

JAN ZAŁĘSKI, IRENA TRZEBSKA-JESKE, HENRYKA KURZEPA

OCENA HYDROLIZATÓW BIAŁKOWYCH
NA PODSTAWIE ZAWARTOŚCI W NICH KWASU GLUTAMINOWEGO

Z Zakładu Badania Żywności i PU oraz Zakładu Higieny Żywnienia PZH

WSTĘP

Hydrolizaty białkowe znane są na rynku w formie szeroko rozpowszechnionych przypraw bulionowych i kostek typu „Maggi”. Wchodzą one także w skład szeregu zup w kostkach, odżywek i innych koncentratów spożywczych. Hydrolizaty białkowe charakteryzują się przyjemnym bulionowym smakiem, a o ich wartości przyprawowej decyduje obecność oraz ilościowy udział w mieszaninie kwasu glutaminowego. Aminokwas ten w zobojętnionym hydrolizacie białkowym występuje w postaci soli jednosodowej — glutaminianu sodowego, który jest najistotniejszym składnikiem przypraw bulionowych. Ostatnio coraz szersze staje się użycie samego glutaminianu sodowego w formie dodatku przyprawowego do konserw i białkowych produktów mięsnych, a także sam kwas glutaminowy stosowany jest w lecznictwie. Kwas glutaminowy i glutaminian sodu uzyskiwane są z hydrolizatów białkowych; pozostała część hydrolizatu ma już niewielką wartość przyprawową.

Jakość spożywczych hydrolizatów białkowych nie jest u nas odpowiednio kontrolowana, a w szczególności nie oznacza się w nich zawartości kwasu glutaminowego. Brak jest zarówno norm jakościowych na te produkty, jak i prostej metody oznaczania ilości kwasu glutaminowego. Celem tej pracy było ustalenie wskaźników jakości hydrolizatów spożywczych i wybór takiej metody oznaczania kwasu glutaminowego, która nadawałaby się do stosowania w laboratoriach przemysłowych i kontrolnych.

W tym celu przebadano ponad dwadzieścia próbek białkowych hydrolizatów i produktów pośrednich pobranych w trakcie procesu otrzymywania kwasu glutaminowego. Zawartość kwasu glutaminowego określano jedną metodą mikrobiologiczną oraz kilkoma modyfikacjami metody kolorymetrycznej (1). Przeprowadzono statystyczną ocenę wyników co ułatwiło wybrać odpowiednią modyfikację metody fizyko-chemicznej. W wyniku pracy zaproponowano wskaźniki jakości dla spożywczych hydrolizatów białkowych, pozwalające łatwo odróżnić produkty o pełnej wartości przyprawowej od produktów zubożonych przez odjęcie części zawartego w nich kwasu glutaminowego.

SPOSÓB PRODUKCJI BIAŁKOWYCH HYDROLIZATÓW SPOŻYWCZYCH

Jako surowce do produkcji spożywczych hydrolizatów białkowych używane są obecnie w Polsce: gluten pszenny i kazeina z małymi do-

datkami odpadkowych substancji białkowych, takich jak odtuszczone skwarki słoniny, makuchy, śruty poekstrakcyjne itp.

Produkcja hydrolizatów białkowych jest stosunkowo prosta. Surowiec białkowy poddaje się gotowaniu z kwasem solnym w autoklawach kwasoodpornych, a następnie zobojętnia się hydrolizat dodatkiem sody kalcynowanej lub ługu sodowego. Użycie ługu jest dogodniejsze niż sody kalcynowanej, gdyż unika się w ten sposób pienienia się neutralizowanego hydrolizatu. Wytworzony w reakcji zobojętniania chlorek sodu pozostaje w hydrolizatach, które są zazwyczaj jeszcze więcej dosalane przed oddaniem do obrotu. Zobojętniony hydrolizat poddaje się procesowi leżakowania, kiedy to następuje dojrzewanie hydrolizatu, co wyraża się poprawą bulionowego smaku przypraw. Częściowo już w czasie hydrolizowania i dalej w czasie wielotygodniowego leżakowania wytrącają się z hydrolizatu czarno zabarwione związki huminowe; powstające w wyniku połączenia aminokwasów frakcji tryptofanu z aldehydami i cukrami typu aldozy (tzw. reakcje Maillarda). Są to związki nieprzyswajalne w organizmie ludzkim, dlatego też usuwa się je z neutralizatów na drodze sączenia, co przynosi korzystny efekt odbarwienia „brzeczek”. Efekt ten osiąga się szybciej stosując dodatek węgla aktywnego, który dodaje się zazwyczaj do kwaśnego lub częściowego tylko zobojętnionego — ciepłego jeszcze — hydrolizatu, po czym odsącza się go wraz z osadem związków huminowych.

Odbarwiony hydrolizat dosala się w razie potrzeby i podgęszcza zazwyczaj do gęstości ok. 1,25, po czym pakuje się w drobne opakowania szklane i rozprowadza jako „przyprawę do zup i sosów w płynie”, albo też po silniejszym zagęszczeniu i wysuszeniu, wzbogaca się tłuszczem, aromatyzuje wyciągiem z warzyw i przypraw i formuje w kostki, znane pod tradycyjną nazwą „kostek Maggi”.

SPOSOBY PRODUKCJI KWASU GLUTAMINOWEGO I GLUTAMINIANU SODU

Produkcja kwasu glutaminowego to w pierwszym etapie zwykła hydroliza surowca białkowego. Kwas glutaminowy stanowi ok. 21% s.m. kazeiny i ok. 27% s.m. glutenu, innych produktów białkowych około 17%. Otrzymywanie kwasu glutaminowego z hydrolizatu polega na oddzieleniu go od innych aminokwasów i nieshydrolizowanej części białek. Osiąga się to zazwyczaj dwoma sposobami, przy czym obydwa stosowane są obecnie w kraju. Jedna metoda polega na powolnej krystalizacji kwasu glutaminowego z roztworu wodnego przy pH 3,2 (punkt izoelektryczny), a druga na wydzieleniu chlorowodoru glutaminowego z silnie kwaśnego środowiska.

Przy metodzie pierwszej sklarowany węglem neutralizat podgęszcza się do gęstości powyżej 1,3, po ostudzeniu odsącza od kryształków soli (powstaje tzw. osad solny i nastawia odczyn na pH 3,2.

