

METODY OZNACZANIA SKŁADU AMINOKWASOWEGO PASZ

Marian Wójciak, Jerzy Petryszyn, Krystyna Stencka

Centralne Laboratorium Przemysłu Paszowego w Warszawie

Kierownik: doc. dr M. Wójciak

Spośród znanych i stosowanych metod oznaczania aminokwasów — dla potrzeb doświadczeń nad bilansowaniem składu aminokwasowego mieszanek paszowych wybrano metody analityczne, które przy uwzględnieniu dokładności wyników końcowych i czasu wykonania analizy tworzą układ postępowania przystosowany do warunków technicznych istniejących laboratoriów.

Starano się poszczególne operacje i metody zestawić w układ celowy i przydatny w granicach dostępnych możliwości technicznych, pozwalający uzyskać pełną charakterystykę składu aminokwasowego pasz.

W celu szczegółowego określenia skutków działania, którym podlegają poszczególne aminokwasy w przebiegu analizy, przedstawiono w kolejności postępowania wszystkie zabiegi, jakim jest poddawany analizowany surowiec.

Dla wszystkich aminokwasów, z wyjątkiem tryptofanu, przyjęto hydrolizę kwasową 6 N kwasem solnym. Aminokwasy siarkowe — cystynę i metioninę — jako związki najmniej odporne na bezpośrednie działanie środków hydrolizujących potraktowano odmiennie. Cystyna i metionina pod wpływem hydrolizy kwasowej ulegają częściowo utlenieniu, toteż w celu stwierdzenia całkowitych ilości tych aminokwasów materiał przed hydrolizą należy utlenić. Pod wpływem związków utleniających aminokwasy te przekształcają się w całości w odpowiednie pochodne utlenione: Cys przekształca się w kwaśny Cys—HSO₃, Met — w obojętny sulfon metioniny MO₂, a pozostałe aminokwasy, z wyjątkiem kwasu asparaginowego, ulegają zniszczeniu lub utlenieniu.

Dla Try przyjęto hydrolizę zasadową nasyconym wodorotlenkiem baru. Obok Try po hydrolizie pozostają zachowane: Ser, Tre, Tyr; inne aminokwasy w różnym stopniu ulegają zniszczeniu, a wszystkie racemizują się. Sposób postępowania przy określaniu poszczególnych aminokwasów przedstawiono w tabeli 1.

Spośród wielu metod do rozdziału aminokwasów wybrano elektro-

Tabela 1

Sposób postępowania przy oznaczaniu poszczególnych aminokwasów

Aminokwasy	Symbol amino-kwasu	Sposób postępowania
Zasadowe Arginina Histydyna Lizyna	Arg His Liz	Hydroliza kwasowa materiału nie utlenionego. Rozdzielenie aminokwasów — elektroforeza w buforze pirydynowym o pH 6,5
Kwaśne Kwas asparaginy Kwas glutaminy	Asp Glu	Reakcja barwna z ninhydriną i odczynnikiem miedziowym
Obojętne Glicyna Alanina Walina Seryna Treonina Feniloalanina Tyrozyna	Gli Ala Wal Ser Tre Fen Tyr	Hydroliza materiału nie utlenionego. Wydzielenie — elektroforeza w buforze pirydynowym o pH 6,5 Rozdzielanie aminokwasów — elektroforeza w buforze octanowym o pH 2 i chromatografia Reakcja barwna z ninhydriną i odczynnikiem miedziowym
Izoleucyna Leucyna	Ileu Leu	Hydroliza kwasowa materiału nie utlenionego. Rozdzielanie — chromatografia wg Roland-Grossa. Reakcja barwna z ninhydriną i odczynnikiem miedziowym
Cysteina i cystyna (oznaczane jako kwas cysteiny — kwaśny)	Cys Cys-HSO ₃	Utlenienie materiału Hydroliza kwasowa Rozdzielanie — elektroforeza w buforze pirydynowym o pH 6,5 Reakcja barwna z ninhydriną i odczynnikiem miedziowym
Metionina (oznaczana jako sulfon metioniny — obojętnej)	MO ₂	Utlenienie materiału Hydroliza kwasowa Wydzielenie — elektroforeza w buforze pirydynowym o pH 6,5 Rozdzielanie — elektroforeza w buforze octanowym o pH 2 i chromatografia Reakcja barwna z ninhydriną i odczynnikiem miedziowym
Tryptofan	Try	Hydroliza zasadowa Oznaczanie metodą mikrobiologiczną

forezę wysokonapięciową w połączeniu z chromatografią, a dla niektórych aminokwasów chromatografię wg Rolanda-Grossa (3).

