

PRILOG METODI ODREĐIVANJA TRIPTOFANA U PŠENICI

Poznato je da je triptofan esencijelna amino kiselina, a to znači da je čovječji i životinjski organizmi ne mogu sami sintetizirati. (1).

Među ostalim amino kiselinama proteina pšeničnog zrna nalazi se i triptofan.

Iako postoji razlika s prehrambenog stanovišta u biološkoj vrijednosti proteina animalnog i vegetabilnog porijekla, to u prehrani stanovništva nedovoljno razvijenih zemalja, kod kojih se preko 60% ukupno primljenih kalorija podmiruje preko žitarica, – triptofan iz žitarica igra neobično veliku važnost.

Sadržaj triptofana – kako u pojedinim proteinima zrna, tako i u pojedinim dijelovima zrna – znatno se razlikuje. (2).

Količine triptofana u ukupnim proteinima zrna iznose 0,8–1,3%, računato na cjelokupni dušik. (3).

Minimalne potrebe u triptofanu iznose za odrasle osobe 0,25 g, pod uvjetom da su u prehrani uključene i sve ostale potrebne amino kiseline. (4).

Budući da za analitičko određivanje triptofana postoji u stručnoj literaturi relativno mnogo podataka, to ovdje izostavljamo daljnju diskusiju. (5, 6, 7).

U našem radu primijenili smo modificiranu Bates-ovu metodu (5).

Princip metode sastoji se u slijedećem:

Odmašteni uzorak brašna iz punog zrna podvrgne se hidrolizi sa NaOH kod 50° C 12 sati.

Pomoću metilnog alkohola uklone se »balastne tvari«, te se u alikvotnom dijelu određuje triptofan pomoću dimetilaminobenzaldehida. Nastali kondenzacioni produkt pokazuje plavo obojenje, kojeg je intenzitet proporcionalan s konc. triptofana. Mjerenje se vrši kolorimetrijski kod 5250 Å.

EKSPERIMENTALNI RAD

POTREBNE REAGENCIJE

1. 1,75% otopina želatine u 0,1% NaOH
2. 2,5% otopina p-dimetilaminobenzaldehida u 10% H₂SO₄
3. 0,2% otopina NaOH
4. 50% etanol
5. Metanol
6. HCl konc. (sp. t. 1,85)
7. 2% otopina NaNO₃
8. Standardna otopina triptofana: pripremi se otapanjem 20 mg triptofana u smjesi jednakih dijelova 0,2% otopine natrijeve lužine i metilnog alkohola, te nadopuni do 100 ml istom smjesom.

RADNI PROPIS

0,5 g ± 0,0001, prethodno osušenog i sa eterom ekstrahiranog materijala, odvagane se u Erlenmajerovu tikvicu od 50 ml i doda se

12,5 ml 0,2% natrijeve lužine i dobro promiješa. Erlenmajerice se dobro zatvore i drže 12 sati u termostatu na 50° C.

Poslije toga se ohladi i doda

12,5 ml metilnog alkohola, dobro se izmiješa i filtrira. Za određivanje triptofana uzima se

5–10 ml filtrata (tj. 10–20 mg proteina) u Erlenmajer tikvicu od 300 ml, te ispari na vodenoj kupelji do suha. U ohlađenu tikvicu doda se

2 ml rastvora želatine u natrijevoj lužini, zatvori i zagrije u termostatu na 50° C oko 10 minuta. U ohlađenu probu doda se

2 ml otopine želatine u natrijevoj lužini, zatvori i zagrije u termostatu na 50° C oko 10 minuta, a zatim ohladi i doda

0,5 ml rastvora p-dimetilaminobenzaldehida, izmiješa te doda 0,2 ml rastvora natrijevog nitrata i

28 ml koncentrirane solne kiseline.

Ovako priređene probe ostave se da stoje na sobnoj temperaturi 30 minuta a u tom se vremenu potpuno razvije boja. Nakon toga se doda još 70 ml etilnog alkohola, dobro izmiješa i izmjeri apsorpcija u elektrofotometru po Fischeru sa filtrom 5250 Å.

Istovremeno se izvrši i slijepi pokus s istim količinama reagensija prema istom propisu, samo bez triptofana.

UCRTAVANJE STANDARDNE KRIVULJE

Od standardne otopine triptofana odmjeri se 0, 5, 1, 0, 1, 5, 2, 0 ml u Erlenmajer tikvice od 300 ml i tečnost se ispari do suha na vodenoj kupelji. Dalje se triptofan određuje na isti način kao što je već opisano kod određivanja triptofana u uzorcima. Dobivene vrijednosti ekstinkcije unose se na uobičajeni način u koordinatni sistem, tj. na ordinatu vrijednosti ekstinkcije, a na apscisu koncentracije triptofana. U nastojanju da se skрати vrijeme analitičkog određivanja, i time dobije metoda koja bi se uspješnije mogla koristiti za rutinska određivanja, pokušali smo hidrolizu vršiti u autoklavu 20 minuta kod 121° C. Tim postupkom skratili smo vrijeme hidrolize od 12 h na 20 minuta.