Wytworzone po kilku (lub kilkunastu) dniach kryształy kwasu glutaminowego odsącza się od tzw. „przyprawy zwrotnej”, przemywa zimną wodą i etanolem. Przy metodzie drugiej hydrolizat (odbarwiany węglem lub nieodbarwiany) silnie zagęszcza się w wyparkach próżniowych bez zobojętnienia, co prowadzi do znacznego podwyższenia koncentracji kwasu solnego. Po ostudzeniu z zagęszczonego kwaśnego hydrolizatu krystaliz-

zuje kwas glutaminowy w postaci chlorowodorku. Osad kryształów chlorowodorku po upływie pewnego czasu oddziela się, odsączając przez tkaninę kwasoodporną od ługu pokryształicznego. Chlorowodorek rozpuszczany jest w wodzie i zobojętniany amoniakiem; krystalizuje glutaminian amonu. Ten zakwasza się do pH 3,2 spożywczym kwasem solnym i pozostawia do wykrystalizowania kwasu glutaminowego, przemianowanego dalej wodą i etanolem. Kwas glutaminowy otrzymany jedną z tych metod, wchodzi do obrotu jako produkt farmaceutyczny, bądź przekształcany jest w glutaminian dodatkiem ługu sodowego.

Produkcja kwasu glutaminowego oparta jest o gluten, kazeinę, odpady galalitowe (masa plastyczna, pochodna kazeiny z formaldehydem, stosowana do produkcji guzików) lub surowce rogowe. Wydajność kwasu glutaminowego w wytwórniach hydrolizatów spożywczych (krystalizacja bezpośrednia) sięga 5% w stosunku do s.m. kazeiny i 7% w stosunku do s.m. glutenu. Wydajność w zakładach produkujących kwas glutaminowy farmaceutyczny (krystalizacja chlorowodorku) dochodzi w przypadku kazeiny do 11% a glutenu — 15%.

Analizując dokładniej procesy produkcyjne spotykamy się z różnymi produktami ubocznymi. W produkcji metodą krystalizacji bezpośredniej otrzymujemy: 1) błoto pofiltracyjne, zawierające związki huminowe, dodany węgiel aktywowany i substancje przezeń pochłonięte; 2) „osad solny”, zawierający głównie sól kuchenną i drobne ilości aminokwasów; 3) „przyprawę zwrotną”, zawierającą do 90% wyjściowej ilości białka, a w tym około połowy wyjściowej ilości kwasu glutaminowego; 4) popłuczyny zawracane do produkcji. W produkcji metodą krystalizacji chlorowodorku otrzymujemy: 1) ewentualne błoto pofiltracyjne; 2) „ług pokryształiczny” (kwaśny, pH ok. 1), zawierający do 85% wyjściowej ilości białka i 3) popłuczyny zawracane do produkcji.

Gdy produkcja prowadzona jest przez krystalizację bezpośrednią, a tak właśnie dzieje się w wytwórniach hydrolizatów spożywczych, przyprawa zwrotna i osad solny kierowane są do produkcji hydrolizatów spożywczych i wchodzi w skład przypraw i kostek. Przyprawy takie zubożone przez odjęcie znacznej części kwasu glutaminowego, mają wybitnie zmniejszoną wartość przyprawową i mogą być zakwalifikowane jako produkty sfalszowane, zubożone w najistotniejszy składnik.

Przy produkcji kwasu glutaminowego do celów farmaceutycznych cała pozostałość po wydzieleniu chlorowodorku, przy obecnie stosowanej technologii, często wylewana jest do kanału. Wtedy ok. 85% surowca białkowego marnuje się bezużytecznie, wybitnie zanieczyszczając wody odpływowe (pH ok. 1).

MATERIAŁ UŻYTY DO BADAŃ

Pobierając materiał do badań starano się dobrać możliwie różnorodne produkty, aby w ten sposób mieć próbki o różnej zawartości kwasu glutaminowego, a jednocześnie po ich zbadaniu uzyskać obraz wartości przyprawowej możliwie licznych półproduktów i produktów. Pobrano próbki przypraw: glutenowej, glutenowej zagęszczonej, glutenowej zwrotnej, kazeinowej, kazeinowej zagęszczonej, kazeinowej zwrotnej, kazeino-

wej z dodatkiem białek odpadkowych, oraz pasty kazeinowej, kostek z pasty kazeinowej zubożonej, ługu pokrystalicznego z kazeiny, osadu solnego, kwasu glutaminowego — produktu technicznego i gotowego. Próbkę zabezpieczono przez zamknięcie w hermetycznych słojach szklanych.

KOLORYMETRYCZNA METODA OZNACZANIA KWASU GLUTAMINOWEGO

Kolorymetryczną metodę oznaczania kwasu glutaminowego zaproponowali *Zamir* i *Lichtenstein* (1). Metoda powstała w oparciu o prace *Olcotta* (2) oraz *Lipmanna* i *Tuttle* (3). *Olcott*, wykorzystując znaną od dawna reakcję przejścia kwasu glutaminowego w formę pierścieniową — kwas pirolidynokarboksylowy, zaproponował określanie ilości kwasu glutaminowego z ubytku azotu aminowego spowodowanego tą przemianą. *Lipmann* i *Tuttle* wprowadzili metodę kolorymetrycznego oznaczania kwasów hydroksamowych w kompleksie barwnym z żelazem trójwartościowym.

Zamir i *Lichtenstein* zastosowali przeprowadzenie kwasu pirolidynokarboksylowego (powstałego z kwasu glutaminowego) w kwas hydroksamowy i pośrednie oznaczenie kolorymetryczne po dodaniu chlorku żelazowego. Klarowany uprzednio węglem hydrolizat białka doprowadzali do pH 3—4 i autoklawowali 4 godz. przy 125°, celem przekształcenia kwasu glutaminowego w pirolidynokarboksylowy. Do autoklawowanego hydrolizatu dodawali o połowę mniejszą objętość 50%-owego roztworu chlorowodoru hydroksylaminy w 2-n NaOH, po czym ogrzewali 15' na łaźni wrzącej. Następnie do 1,5 ml ochłodzonej mieszaniny dodawali 1,5 ml wody i 2,5 ml odczynnika, składającego się z mieszaniny równych objętości: 2,5-n HCl, 15%-owego roztworu kwasu trójchlorooctowego i 5%-owego roztworu FeCl₃ w 0,1-n HCl. Wytworzone purpurowe zabarwienie było natychmiast mierzone na fotokolorymetrze Klett-Summersona przy zastosowaniu zielonego filtra nr 54. Mieszaninę 2,5 ml odczynnika żelazowego i 3 ml wody stosowali jako ślepą próbę.

