

Die Nahrung	17	4	1973	415-417
-------------	----	---	------	---------

Aus dem Institut für Pflanzenernährung der Technischen Universität München-Weihenstephan
(Direktor: Professor Dr. A. AMBERGER)

Zur Bestimmung der freien Aminosäuren in Kartoffelknollen und anderem Pflanzenmaterial

K. SCHALLER und A. WÜNSCH

Freie Aminosäuren, Bestimmung
Kartoffeln

Eine einfach durchführbare Extraktion freier Aminosäuren aus pflanzlichem Material und die quantitative Bestimmung der einzelnen Aminosäuren wird vorgestellt. Die Brauchbarkeit des verkürzten Verfahrens wird verglichen mit Ergebnissen einer langwierigen aber vollständigen Extraktionsmethode.

Den löslichen Aminosäuren kommt in der Kartoffeltechnologie eine besondere Bedeutung zu für die Herstellung von gerösteten Produkten wie Chips, Sticks, Pommes frites usw., da sie mit den freien Zuckern bei Ablauf der „MAILLARD-Reaktion“ braun gefärbte Substanzen bzw. allein beim STRECKERSchen Abbau flüchtige, geruchswirksame Aldehyde liefern.

Im Pflanzenmaterial (Stengel, Blätter und Früchte) kann der Anteil an freien Aminosäuren am Gesamt-N-Gehalt oder das Verhältnis zum Reinprotein Aufschlüsse über den Ernährungszustand oder den Reifegrad der Pflanze liefern. Fragen, die also auch bei der technologischen Verarbeitung landwirtschaftlicher Produkte eine große Rolle spielen.

Nach zahlreichen Untersuchungen [1-6] werden unseres Erachtens meist nur halbquantitative Aussagen gewonnen, da die Extraktionsverfahren nicht erschöpfend sind. In vielen Fällen werden nämlich die zerkleinerten Proben nur ein- bis zweimal in siedendem Methanol oder Äthanol extrahiert [7].

Wie jedoch WÜNSCH [8] feststellte, ist eine quantitative Erfassung möglich unter Verwendung von 70%igem Äthanol und elfmaliger Extraktion. Erst dann sind keine ninhydrinpositiven Substanzen mehr nachweisbar.

Da diese Methodik entsprechend dem hohen Arbeitsaufwand für Serienuntersuchungen nur wenig geeignet ist, wurde in unserem Institut folgende Arbeitsweise entwickelt. Sie beruht auf folgenden Arbeitsschritten:

1. Gefriertrocknung des mit flüssigem Stickstoff eingefrorenen Pflanzenmaterials
2. Erhitzen mit Alkohol zur Inaktivierung der Enzyme
3. Wäßrige Extraktion und Klärung (Pikrinsäure)
4. Abtrennung von Pikrinsäure und Chlorophyll durch Ionenaustauscher
5. Bestimmung der Aminosäuren im Aminosäureanalysator

Methode

Im einzelnen wird wie folgt verfahren: 2 g gefriergetrocknetes und fein vermahlene Pflanzenmaterial (z. B. CULATTI-Mühle, JANKE & KUNKEL, Staufen/Br.) wird mit 100 ml 60%igem Äthanol in einem 500 ml Rundkolben am Rückflußkühler erhitzt und 20 min am Sieden gehalten. Danach wird der Alkohol am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit 100 ml Wasser versetzt. Der Rundkolben wird nun zur Extraktion der Aminosäuren in ein Wasserbad von 65 °C gestellt und dort unter gelegentlichem Umschwenken 2 h belassen. — Eine höhere Temperatur ist nicht zu empfehlen, da bei Kartoffelproben sonst die Stärke verkleistert und eine weitere Verarbeitung des Extraktes nur noch schwer möglich ist. — Nach Beendigung dieses Vorganges wird ein Teil des Wassers im Rotationsverdampfer entfernt und der Rest in einen 100-ml-Meßkolben übergespült. Zur Fällung des Eiweißes gibt man je g eingewogener Substanz 25 ml 1,2%ige Pikrinsäure zu [9] und füllt auf ein bestimmtes Volumen auf. Zur beschleunigten Klärung wird bei 12000 U/min zentrifugiert. Einen aliquoten Teil des klaren Extraktes bringt man auf eine Austauschersäule, gefüllt mit DOWEX 1 × 8, 200–400 mesh in der H-Form (Herstellung s. u.), läßt ihn einsickern und eluiert mit 20 ml 0,02 N HCl [9]. Das Eluat kann sofort zur Bestimmung der Aminosäuren im Autoanalyser verwendet werden.