Rezultati ispitivanja jednog i drugog postupka prikazani su u odgovarajućoj tabeli (tablica br. 1). Pored analize triptofana određivali smo vodu i količinu dušika u istim pšenicama. Vodu smo određivali sušenjem u termostatu kod 130° C 1 sat.

Dušik smo određivali mikro metodom po Kjeldahlu, a kao faktor za proračunavanje N u bjelančevine uzet je 6,25. Rezultati su prikazani u tablici broj 2.

Tabela br. 1.

KOLIČINA TRIPTOFANA U UZORCIMA PŠENICE, ODREĐENA PO DVIJE METODE HIDROLIZE PROTEINA REZULTATI RAČUNATI U %, OBZIROM NA SUHU TVAR

Vrsta pšenice	Hidroliza proteina vršena			
	720 minuta kod 50°C		20 minuta u autoklavu	
	Triptofan %		Triptofan %	
Funo	0,13	0,13	0,13	0,13
Funo*	0,10	0,11	0,11	0,11
R-16	0,13	0,13	0,12	0,12
R-37	0,12	0,12	0,12	0,12
R-37*	0,10	0,10	0,10	0,10
Autonomia	0,10	0,11	0,11	0,11
Autonomia*	0,11	0,11	0,11	0,10
Impeto	0,13	0,13	0,12	0,13
Impeto*	0,11	0,12	0,11	0,12
S. Pastore	0,11	0,11	0,10	0,11
S. Pastore*	0,10	0,10	0,11	0,11
S. Giorgio	0,13	0,13	0,13	0,12
Mara	0,13	0,13	0,12	0,13
S. Luca	0,14	0,14	0,14	0,14
Fortunato	0,10	0,10	0,10	0,10
Abbondanza	0,12	0,12	0,12	0,12

* Pšenice od Zavoda za ratarstvo Zagreb-Botinec
Ostali uzorci sa Poljoprivrednog dobra »Maksimir«

Tabela br. 2.
KOLIČINA DUŠIKA U UZORCIMA PŠENICE
REZULTATI RAČUNATI U %, OBZIROM NA SUHU
TVAR

Vrsta pšenice	Količina vode u %	Dušik %			Proteini u filtratu %
		u pšeniči	u odmašćenom uzorku	u filtratu nakon hidrolize	
Funo I	12,17	2,08	1,81	1,80	11,25
Funo*	12,27	1,88	1,64	1,58	9,88
R-16	12,40	2,50	2,10	2,06	12,88
R-37	13,00	1,92	1,59	1,58	9,75
R-37*	12,17	1,97	1,65	1,61	10,63
S. Giorgio	13,83	2,52	2,09	2,05	12,81
Mara	13,13	2,27	1,90	1,88	11,75
Autonomia	13,62	1,96	1,63	1,59	9,94
Autonomia*	12,06	2,19	1,85	1,84	11,50
Impeto	12,79	2,36	1,99	1,97	12,31
Impeto*	12,29	2,05	1,71	1,69	10,56
S. Pastore	13,60	2,19	1,83	1,79	11,19
S. Pastore*	12,31	1,86	1,54	1,52	9,45
S. Luca	13,43	2,16	1,81	1,78	11,13
Fortunato	13,39	1,99	1,65	1,64	10,25
Abbondanza	12,75	2,19	1,83	1,82	11,38

* Pšenice od Zavoda za ratarstvo Zagreb-Botince
Ostali uzorci sa Poljoprivrednog dobra »Maksimir«

DISKUSIJA REZULTATA

Standardnu krivulju primijenjene kolorimetrijske metode pokazuje potpuno zadovoljavajuću linearnu ovisnost danih koncentracija triptofana o ekstinkciji, što znači da za dani raspon koncentracija vrijedi Lambert-Beer-ov zakon.

Iz rezultata tabele broj 2. vidimo da su u filtratu, nakon hidrolize, bili obuhvaćeni praktički svi dušikovi spojevi iz uzoraka odmaštenih pšenica.

Rezultati sadržaja triptofana, prikazani u tabeli broj 1. očitani su direktno iz standardne krivulje, prema uobičajenoj praksi kolorimetrijskih analitičkih postupaka.

U daljnjoj interpretaciji rezultata trebamo uočiti sljedeće:

1. Svaka pojedina vrst pšenice analizirana je u dva posebna uzorka.

2. Obzirom na uslove hidrolize proteina, za svaku pojedinu vrst pšenice primijenjena su dva različita postupka.

3. Pojedine pšenice potjecale su iz dva različita izvora. Interesantno je pogledati u svjetlu gore iznesenih činjenica dobivene razlike rezultata sadržaja triptofana.

Tako raspon rezultata u paralelnim uzorcima istih vrsta pšenice iznosio je: u 8 uzoraka 0,01%, dok u 24 uzorka uopće nije bilo nikakve praktičke razlike.

Raspon rezultata zbog različitih uslova hidrolize proteina iznosio je: u 11 određivanja 0,01%, a u 21 određivanju nije bilo nikakve praktičke razlike.