Metoda ta ma co najmniej trzy słabe strony, co zresztą znalazło już pewien wyraz w piśmiennictwie (4). Po pierwsze wprowadzenie kwasu trójchlorooctowego nie daje założonego przez autorów efektu strącania białek; ponieważ jednak kwas ten w pewnym stopniu wpływa korzystnie na stabilizację barwy wytworzonego kompleksu, można go zachować. Po drugie zwrócona jest zbyt mała uwaga na ścisłość przestrzegania czasu hydroksamowania. Po 15 minutach hydroksamowania proces ten niewątpliwie nie jest ukończony, gdyż nie otrzymuje się maksimum natężenia barwy (zabarwienie pogłębia się w miarę przedłużenia czasu hydroksamowania). Wykazali to *Freimuth* i *Palitzsch* (4), a my potwierdziliśmy. Jednak wtedy gdy stosuje się wzorce kwasu glutaminowego do wykreślenia krzywej standartowej, można zachować identyczny umowny czas hydroksamowania np. 15' i w ten sposób ominąć i tę niedogodność. Pozostaje sprawa trzecia, która według naszych obserwacji i na podstawie otrzymanych w tej pracy wyników powinna ulec modyfikacji. Chodzi tu o sposób przygotowania ślepej próby do oznaczenia kolorymetrycznego.

Autorzy stosowali mieszaninę wody i odczynnika żelazowego, uzasadniając to stwierdzeniem, że „nie powstawało żadne zabarwienie, jeśli

hydrolizaty białkowe o pH 3—4 były poddane hydroksamowaniu, bez uprzedniego autoklawowania". Otóż omawianą reakcję barwną daje nie tylko kwas hydroksamowy powstały na drodze hydroksamowania kwasu pirolidynokarboksyłowego wytworzonego w autoklawie z kwasu glutaminowego. Reakcję tę oraz podobne zabarwienie purpurowe mogą dawać także inne związki, a w szczególności octany, bursztyniany, glutamina, glutation oraz szereg innych peptydów i związków występujących w tkankach (4—8). Spośród wielu możliwych związków przeszkadzających napewno są peptydy, obecne w hydrolizatach białkowych. Dlatego też wydaje się konieczne zmierzenie poziomu związków przeszkadzających, zanim hydrolizat białka podda się zabiegowi autoklawowania. W przeciwnym przypadku otrzymane wyniki będą za wysokie. W naszej pracy zastosowaliśmy w charakterze ślepej próby: raz mieszaninę wody i odczynnika żelazowego i drugi raz — równolegle — wodę zastąpiono hydrolizatem nieautoklawowanym, a poddanym hydroksamowaniu. Wyniki (zebrane w tab. I) uzasadniają celowość takiego postępowania.

PRÓBY MODYFIKACJI METODY KOLORYMETRYCZNEJ

Zdając sobie sprawę z braków omawianej metody, podjęliśmy próby zmierzające do usunięcia związków przeszkadzających. Strącanie z hydrolizatu białkowego nieshydrolizowanej części białek i peptonów próbowano przeprowadzić za pomocą kwasu trójchlorooctowego albo zasadowego octanu ołowiu. Okazało się, że wprowadzenie octanu przed hydroksamowaniem powoduje tworzenie się z nich kwasów hydroksamowych, a następnie barwnych kompleksów o zabarwieniu purpurowym. Dodatek kwasu pikrynowego był bez efektu. Dodatek kwasu fosforowolframowego powodował wytrącenie znacznej ilości osadu, lecz w przesączu nie można było oznaczyć kwasu glutaminowego kolorymetrycznie, gdyż wytrącały się osady przy dodawaniu każdego ze stosowanych w tym oznaczeniu odczynników (chlorowodorku hydroksylaminy i odczynnika żelazowego). Ekstrakcja nadmiaru kwasu fosforowolframowego alkoholem n-butylovym nie dawała dobrych wyników. Następne próby zmierzały do wydzielenia z hydrolizatu białkowego aminokwasów dwukarboksyłowych, aby po wydzieleniu ich oznaczyć kwas glutaminowy kolorymetrycznie w obecności kwasu asparaginowego, jedyne go już towarzyszącego związkowi pochodzenia białkowego.

W tym celu 10 ml zubożonego hydrolizatu białkowego przenoszono do kolby na 100 ml, dodawano 10 ml wody i 5 ml 50%-owego roztworu kwasu fosforowolframowego. Po upływie 1 godz. sączono, kolbę i osad na sączku przemywano trzykrotnie 10%-owym kwasem fosforowolframowym, zbierając popłuczyny razem z przesączem. Do przesączu dodawano fenoloftaleiny i krystalicznego wodorotlenku baru do nasycenia (odczyn wyraźnie alkaliczny). Wytworzony osad oddzielano na sączku 3G4 i przemywano kolbkę i osad 10%-owym $Ba(OH)_2$. Zebrany ilościowo przesącz wraz z popłuczynami wylewano do pięciokrotnej objętości etanolu i zostawiano na noc w lodówce. Krysztaly soli barowych kwasów glutaminowego i asparaginowego zbierano na sączku, przemywano etanolem i rozpuszczano w małej objętości wody. Dodawano kwasu siarkowego i odsączano osad $BaSO_4$. Przesącz wraz z po-

płuczynami zbierano ilościowo do kolbki miarowej, dopełniano i połowę uzyskanego klarownego płynu — po doprowadzeniu ługiem sodowym do pH 3—4 — poddawaniu autoklawowaniu, hydroksamowaniu i badano kolorymetrycznie jak w metodzie pierwotnej. W takim przypadku nie otrzymano żadnego zabarwienia w ślepej próbie nieautoklawowanej a hydroksamowanej. Wyniki zebrano w rubryce 19 tabeli I. W pozostałej części oznaczano azot formolowy wg *Sørensen*a i wyliczano ilość kwasu glutaminowego wg tak zmienionej metody *Olcotta*. Wyniki tych oznaczeń zebrano w rubrykach 9, 10, 11 i 12 tabeli I. Ponieważ próbę pierwotną poddawano tu całemu szeregowi czynności, przeprowadzono równoległe oznaczenia na wzorcach kwasu glutaminowego i próbkach wzbogaconych znanymi ilościami wzorca. Odzyskiwalność wynosiła ok. 80%, dlatego też wyniki podane w rubrykach 9, 10, 11 i 19 przemnożone są przez współczynnik 1,25.

