **155**, 153, 1944.
5. Wierzchowski J.: Lekarz Wojskowy, **25**, 259, Edinburgh, 1944.