



29. JULI

NR. 500

### **pH-stat metoden til bestemmelse af in vitro protein fordøjelighed**

*Birthe Pedersen og Bjørn O. Eggum*

*Afdelingen for dyrefysiologi, biokemi og analytisk kemi*

En enzymatisk in vitro metode til bestemmelse af proteinfordøjelighed er beskrevet. Ved bestemmelsen inkuberes prøven med proteolytiske enzymer i en pH-stat, hvor pH holdes konstant ved automatisk tilsætning af base. Den tilsatte basemængde under inkuberingsperioden anvendes til beregning af prøvens in vitro protein fordøjelighed. Metoden er hurtig og simpel, inkuberingstiden er kun 10 minutter. Der opnås reproducerbare resultater, og metoden synes at kunne anvendes på et bredt udvalg af proteiner af såvel animalsk som vegetabilsk oprindelse.

#### **Indledning**

Et proteins fordøjelighed er sammen med aminosyresammensætningen bestemmende for den ernæringsmæssige værdi af proteinet; og en hurtig og billig metode til bestemmelse af proteinfordøjelighed er derfor ønskværdig. Anvendbarheden af en hurtig enzymatisk in vitro metode blev indledningsvis undersøgt, og resultaterne af denne undersøgelse er beskrevet i S.H. Meddelelse Nr. 311. Princippet i denne metode er, at prøven inkuberes med en blanding af proteolytiske enzymer; disse vil spalte proteinets peptidbindinger, herved frigøres  $H^+$ , der vil sænke prøvesuspensionens pH, og pH-faldet under inkuberingsperioden anvendes derefter til bestemmelse af prøvens in vitro protein fordøjelighed. For planteproteiner samt blandinger af animalske proteiner og planteproteiner blev der opnået in vitro estimater, der var i god overensstemmelse med resulta-

ter målt i forsøg med rotter. Det var imidlertid umuligt at opnå rimelige estimater for rene animalske proteiner. Det er endvidere klart, at bufferkapaciteten i prøvesuspensionen vil kunne påvirke det målte pH-fald og dermed den bestemte in vitro fordøjelighed. For at afhjælpe disse mangler ved den oprindelige metode blev det forsøgt at udføre bestemmelserne ved et konstant pH, altså i en pH-stat, hvor pH holdes konstant ved en automatisk tilsætning af base. En sådan ændring af proceduren rummer flere indlysende fordele. Den tilsatte basemængde under inkuberingsperioden, der er et direkte udtryk for antallet af spaltede peptidbindinger, anvendes til bestemmelse af in vitro protein fordøjeligheden. Altså jo mere base der tilsættes jo mere fordøjeligt er proteinet. Proteiner af såvel animalsk som vegetabilsk oprindelse samt blandinger blev under-

søgt, og resultaterne blev sammenlignet med sand proteinfordøjelighed bestemt i forsøg med rotter. pH-stat proceduren blev optimeret, og en regressionsligning til beregning af in vitro protein fordøjelighed blev etableret ved hjælp af prøver med kendt fordøjelighed. Metoden, der er beskrevet nedenfor, er udviklet i et samarbejde med Afdelingen for biokemi og ernæring, DTH; rotteforsøgene er udført på Afdelingen for dyrefysiologi, biokemi og analytisk kemi, S.H. med afdelingens sædvanlige metodik.

#### pH-stat metoden

1. Prøven afvejes (mængde svarende til 10 mg N)
2. 10 ml vand tilsættes
3. Henstand i mindst 1 time højst 24 i køleskab
4. Prøven opvarmes i vandbad 37° og pH indstilles på 8.00 under omrøring, pH skal være konstant over en periode (tid 5–10 min.)
5. Den automatiske titrering tændes, og 1 ml enzymopløsning tilsættes (tid = 0). Prøven henstår under omrøring ved 37°
6. Efter præcis 10 min. (stopur) aflæses den tilsatte basemængde, og analysen stoppes
7. Den sande fordøjelighed beregnes:  
 $SF \% = 76.1 + 47.8 \times B_{10}$ , hvor  $B_{10}$  er den tilsatte basemængde (ml)

Endepunktet ved den automatiske titrering er 7.98. Der titreres med 0.1 N NaOH  
Der anvendes destilleret eller ionbyttet vand

#### Enzymopløsningen

Trypsin (16950 BAEE units/mg, 92%)	14.56 mg
Chymotrypsin (41 units/mg)	45.36 mg
Peptidase (50 units/g)	10.40 mg

i 10 ml vand, pH indstilles over præcis 2 min. til 8.00 ved 37° under omrøring og anbringes straks i isbad. Enzymopløsningen opbevares i isbad og fremstilles frisk hver dag.