Oprócz opisanej modyfikacji stosowano dwie inne nieznacznie zmodyfikowane metody kolorymetryczne. Jedna metoda pokrywała się z postępowaniem *Zamir* i *Lichtenstein*, z tym tylko, że zastosowano dwie wyżej opisane wersje ślepej próby, a pominięto dodatek węgla do hydrolizatu (wyniki zebrano w rubrykach 13, 14 i 15). Oznaczono i tu równoległe zawartość azotu formolowego i jego ubytek w czasie autoklawowania. Wyniki zebrano w rubrykach 1, 2, 3 i 4 tab. I. W trzecim postępowaniu dodawano węgla aktywowanego w ilości 1 g na 5 ml przyprawy (hydrolizatu). W odrębnych doświadczeniach stwierdzono, że przy pH 2 użycie węgla nie powodowało strat kwasu glutaminowego. 5 ml hydrolizatu mieszano z 20 ml wody, zakwaszono do pH 2, dodawano 1 g węgla, ogrzewano do wrzenia i po upływie pół godziny sączono przez bibułę. Osad przemywano wodą i popłuczyny wraz z przesączem zbierano w kolbie miarowej. W części klarownego płynu oznaczano kolorymetrycznie kwas glutaminowy, stosując obie wersje ślepej próby (wyniki zebrano w rubrykach 16, 17 i 18 tab. I). Drugą część płynu wykorzystano do oznaczenia azotu formolowego oraz kwasu glutaminowego zmodyfikowaną metodą *Olcotta* (wyniki zebrano w rubrykach 5, 6, 7 i 8 tab. I).

Oprócz oznaczeń dokonanych metodami fizyko-chemicznymi we wszystkich próbkach oznaczono zawartość kwasu glutaminowego mikrobiologicznie wg metody *Hendersona* i *Snella* (9) z własnymi modyfikacjami (10), przy zastosowaniu *Lactobacillus arabinosus* 17 — 5 ATCC 8014. Przy sprawdzeniu metody na próbkach wzbogaconych wzorcem uzyskano odzyskiwalność średnio 101%.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wyniki wszystkich oznaczeń zebrano w tabeli I. Oprócz wyników omówionych wyżej oznaczeń kwasu glutaminowego i azotu formolowego, w tabeli I podano także zawartość azotu ogólnego, oznaczoną makrometodą *Kjeldahla*. Ponadto dla łatwiejszej oceny badanych próbek podano stosunek zawartości kwasu glutaminowego (wg rubryki 18) do zawartości azotu formolowego (wg rubryki 5) oraz wyrażono zawartość azotu formolowego w procentach azotu ogólnego.

a) Porównanie metod oznaczania kwasu glutaminowego

Przeprowadzając statystyczną ocenę wyników otrzymanych stosowanymi metodami zwrócono uwagę, czy wyniki otrzymane równoległe dwiema metodami wykazują istotne różnice, czy szeregi wyników uzyskanych różnymi metodami są dobrze skorelowane, a ponadto, zbadano precyzję stosowanych metod. Statystyczną ocenę istotności różnicy przeprowadzono za pomocą testu Studenta dla szeregów prób niejednorodnych, w których wyniki dają się zestawić parami (11 — 14). W tym przypadku liczbę Studenta oblicza się ze wzoru:

$$t = \frac{\bar{d} \cdot \sqrt{N}}{s_{\bar{d}}}$$

w którym \bar{d} jest średnią różnicą wyników; N jest liczbą par wyników; $s_{\bar{d}}$ jest odchyleniem standardowym różnic obliczonym ze wzoru:

$$s_{\bar{d}} = \sqrt{\frac{\sum (d - \bar{d})^2}{N - 1}}$$

Wartości granicznej liczby Studenta szuka się w tym przypadku dla liczby stopni swobody = $N - 1$. Przyjęto w rozważaniach prawdopodobieństwo 0,05, tzn. wyciągano wnioski przy 5% ryzyka błędu.

Z porównania wyników zebranych w rubrykach 1 i 5 tabeli wynika, że nie ma istotnej różnicy w poziomie azotu formolowego oznaczonego bezpośrednio lub po klarowaniu węglem. Wyliczone $t = 1,93$, a wartość graniczna $t = 2,08$.

Podobnie aczkolwiek ze znacznie większym prawdopodobieństwem można stwierdzić, że wyliczona z ubytku azotu formolowego zawartość kwasu glutaminowego nie zmienia się na skutek zabiegu klarowania węglem (porównano rubryki 4 i 8). Wartość t wyliczona = 0,41 co przy wartości granicznej $t = 2,08$ świadczy, że różnica jest nieistotna.

Z porównania wyników zebranych w rubrykach 15 i 18 wynika, że klarowanie hydrolizatu węglem nie wpływa istotnie na wynik oznaczenia kolorymetrycznego kwasu glutaminowego. Znalaziono $t = 0,98$, co jest mniejsze od wartości granicznej $t = 2,08$.

Wyniki metody kolorymetrycznej po klarowaniu węglem (rubryka 18) nie różnią się istotnie od wyników otrzymanych zmodyfikowaną metodą Olcotta (rubryka 8), ani też od wyników otrzymanych metodą mikrobiologiczną (rubryka 21). W pierwszym przypadku wyliczone $t = 0,80$, w drugim przypadku $t = 1,20$; obie te wartości są mniejsze od wartości granicznej.

Natomiast wyniki oznaczeń dokonanych po wydzieleniu aminokwasów dwukarboksyłowych różnią się istotnie od wyników otrzymanych bezpośrednio lub po klarowaniu węglem. Porównanie wyników zebranych w rubrykach 15 i 19 daje wartość liczby Studenta $t = 2,41$, co jest większe od granicznej wartości $t = 2,16$ (przy 13 stopniach swobody). Porównanie wyników zebranych w rubrykach 8 i 12 daje $t = 2,18$, co jest większe od 2,16. Oznacza to, że metodą zmodyfikowaną Olcotta po wydzieleniu aminokwasów dwukarboksyłowych otrzymuje się wyniki istotnie różne od wyników tejże metody, uzyskanych po klarowaniu węglem. Na tej podstawie już w trakcie przeprowadzania pracy za-