Przy wyborze metody kierowano się możliwością nabycia aparatury na rynku krajowym, uzyskaniem szybkiego i dobrego rozdziału miesza-

niny aminokwasów na pojedyncze jednostki oraz wynikami końcowymi, które byłyby porównywalne z wynikami otrzymanymi przy innej metodzie postępowania.

Elektroforezę wysokonapięciową zastosowano:

a) do całkowitego rozdzielania pięciu aminokwasów: Arg, Liz, His, Asp i Glu z hydrolizatu materiału nie utlenionego oraz wydzielania Cys—HSO₃ z hydrolizatu materiału utlenionego,

b) do wydzielania 13 aminokwasów łącznie: Ala, Cys, Fen, Gli, Leu + Ileu, Met, Pro, OPro, Ser, Tre, Tyr i Wal oraz częściowego ich rozdzielania,

c) wydzielania MO₂ z hydrolizatu materiału utlenionego i częściowego rozdzielania ich od innych aminokwasów.

Do całkowitego rozdzielania Ala, Cys, Fen, Gli, Leu + Ileu, Met, Pro, OPro, Ser, Tre, Tyr, Wal i MO₂ wykorzystano chromatografię wstępującą jako drugi etap po elektroforezie. W tych warunkach Leu i Ileu występują razem dając wspólną, trudno rozdzielającą się jednostkę. Dla tych aminokwasów, wychodząc bezpośrednio z hydrolizatu, zastosowano chromatografię zstępującą wg Rolanda-Grossa.

Do oznaczeń ilościowych wszystkich omawianych wyżej aminokwasów, z wyjątkiem Pro i OPro, wykorzystano reakcje barwne z ninhydryną i odczynnikiem miedziowym. Pro i OPro z ninhydryną dają słabe zabarwienie, nieprzydatne do pomiarów kolorymetrycznych. Oznaczenia ilościowe Pro i OPro przy zastosowaniu ninhydryny byłyby obarczone zbyt dużym błędem.

UTLENIE NIE MATERIAŁU

O d c z y n n i k i:

Mieszanina utleniająca: 1 ml 30-procentowej wody utlenionej + 9 ml 88-procentowego kwasu mrówkowego, 48-procentowy kwas bromowodorowy.

Ze zmielonego materiału przygotowuje się próbkę zawierającą około 16 mg N (azot oznacza się uprzednio metodą Conwaya)

$$m = \frac{16 \cdot 100}{p},$$

m — wielkość odważki w mg,

p — procentowa zawartość N w badanym materiale.

Odważkę przenosi się do kolby okrągłodennej ze szlifem, o pojemności 500 ml, materiał w kolbie zalewa się oziębioną do 0°C mieszaniną utleniającą w ilości 40 ml i po wymieszaniu zawartości zamkniętą kolbę pozostawia do następnego dnia w temperaturze pokojowej, aby dokonały się reakcje utlenienia.

Po utlenieniu kolbę umieszcza się w lodzie i wlewa porcjami, mieszając, 6 ml oziębionego kwasu bromowodorowego w celu zobojętnienia kwasu nadmrówkowego, po czym mieszaninę odparowuje się szybko do sucha na łaźni wodnej w temp. 40°C pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość w kolbie hydrolizuje się 6 N kwasem solnym w ilości 200 ml.

PRZYGOTOWANIE HYDROLIZATÓW KWASOWYCH

Ze zmielonego materiału przygotowuje się próbkę zawierającą ok. 16 mg N.

Odważkę przenosi się do kolby okrągłodennej ze szlifem o pojemności 500 ml, po czym przeprowadza hydrolizę za pomocą 6 N kwasu solnego w ilości 200 ml na łaźni wodnej lub piaskowej, pod chłodnicą powietrzną długości ok. 1 m w czasie 16—24 godzin.

Materiał pochodzenia zwierzęcego hydrolizuje się 16 godzin, a materiał pochodzenia roślinnego — 24 godziny.

Po zakończonej hydrolizie płyn sączy się przez sączonek spiekany G-4 w celu oddzielenia wytworzonych związków huminowych; przesącz zbiera się ilościowo w kolbie okrągłodennej z nasadką Claysena o pojemności 250 ml i odparowuje do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40—50°C.

Suchą pozostałość rozpuszcza się w 5 ml 10-procentowego izopropanolu i przechowuje w lodówce.

PRZYGOTOWANIE HYDROLIZATÓW ZASADOWYCH

Ze zmielonego materiału przygotowuje się próbkę zawierającą ok. 16 mg N.

Odważkę przenosi się do próbówki — ampułki o pojemności ok. 15 ml i zalewa 10 ml nasyconego roztworu wodorotlenku baru. Po wymieszaniu zawartości ampułkę zatapia się nad palnikiem gazowym i przeprowadza hydrolizę w suszarce w temp. 110°C w czasie 24 godzin.