#### Bemærkninger til metoden

Enzymerne er fra Sigma. Trypsin T-0134; Chymotrypsin C-4129; Peptidase P-7500.

Enzymerne afvejes efter den deklarerede aktivitet. Enzymopløsningen tilsættes prøvesuspensionen hurtigt f.eks. ved udblæsning af en pipette.

10 ml enzymopløsning fremstilles lettest ved tilsætning af 5 ml vand, forsigtig omrystning og straks efter tilsætning af yderligere 5 ml vand, da enzymerne er »lette« og let flyver op. Ved pH indstillingen, der foretages straks, tilsættes 1 dråbe 0.5 N NaOH plus hvad der måtte være nødvendigt. For at kontrollere aktiviteten i enzymopløsningen analyseres for hver ny enzymopløsning en standardprøve f.eks. Na-kaseinat, hvor  $B_{10}$  vil ligge mellem 0.460 og 0.510 ml.

Prøverne må være formålet til et fint pulver. pH indstillingen i prøverne foretages så volumenændringen bliver mindst mulig ved tilsætning af 0.5–0.1 — 0.005 N NaOH; eventuelt justeres med fortyndet syre, men prøvesuspensionen må ikke blive basisk (pH > 9).

For at opnå reproducerbare resultater er det nødvendigt, at forskriften følges nøje. Foruden de angivne punkter er det naturligvis vigtigt, at titrator og autoburette er indstillet optimalt, så for kraftig overtitrering specielt i begyndelsen af inkuberingsperioden undgås; basetilsætningen må derfor ske tæt ved elektroden, og omrøringen må være så kraftig, at pH ændringen straks registreres korrekt. Omrøringen må på den anden side ikke være så kraftig, at pH målingen påvirkes voldsomt, og luft (CO<sub>2</sub>) hvirvles ned i prøven. Det er altså nødvendigt at styre omrøringen. Dette gælder også under den indledende pH indstilling. Stabile startværdier kan være vanskelige at få i visse typer af prøver f.eks. prøver med store mængder endogene enzymer. I sådanne prøver må pH være rimelig stabil over et par minutter, men pH indstillingen bør ikke tage mere end 20 minutter.

Udstyr: pH-meter, titrator, autoburette, vandbad, magnet omrører + pinde 4 × 10 mm, stopur, bægerglas 25 ml, pipetter 1, 5 og 10 ml.

Kemikalier: enzymer, saltsyre, natriumhydroxyd.

## Resultater og diskussion

Der blev opnået reproducerbare resultater med metoden. Standardafvigelsen på en vitro bestemmelse var på 0.9% i sand fordøjelighed, og generelt var resultaterne opnået med pH-stat metoden i god overensstemmelse med resultaterne fra rotteforsøgene. Ialt blev 30 proteiner undersøgt, heraf var 10 rene animalsk proteiner, 10 var planteproteiner og 10 var blandinger. Korrelationskoefficienten mellem in vivo og in vitro resultaterne var på 0.96, og standardafvigelsen mellem resultater målt in vitro og in vivo var på kun 1.3% i sand fordøjelighed. Med pH-stat proceduren var der ikke længere nogen underestimering af de animalske proteiner, og der blev generelt opnået væsentligt bedre resultater end med de oprindelige metoder.

pH-stat metoden synes altså at kunne opfylde de fleste af de krav, der kan stilles til en in vitro metode. Den er hurtig, billig og simpel; den giver reproducerbare resultater og synes at kunne an-

vendes på et bredt udvalg af proteiner af såvel animalsk som vegetabilsk oprindelse. Men selvom der i det store og hele blev opnået gode resultater med metoden, så vil der findes proteiner (f.eks. æggeproteiner) med fysiske og kemiske egenskaber, der vil forhindre en præcis bestemmelse af protein fordøjelighed med enzymatiske metoder. F.eks. vil proteiner, der indeholder store mængder af proteaseinhibitorer, formodentlig kunne give problemer. Sådanne prøver vil med fordel kunne behandles med pepsin forud for pH-stat bestemmelsen. Dette er yderligere beskrevet i nedenstående artikel, der også indeholder en lang række resultater opnået med metoden.

## Litteratur

Pedersen, B. & Eggum, B. O. (1983): Prediction of protein digestibility by an in vitro enzymatic pH-stat procedure. *Z Tierphysiol Tierernährg u Futtermittelkde* 49: 265-277.