Zawartość azotu ogólnego, azotu formolowego i kwasu glutaminowego w hydro

Nr próby	Opis próbki	Jednostki w jakich podano wynik	Azot formolowy bezpośrednio				N formolowy po klarowaniu węglem			
			przed autokl.	po autokl.	ubytek	x 14 = kw. gl.	przed autokl.	po autokl.	ubytek	x 14 = kw. gl.
Nr	rubryki wyników		1	2	3	4	5	6	7	8
1	Przyprawa glutenowa	g/100 ml	2,21	1,83	0,38	5,38	2,09	1,60	0,49	6,86
2	Glutenowa zwrotna	% wag.	3,37	2,73	0,64	8,92	2,82	2,43	0,39	5,46
3	Glutenowa podgęszczona	g/100 ml	4,88	3,96	0,92	12,92	4,16	3,79	0,87	12,18
4	Glutenowa	„	2,05	1,72	0,33	4,65	2,01	1,58	0,43	6,02
5	Kw. glut. z glutenu półpr. % wag.	% wag.	6,41	1,60	4,81	67,40	7,00	1,68	5,32	74,48
6	Kw. glut. z glutenu got. prod.	„	8,01	0,83	7,18	104,64	8,26	0,70	7,56	105,84
7	Glutenowa zwrotna	%/100 ml	2,29	1,62	0,67	9,37	2,05	1,86	0,19	2,66
8	Przyprawa kazeinowa	„	2,53	2,21	0,32	4,48	2,35	2,04	0,31	4,41
9	Kazeinowa niez. wzbogacona	„	2,67	2,31	0,36	5,10	2,53	2,15	0,38	5,29
10	Kazeinowa niez. zubożona	„	2,56	2,23	0,33	4,55	2,62	2,29	0,33	4,55
11	Kazein. z dodat. mak. rzepak.	„	2,09	1,71	0,38	5,38	2,04	1,67	0,37	5,19
12	Kazein. z dodat. skwarek odtł.	„	2,26	1,69	0,57	8,02	1,93	1,56	0,37	5,20
13	Kazeinowa podgęszczona	%/wag.	3,78	2,96	0,82	11,51	3,81	3,21	0,64	9,02
14	Kazeinowa	g/100 ml	2,59	2,09	0,50	6,96	2,41	2,09	0,32	4,41
15	Kazeinowa podgęszczona	„	4,09	3,63	0,45	6,36	4,45	3,80	0,65	9,10
16	Kazeinowa niez. zubożona	„	3,52	3,16	0,36	5,10	3,42	3,07	0,35	4,90
17	Kazeinowa	„	2,32	2,15	0,16	2,30	2,14	1,83	0,31	4,41
18	Kostki z kazeiny zubożonej	%/wag.	2,21	2,04	0,17	2,41	2,09	1,96	0,13	1,76
19	Z glutenu ług pokrystaliczny	g/100 ml	3,24	3,00	0,24	3,32	3,15	2,95	0,20	2,80
20	Z glutenu ług pokrystaliczny	„	2,98	2,90	0,08	1,15	2,81	2,95	0,06	0,88
21	Kazeinowa	„	3,84	3,49	0,35	4,83	3,58	3,26	0,32	4,51
22	Z kazeiny ług pokrystaliczny	„	4,64	4,55	0,09	1,26	4,19	4,12	0,07	0,98

la I

lizatach białkowych oznaczone kilkoma metodami. Średnie wyniki z 3—5 oznaczeń

N formolowy po wydzieleniu aminokwasów dwukarboksyłowych				Kwas glutaminowy kolorymetrycznie bezpośrednio			Kwas glutaminowy kolorymetrycznie po klarowaniu węglem			Kwas glutaminowy kolorimetr. po wyz. am. dwukarboks.	Azot ogólny	Kwas glutaminowy mikrobiologicznie	Stosunek kw. glut. do N form.	Azot form. w %-ach N ogólnego
przed aut.	po aut.	ubytek	x 14 = kw. gl.	po aut.	przed aut.	kw. glut.	po aut.	przed aut.	kw. glut.					
9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
—	—	—	—	7,45	0,90	6,55	7,80	1,35	6,45	—	3,20	6,3	3,08	69,1
0,53	0,28	0,25	3,43	4,16	0,04	4,12	7,20	1,25	5,95	4,80	4,72	6,2	2,11	71,4
0,90	0,27	0,63	8,82	15,25	1,94	13,31	15,55	3,05	12,50	7,42	6,32	14,6	3,00	77,2
0,48	0,13	0,35	4,90	7,30	1,46	5,84	6,95	0,95	6,00	3,92	2,99	5,4	3,00	68,6
4,06	0,42	3,64	50,96	86,47	9,00	77,47	68,00	8,00	60,00	64,00	8,61	58,1	8,57	74,2
7,18	0,49	6,69	93,59	104,57	0,00	104,57	102,00	0,00	102,00	88,00	9,86	102,6	12,35	81,2
0,33	0,14	0,19	2,65	4,81	2,17	2,64	5,25	1,90	3,35	1,44	3,56	3,3	1,63	64,3
0,57	0,29	0,28	4,02	5,54	0,78	4,76	4,65	0,55	4,10	3,25	3,42	4,1	1,74	73,9
0,54	0,27	0,27	3,77	5,50	0,86	4,64	5,87	0,85	5,02	2,88	3,48	5,4	1,98	76,8
0,50	0,22	0,28	3,96	4,96	0,80	4,16	4,30	0,70	3,60	2,75	3,06	4,2	1,37	83,6
0,62	0,28	0,34	4,80	6,60	0,70	4,90	4,35	0,90	3,45	6,00	2,99	5,1	1,69	70,0
0,53	0,25	0,28	3,92	6,40	1,60	4,80	5,40	1,25	4,15	5,68	3,02	5,4	2,15	74,8
1,06	0,47	0,59	8,23	11,00	1,90	9,20	9,90	1,40	8,50	8,76	6,60	9,4	2,20	57,4
0,70	0,35	0,35	4,90	7,50	2,00	5,50	7,20	1,80	5,40	3,36	3,78	5,1	2,24	68,5
0,86	0,74	0,13	1,76	15,10	6,10	9,00	15,05	5,75	9,30	2,80	7,44	7,4	2,09	54,9
—	—	—	—	11,40	6,60	4,80	12,26	6,40	5,43	—	6,39	3,6	1,59	55,1
—	—	—	—	6,60	3,40	3,20	6,10	2,15	3,95	—	3,35	3,4	1,72	66,2
—	—	—	—	7,20	5,60	1,60	6,10	3,50	2,60	—	4,07	1,7	1,08	54,3
—	—	—	—	4,00	2,00	2,00	4,00	1,46	2,54	—	4,20	3,3	0,81	77,1
—	—	—	—	4,70	1,80	2,90	4,60	1,50	3,10	—	4,17	3,5	1,10	71,4
—	—	—	—	10,00	5,00	5,00	6,40	0,45	5,95	—	5,51	5,8	1,66	69,7
—	—	—	—	6,35	2,20	4,15	4,60	0,40	4,20	—	5,94	1,5	1,00	78,1

przestano wykonywania tych oznaczeń, tym bardziej że postępowanie było kłopotliwe i czasochłonne.