Raspon rezultata zbog različitih izvora istovrsnih pšenica iznosio je: kod vrsti Funo 0,03%
kod vrsti R-37 0,02%
kod Autonomia 0,01%
kod Impeto 0,02%
kod S. Pastore 0,01%

Najveći postignuti raspon u rezultatima tablice br. 1. iznosio je 0,04% triptofana.

Uzimajući u obzir činjenicu da skala optičkih gustoća Fischer-ova elektrofotometra omogućuje potpunu tačnost očitovanja na 0,5 jedinica, što praktički znači da se treća znamenka određuje ocjenjivanjem, interesantno je ustanoviti u našem konkretnom slučaju kako se vrijednosti ekstinkcije ispod 0,5 jedinica odražavaju na koncentraciju triptofana.

Tako iz baždarnog dijagrama u intervalu ekstinkcije od 10,0 do 20,0 jedinica skale dobivamo vrijednosti:

kod 10,1 jedinice skale	0,100%	triptofana
kod 10,2 jedinice skale	0,106%	"
kod 10,3 jedinice skale	0,112%	"
kod 10,4 jedinice skale	0,120%	"
kod 10,5 jedinice skale	0,130%	"

Na osnovu iznesenog, smatramo da ne bi imalo smisla primijeniti postupke statističke analize za utvrđivanje signifikantnosti razlika dobivenih eksperimentalnih rezultata, jer izgleda da bi se mogle sve razlike do 0,03% triptofana pripisati slučajnim greškama.

Činjenica da nismo u okviru ovog ispitivanja ustanovili znatne razlike u sadržaju triptofana ispitivanih talijanskih sorti pšenica ne omogućuju nam stvaranje zaključaka da razlike i ne postoje u pojedinim sortama talijanskih pšenica.

Dobiveni rezultati ovog rada pokazuju da se primijenjena metoda hidrolize proteina po iznesenom postupku može uspješno primijeniti, te na taj način skratiti analitički postupak hidrolize od 12 sati na 20 minuta, a da se kod toga postignu praktički isti rezultati.

ZAKLJUČCI

1. U iznesenom radu primijenjena je kemijska metoda određivanja triptofana po postupku R. W. Batesa, modificirana po S. Šibaliću i N. Radej, u nekim uzorcima talijanskih sorti pšenica.

2. Autori ovog članka, u nastojanju da skrate postupak analitičkog određivanja, izvršili su hidrolizu proteina u autoklavu kod 121° C, umjesto kod 50° C, te su time skratili postupak od 12 sati na 20 minuta.

3. Hidrolizat proteina ispitivanih uzoraka pšenice pokazao je indentične rezultate u količini triptofana kada se hidroliza radila kod 50° C 12 sati i kod 121° C u autoklavu 20 minuta.

GRÜNER, FILAJDIĆ

PRILOG METODI ODREĐIVANJA TRIPTOFANA U PŠENICI

Kratki sadržaj rada:

Autori su primijenili kemijsku metodu za određivanje triptofana u nekim uzorcima talijanskih sorti pšenice. Metoda je bazirana na postupku koji je razradio R. W. Bates, a modificirali su ga S. Šibalić i N. Radej. Autori su izvršili daljnju modifikaciju metode time što su hidrolizu proteina vršili u autoklavu kod 121° C, umjesto kod 50° C kako su to radili S. Šibalić i N. Radej. Na taj način skraćen je cjelokupni postupak hidrolize od 12 sati na 20 minuta.

LITERATURA

1. A. Cantarow, B. Schepartz: Biochemistry, II. izdanje, Sanders, str. 350.
2. A. J. Emahov, M. J. Knjaginičev, J. K. Myrry: Biohimiya kulturnih Rasteniji, I. dio, Moskva 1958.
3. D. Grujić, A. F. Damanski: Laboratorijski priručnik, Beograd, 1954, str. 354.
4. G. Secchi, Bollet: Laboratori Chim. Provinc. 10 (1959) 76
5. R. W. Bates: J. Biol. Chem. 119 (1937) 339
6. C. E. Graham, E. P. Smith, S. W. Hier, D. Klein: J. Biol. Chem. 168 (1947) 711.
7. S. Šibalić, N. Radej: Glasnik Higijenskog Instituta, Bgd. 2—4 (1952) 148.

GRÜNER ING. MATILDA, FILAJDIĆ DR ING. MIRKO
INSTITUTE OF FOOD ANALYSIS, FACULTY OF TECHNOLOGY,
ZAGREB

SUMMARY

A CONTRIBUTION TO THE DETERMINATION OF TRYPTOPHAN IN WHEAT FLOUR

The authors have worked out the chemical determination of the tryptophan in some of Italian wheat flour. The procedure have been described in detail by R. W. Bates, and some newer modifications have been reported by S. Šibalić and N. Radej. The authors have introduced further modification by autoclave's hydrolysing of the proteins at 121° C, instead of 50° C described by S. Šibalić and N. Radej.

By this way the whole procedure of protein's hydrolysing was finished in 20 minutes in comparison to 12 hours, when the procedure is maintained by 50° C.

The same results of the tryptophan have been obtained by the both procedures of hydrolysis.