Vorbereitung des Ionenaustauschers: Das Austauscherharz wird 1/2 h in einem Schüttelgerät mit 1N HCl geschüttelt. Danach spült man solange mit Wasser nach, bis es neutral reagiert (Prüfung mit pH-Papier). Als Austauschersäulen verwendet man Carotinröhrchen (Innendurchmesser 8 mm, Höhe 10 cm), die an der Engstelle mit einem kleinen Wattebausch oder Glaswolle verschlossen werden bzw. eine eingeschmolzene Glasfritte besitzen und deren Auslauf mit einem Gummiquetschhahn versehen ist. Das Harz wird in das Säulchen bis zu einer Höhe von 3 cm eingewaschen.

Die Trennung der Aminosäuren erfolgte in unserem Falle in einem Autoanalyser der Firma BIO-CAL, Modell BC 200 nach dem Dreipufferverfahren bei 55 °C. Als Trennharz diente AMINEX A 6 (Fa. BIO-RAD). Sämtliche Bestimmungen wurden doppelt ausgeführt; die Reproduzierbarkeit beträgt ca. 2–3%.

Tabelle 1
Vergleich der erschöpfenden Extraktion nach WÜNSCH
mit neuer Methode (Kartoffelsorte MARITTA; $\mu\text{mol/gTS}$)

Aminosäure	Methode WÜNSCH	Neue Methode
Asp	18,80	17,10
Thr	8,07	8,08
Ser	72,00	72,00
Glu	21,65	19,69
Pro	—	—
Gly	0,74	0,74
Ala	1,68	1,67
Val	2,10	2,10
Met	1,18	1,17
Ileu	1,18	1,18
Leu	0,85	0,84
Tyr	1,80	1,81
Phe	2,89	2,90
γ -AB*	5,85	5,87
Lys	1,18	1,18
His	1,64	1,64
Arg	3,06	4,65

* = γ -Aminobuttersäure

Diese neu entwickelte Methode prüften wir gegen die von WÜNSCH [8] durchgeführte erschöpfende Extraktion mit 70%igem Äthanol (Tab. 1). Nach der neuen Extraktionsmethode erhält man rd. 35% höhere Werte für Arginin und rd. 10% niedrigere Werte für Asparagin- und Glutaminsäure gegenüber der von WÜNSCH angewandten Methode.

Es besteht die Möglichkeit, daß während der zweistündigen wäßrigen Extraktion aus Glutamin- und Asparaginsäure Artefakte [6] gebildet werden, die nicht mehr ninhydrinpositiv reagieren.

Für die höheren Argininwerte kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch keine Erklärung gegeben werden, jedoch konnte in methodischen Versuchen mit Serum-Albumin der Beweis erbracht werden, daß mit dieser neuen Methode keine Hydrolyse von Eiweißkörpern erfolgt.

Diese Methode ist auch für chlorophyllhaltiges Untersuchungsmaterial anwendbar. Das Chlorophyll bleibt während der Elution in den Austauschersäulchen hängen.

Summary

SCHALLER, K. and A. WÜNSCH: On the determination of free amino acids in potato tubers and other plant materials

A simple working extraction procedure of free amino acids from plant material and the quantitative determination of these acids is described. The usefulness of this shortened procedure is compared with a tedious but exhaustive method of extraction.

Резюме

К. Шаллер и А. Вюнш: К вопросу определения свободных аминокислот в картофеле и другом растительном материале

Предложен простой метод экстракции свободных аминокислот из растительного материала и количественного определения отдельных аминокислот. Пригодность краткого метода определения сравнивается с результатами длительной по полной экстракции.

Literatur

- [1] FITZPATRICK, T. J., E. A. TALLEY u. W. L. POTTER, J. Agric. Food Chem. 13, 10—12 (1965).
- [2] FITZPATRICK, T. J., u. W. L. POTTER, Amer. Potato J. 43, 239—247 (1966).
- [3] FURUHOLMEN, A. M., J. D. WINEFORDNER, R. A. DENNISON u. F. W. KNAPP, J. Agric. Food Chem. 12, 112—114 (1964).
- [4] HABIB, A. T., u. H. D. BROWN, Food Technology 10, 332—336 (1956).
- [5] HABIB, A. T., u. H. D. BROWN, Food Technology 11, 85—89 (1957).
- [6] IKAWA, M., u. E. E. SNELL, J. biol. Chem. 236, 1955—1959 (1961).
- [7] STEWARD, F. C., J. F. THOMPSON u. C. E. DENT, Science 110, 439—440 (1949).
- [8] WÜNSCH, A., unveröffentlicht.
- [9] BIO-CAL, Handbuch für den automatischen Aminosäureanalysator BC 200.

Dr. K. SCHALLER u. Dr. A. WÜNSCH, Institut für Pflanzenernährung der Techn. Universität München, 805 Freising-Weißenstephan

Eingegangen 10. 10. 1972