Następnie szukano dowodu uzasadniającego potrzebę zmiany sposobu sporządzania ślepej próby w metodzie kolorymetrycznej. Z porównania rubryk 13 z 15 i 16 z 18 okazało się, że są to pary szeregów istotnie różne. Zarówno przy badaniu hydrolizatów nieklarowanych, jak i klarowanych węglem sposób przygotowania ślepej próby wywiera istotny wpływ na wynik. Wartości liczby Studenta otrzymano odpowiednio: $t = 5,25$ i $t = 4,67$, czyli w obu przypadkach znacznie większe od 2,08. Wynika z tego, że zastosowanie wody do ślepej próby, jak to zalecają Zamir i Lichtenstein, zamiast hydrolizatu nieautoklawowanego a hydroksamowanego, jak w naszej pracy — prowadzi do otrzymania błędnych wyników, istotnie wyższych. Dodatek węgla wpływa wprawdzie istotnie na wartość otrzymaną dla ślepej próby (porównanie rubryk 14 i 17 dało $t = 2,24$) nie usuwał jednak w dostatecznym stopniu wszystkich związków przeszkadzających w oznaczeniu kolorymetrycznym.

Na podstawie uzyskanych wyników i powyższego omówienia można uznać, że dobre wyniki daje zarówno metoda kolorymetryczna, jak i mikrobiologiczna. Metoda kolorymetryczna po klarowaniu węglem daje wyniki dobrze skorelowane ($r = +0,955$) z wynikami otrzymanymi kolorymetrycznie bez klarowania, pod warunkiem stosowania odpowiedniej ślepej próby. Wyniki te są także dobrze skorelowane ($r = +0,926$) z wynikami oznaczenia mikrobiologicznego. Są to bardzo wysokie współczynniki korelacji, skoro uwzględni się, że przy prawdopodobieństwie $P = 0,05$ $r = 0,707$ jest graniczną wartością współczynnika korelacji.

Dla określenia precyzji porównywanych metod wykonano każdą z nich po 5 lub 7 oznaczeń zawartości kwasu glutaminowego w tej samej próbce. Obliczono odchylenia standartowe i wyrażono je w procentach średniej arytmetycznej. W ten sposób badając próbki o różnej zawartości kwasu glutaminowego otrzymano po 3 do 5 współczynników zmienności dla każdej metody. W tab. II zebrano średnie wartości współczynników zmienności omawianych metod (oraz wartości graniczne).

Tabela II
Współczynniki zmienności (miara precyzji omawianych metod)

Oznaczenie mikrobiologiczne	Oznaczenie kolorymetryczne		Oznaczenie formolowe	
	bez klarowania	po klarowaniu	bez klarowania	po klarowaniu
4,43 (3,67—5,42)	3,17 (1,25—6,63)	3,91 (3,13—4,96)	3,67 (0,66—7,95)	5,73 (3,84—6,90)

Uwaga: Wartości obliczone zostały wg poniższego wzoru:

$$v = \frac{\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N - 1}}}{\bar{x}} \cdot 100$$

Wynik najniższy odpowiadał próbce zawierającej znaczne ilości kwasu glutaminowego. Przy małych zawartościach kwasu w próbce precyzja metod była gorsza (współczynnik zmienności był wyższy).

Z tab. II można wnioskować, że precyzja metod jest duża; wszystkie metody dają wyniki powtarzalne o niewielkiej dyspersji. Z metod fizykochemicznych oznaczenie kolorymetryczne charakteryzuje się większą precyzją niż oznaczenie formolowe. Klarowanie węglem wbrew przewidywaniom — wpływa ujemnie (w nieznacznym stopniu) na precyzję oznaczeń zarówno w metodzie kolorymetrycznej, jak i w zmodyfikowanej metodzie Olcotta.

b) Ocena wartości przyprawowej hydrolizatów spożywczych

Ocena wartości przyprawowej hydrolizatów spożywczych powinna uwzględniać stopień shydrolizowania białka oraz poziom zawartości kwasu glutaminowego. Niemiarodajnym wskaźnikiem jakości jest gęstość przypraw, ponieważ zależy w znacznym stopniu od zawartości w nich soli kuchennej. Stopień shydrolizowania należy oceniać na podstawie stosunku azotu aminowego („formolowego”) do azotu ogólnego. Spotykane w piśmiennictwie (15) wymaganie, aby połowa azotu była w postaci N formolowego, wydaje się zbyt liberalne. Wyniki tabeli I (rubryka 23) wskazują, że osiągnięcie takiego stopnia shydrolizowania białka, aby $\frac{2}{3}$ azotu ogólnego było w formie azotu formolowego, nie jest trudne. Ten stopień shydrolizowania stwierdzano w naturalnych hydrolizatach. Jedynie w hydrolizatach zagęszczonych, na skutek strat azotu formolowego w wyparce, stosunek ten jest mniejszy. Mniejszy jest także w produktach zubożonych przez odjęcie części kwasu glutaminowego.

Wartość przyprawową najlepiej jest oceniać na podstawie zawartości kwasu glutaminowego. Uchwycenie stosunku zawartości kwasu glutaminowego do zawartości azotu formolowego pozwala wykryć fakt zubożenia przyprawy. W przyprawach glutenowych zawartość kwasu glutaminowego powinna być 2,5 do 3 razy wyższa od zawartości azotu formolowego (nie mniej niż 2,5 raza). W przyprawach kazeinowych zawartość kwasu glutaminowego powinna być od 1,6 do 2,3 raza wyższa od zawartości azotu formolowego (nie mniej niż 1,6 raza). Wyniki zebrane w rubryce 22, tab. I wskazują, że w hydrolizatach glutenowych zubożonych zawartość kwasu glutaminowego jest podobna jak w przyprawach kazeinowych niezubożonych. W przyprawach kazeinowych zubożonych i w produktach odpadkowych z produkcji kwasu glutaminowego zawartość kwasu glutaminowego jest mniej więcej równa zawartości azotu formolowego (0,8 do 1,1 razy tyle).

WNIOSKI

1. Jakość spożywczych hydrolizatów białkowych powinna być znormalizowana. W normie jakościowej należy podać wskaźniki charakteryzujące stopień shydrolizowania białka i wartość przyprawową hydrolizatu. Przy badaniu przypraw bulionowych należy oznaczać w nich azot ogólny, azot formolowy i kwas glutaminowy.

2. W procesie hydrolizy kwasowej przekształcenie $\frac{2}{3}$ azotu ogólnego w azot aminokwasowy (formolowy) jest łatwo osiągalne. Taki stopień shydrolizowania powinien być obowiązujący dla wszystkich przypraw,

jeśli po hydrolizie nie były zagęszczone do konsystencji pasty. W pastach i kostkach co najmniej 50% azotu powinno być w postaci azotu formolowego.

3. Wartość przyprawowa hydrolizatów powinna być mierzona zawartością w nich kwasu glutaminowego (najlepiej wyrażoną w stosunku do azotu formolowego). W hydrolizatach glutenowych charakteryzujących się wysoką wartością przyprawową, zawartość kwasu glutaminowego powinna być 2,5 do 3 razy wyższa od zawartości azotu formolowego. W przypadkach kazeinowych (lub kazeinowych z dodatkiem odpadkowych surowców białkowych) zawartość kwasu glutaminowego powinna być co najmniej 1,6 razy wyższa od zawartości azotu formolowego. Niższe zawartości kwasu glutaminowego w hydrolizatach świadczą o odjęciu części pierwotnie zawartego w nich kwasu glutaminowego. Hydrolizaty takie jako zubożone przez odjęcie najistotniejszego składnika przyprawowego, należy uważać za produkty sfałszowane. Nie powinny być one wprowadzane na rynek w charakterze przypraw.

4. Kwas glutaminowy w hydrolizatach białkowych można oznaczać: a) metodą mikrobiologiczną, b) poprzez wyliczenie jego zawartości z ubytku azotu formolowego po 4 godzinnym autoklawowaniu w temp. 125° przy pH 3—4, c) metodą kolorymetryczną. W oznaczeniu kolorymetrycznym po autoklawowaniu i hydroksamowaniu hydrolizatu, jako ślepa próbę do kolorymetru należy stosować hydrolizat nie autoklawowany a hydroksamowany. Stosowanie wody w charakterze ślepej próby, jak to zalecili *Zamir* i *Lichtenstein*, prowadzi do otrzymania błędnych (zbyt wysokich) wyników. Każda z trzech porównywanych metod jest dostatecznie dokładna; daje wyniki dobrze skorelowane i nie wykazujące istotnych różnic w stosunku do wyników dwóch pozostałych metod.

5. Wydzielanie z hydrolizatów aminokwasów dwukarboksylowych w postaci soli barowych nie powodowało usunięcia związków przeszkadzających w oznaczeniu kolorymetrycznym, dlatego wyniki oznaczeń kwasu glutaminowego były po tym postępowaniu istotnie różne; — niższe od wyników otrzymanych innymi metodami.

6. Zastosowanie węgla aktywowanego do klarowania hydrolizatów przed oznaczeniem formolowym lub przed autoklawowaniem w oznaczeniach kwasu glutaminowego, ułatwia wykonanie oznaczeń, lecz w nieznacznym stopniu wpływa ujemnie na precyzję metod. Po zastosowaniu węgla, jeśli dobierze się odpowiednio odczyn w jakim przeprowadza się klarowanie, nie występują istotne straty zawartości azotu formolowego ani też zawartości kwasu glutaminowego.

Opis postępowania przy oznaczaniu kwasu glutaminowego w hydrolizatach białkowych zmodyfikowaną metodą kolorymetryczną.

A p a r a t u r a, s z k ł o:

Fotokolorymetr Klett-Summersona z filtrem zielonym 54 (ewentualnie Pulfrich, filtr S 47), autoklaw, łaźnia wodna.

Kolby miarowe na 50 ml, pipety biuretowe 2 i 5 ml, probówki, kolby stożkowe, tryskawka z gorącą wodą, saszki bibułowe.

O d c z y n n i k i:

Węgiel aktywowany; chlorowoderek hydroksylaminy rozpuszczony w 2-n NaOH w stosunku 50 g do 100 ml (= odczynnik I, trwały 7 dni); odczynnik FeCl₃ (= odczynnik II) złożony z równych objętości 2,5-n

HCl, 15%owego roztworu kwasu trójchlorooctowego, 5%owego roztworu FeCl_3 w 0,1-n HCl.

Wykonanie oznaczenia:

a) Klaryfikacja węglem. 5 ml przyprawy (hydrolizatu białkowego) przenieść pipetą do kolbki stożkowej na 100 ml. Dodać 20 ml wody i kwasu solnego bądź ługu sodowego do pH 2. Następnie dodać 1 g węgla aktywowanego i po wymieszaniu odstawić na pół godziny. Podgrzać na łaźni wrzącej i sączyć przez sączek karbowany. Osad węgla na sączku przemyć trzykrotnie gorącą wodą, zbierając przesącz wraz z popłuczynami. Przenieść ilościowo do kolbki miarowej na 50 ml, dopełnić do kreski = przesącz A. (Sprawdzić w oddzielnym oznaczeniu czy używany węgiel daje w pH 2 dobre sklarowanie oraz czy przy tym pH nie powoduje strat kwasu glutaminowego).

b) Przekształcenie kwasu glutaminowego w pyrrolidynokarboksylowy. 25 ml przesączu A przenieść pipetą do kolbki stożkowej na 100 ml i dodać 2-n NaOH do pH 3—4. (Ustalenie pH w tym zakresie można osiągnąć miareczkując równoległą próbkę 2-n NaOH i kontrolując odczyn pehametrem ze szklaną elektrodą, albo też dodając 1 kroplę metyloranżu do próbki właściwej). Zamknąć korkiem z waty i ogrzewać w autoklawie 4 godz. przy 125°. Ostudzić, przenieść ilościowo do kolbki na 50 ml i dopełnić wodą (roztwór B).

c) Hydroksamowanie. Do 4 ml roztworu B dodać w próbce 2 ml odczynnika I. Probówkę zamknąć korkiem gumowym z chłodniczką kapilarną i ogrzewać równo 15 minut w kąpieli wrzącej. Po 15 minutach ogrzewania wstawić do zimnej wody, po ochłodzeniu zdjąć korek i wstrząsnąć celem usunięcia pęcherzyków gazu. Pobrać 3 ml hydroksamowanego płynu do próbki, dodać 25 ml odczynnika II. Powstałe purpurowe zabarwienie szybko oznaczyć na fotokolorymetrze Kletta, stosując jako ślepą próbę równoległe poddane hydroksamowaniu 2 ml przesączu A + 2 ml wody + 2 ml odczynnika I (z tego na ślepą próbę pobrać 3 ml i dodać 2,5 ml odczynnika II). Jednostki Kletta przeliczyć na mg kwasu glutaminowego, wg krzywej wzorcowej (prostej) wykreślonej po poddaniu roztworów wzorcowych kwasu glutaminowego zabiegami autoklawowania i hydroksamowania. Uwzględniając stosowane rozcieńczenia wyrazić wynik w gramach na 100 ml i w stosunku do azotu formolowego.

OZNACZENIE KWASU GLUTAMINOWEGO ZMODYFIKOWANĄ METODĄ OLCOTTA

Oznaczyć azot formolowy w przesączu A. W tym celu do 10 ml przesączu A dodać 10 kropli roztworu fenoloftaleiny i miareczkować 0,1-n ługiem do wyrażenia różowego zabarwienia. Dodać 10 ml 30%owego roztworu formaliny zobojętnionego wobec fenoloftaleiny i ujawnioną kwasowość miareczkować 0,1-n ługiem do wyraźnego różowego zabarwienia. Wynik wyrazić w g azotu formolowego w 100 ml próbki pierwotnej. Oznaczyć azot formolowy w roztworze B j.w. i wyrazić wynik w g azotu formolowego w 100 ml próbki pierwotnej. Różnicę w zawartości azotu formolowego przed i po autoklawowaniu wymnożyć

przez 14, co da zawartość kwasu glutaminowego w gramach na 100 ml próbki pierwotnej. Stosowany mnożnik 14 jest empirycznie ustalony; uwzględnia on zanik azotu formolowego przy przejściu kwasu glutaminowego w formę pierścieniową w takim stopniu, w jakim proces ten zachodzi w postępowaniu wyżej opisanym.

Я. Залэнски, И. Тшебска-Ескэ, Х. Кужепа

ОЦЕНКА БЕЛКОВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ, ОПИРАЮЩАЯСЯ НА КОЛИЧЕСТВЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Содержание

В свыше двадцати образцах белковых пищевых гидролизатов и промежуточных продуктов взятых во время производства глутаминовой кислоты определено: 1) общий азот макрометодом Kjeldahla, 2) аминокислотный азот микробиологическим методом Hendersona и Snella, 3) модифицированным методом Olcott'a и 4) несколько другими модификациями колориметрического метода.

Констатировано, что метод микробиологический, Olcott'a и колориметрический — дают близкие результаты. Модифицировано колориметрический метод Zamir'a и Lichtenstein'a применяя вместо воды и железистых реактивов подходящую не автокловную пробу при колориметрическом определении глутаминовой кислоты в гидролизатах.

Для существенной оценки качества пищевых белковых гидролизатов авторы предлагают: отношение количества „формолового” аминокислотного) азота к количеству общего азота (оценка степени гидролиза белка) и отношение количества глутаминовой кислоты к количеству „формолового” азота (оценка стоимости препарата).

Констатировано, что глютоновые гидролизаты совмещают в 2,5 до 3,0 раз больше глутаминовой кислоты нежели содержание „формолового” азота. В казеиновых гидролизатах, а также в казеиновых с добавлением отбросов белка — содержание глутаминовой кислоты в 1,6 до 2,3 раз выше нежели содержащее „формолового” азота.

Соотношение ниже 1,6 указывает, что часть глутаминовой кислоты была из гидролизата отобрана. Продукт такой оценивается ниже естественного гидролизата и считается отбросом являющимся во время продукции глутаминовой кислоты для фармацевтических потребностей, или глутаминового натрия при продукции приправ.

J. Załęski, I. Trzebska-Jeske, H. Kurzera

EVALUATION OF PROTEIN HYDROLYSATES ON THE BASIS OF GLUTAMIC ACID CONTENT

Summary

In twenty two samples of casein and gluten hydrolysates and in their intermediate products taken during the processes of glutamic acid production were estimated: total nitrogen (Kjeldahl's macromethod), aminoacid nitrogen (Sörensen) and glutamic acid (modified Henderson and Snell's microbiological method and several modifications of the colorimetric method). It has been shown that Olcott's method as well as the microbiological method give similar results. Zamir and

Lichtenstein's colorimetric method was modified, by introducing instead of their water-iron reagent, the proper not autoclaved blank during colorimetric determination of glutamic acid in hydrolysates.

For evaluation of the quality of those protein hydrolysates the following indexes are proposed: quantitative relationship of "formol" nitrogen to the total nitrogen (evaluation of the degree of hydrolysis of protein) and of glutamic acid to "formic" nitrogen (evaluation of the condiment value). It was found that in gluten hydrolysates the content of glutamic acid is from 2.5 to 3.0 times higher than the content of "formic" nitrogen.

In hydrolysates of casein and casein with the addition of various protein by-products the content of glutamic acid is 1.6 to 2.3 times higher than the content of "formic" nitrogen. If in the hydrolysate this proportion is lower than 1.6 it will indicate that a part of glutamic acid has been removed from the hydrolysate. Such a product does not possess condiment value equal to original hydrolysates; it may be considered rather as a by product derived from the production of glutamic acid for pharmaceutical purposes or of pure sodium glutamate for condiment purposes.

PIŚMIENNICTWO

1. Zamir A., Lichtenstein N.: *Anal. Chim. Acta*, 12, 577, 1955. — 2. Olcott H. S.: *J. Biol. Chem.*, 153, 765, 1940. — 3. Lipmann F., Tuttle L. C.: *J. Biol. Chem.*, 159, 21, 1945. — 4. Freimuth U., Palitzsch R.: *Die Nahrung*, 2, 26, 1958. — 5. Hamilton P. B.: *J. Biol. Chem.*, 158, 375, 1945. — 6. Grossowicz N. i inni: *J. Biol. Chem.*, 187, 111, 1950. — 7. Yale H. L.: *Chem. Rev.*, 33, 209, 1943. — 8. Vickery H. B. i inni: *Bioch. J.*, 29, 2710, 1935. — 9. Henderson L. M., Snell E. E.: *J. Biol. Chem.*, 172, 15, 1948. — 10. Kurzepa H., Trzebska-Jeske I.: *Roczniki PZH*, 9, 497, 1958.
11. Rokosz A.: *Metody statystyczne PWT*, Warszawa 1957. — 12. Youden W. J.: *Statistical Methods for Chemists*, New York 1952. — 13. Fisz M.: *Rachunek prawdopodobieństwa i statystyka matematyczna PWN*, Warszawa 1958. — 14. Gubarewski L.: *Roczniki PZH*, 10, 2, 143, 1959. — 15. Pijanowski E. i inni: *Kalendarz Techn. Przem. Spoż.*, t. III, s. 1423, Warszawa 1949.