Po zakończonej hydrolizie zawartość ampułki przenosi się ilościowo do kolby stożkowej o pojemności 50 ml i zobojętnia 1 N kwasem siarkowym do pH 6—7 wobec błękitu bromotymolowego.

Zobojętniony roztwór odwirowuje się na wirówce przy 3000—6000 obrotów na minutę — do całkowitego oddzielenia osadu siarczanu baru — w próbkach wirówkowych o pojemności 25—50 ml. Oddzielony roztwór dekantuje się do kolby miarowej o pojemności 1000 ml.

Osad pozostały w próbówce zalewa się wrzącą wodą redestylowaną, zawartość skłóca się bagietką szklaną do wytworzenia jednolitej zawiesiny i odwirowuje powtórnie. Oddzielony roztwór dekantuje do kolby

miarowej. Przepłukiwanie osadu wrzącą wodą redestylowaną wykonuje się łącznie trzykrotnie.

Po ostatnim przemyciu osadu roztwór zebrany w kolbie miarowej uzupełnia się wodą redestylowaną do objętości 100 ml. Otrzymany roztwór jest przeznaczony do oznaczania Try metodą mikrobiologiczną.

OZNACZANIE AMINOKWASÓW METODĄ ELEKTROFOREZY WYSOKONAPIĘCIOWEJ

O d c z y n n i k i:

Standardy aminokwasów firmy Shandon;

bufor pM 6,5: 100 ml pirydyny + 10 ml kwasu octowego lodowatego + 890 ml wody;

bufor pH 2: 150 ml kwasu octowego lodowatego + 50 ml kwasu mrówkowego + 800 ml wody;

rozpuszczalnik do chromatografii: 400 ml n-butanolu + 100 ml kwasu octowego lodowatego + 100 ml wody (4 : 1 : 1);

roztwór ninhydryny: 0,2 g ninhydryny + 0,85 ml kwasu octowego lodowatego + 99 ml acetonu;

odczynnik miedziowy: 2 ml nasyconego roztworu $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ + 0,2 ml 10-procentowego kwasu azotowego + 100 ml acetonu;

Bibuła Whatman Nr 3.

Aparatura: komora elektroforetyczna, prostownik, transformator, Spektrofotometr Uniwersalny Zeissa

ELEKTROFORETYCZNE WYDZIELANIE ORAZ ROZDZIAŁ AMINOKWASÓW KWAŚNYCH I ZASADOWYCH

Na środku arkusza bibuły zaznacza się ołówkiem grafitowym linię naniesienia rozdzielanej mieszaniny na 5 odcinkach długości po 4 cm, następnie zwilża się buforem pirydynowym o pH 6,5 i umieszcza na płycie szklanej w komorze elektroforetycznej.

Na wilgotny arkusz bibuły nanosi się mikropipetą mieszaninę aminokwasów w roztworach: na dwie linie zewnętrzne — po 0,01 ml roztworu wzorcowego (0,01 — molowego), na trzy linie wewnętrzne po 0,01 ml roztworów analizowanych.

Przeprowadza się elektroforezę w buforze pirydynowym przy napięciu 28,5 V/cm długości paska bibuły w czasie 2 godzin.

W wyniku elektroforezy aminokwasy obojętne ulegają nieznacznemu przesunięciu z linii naniesienia w kierunku katody, aminokwasy kwaśne przesuwają się do anody i rozdzielają się całkowicie, a aminokwasy zasadowe przesuwają się do katody i tu rozdzielają się na pojedyncze jednostki.

Po zakończonej elektroforezie arkusz bibuły suszy się na powietrzu lub w suszarce w temperaturze 70°C do zaniku woni buforu.

Wysuszony arkusz bibuły zanurza się w roztworze ninhydryny w celu wywołania aminokwasów i pozostawia na powietrzu. Po wywołaniu poszczególne aminokwasy kwaśne i zasadowe występują na bibule w postaci oddzielnych plam barwy fioletowej, natomiast aminokwasy obojętne stanowią łącznie jedną plamę w pobliżu linii naniesienia.

ELEKTROFORETYCZNE WYDZIELANIE AMINOKWASÓW OBOJĘTNYCH Z MIESZANINY W ROZTWORZE

Na środku arkusza bibuły zaznacza się ołówkiem grafitowym linię naniesienia roztworu, długości 14 cm.

Arkusz bibuły z zaznaczoną linią zwilża się buforem pirydynowym o pH 6,5, nanosi na tę linię mikropipetą 0,5 ml roztworu badanego i przeprowadza elektroforezę w buforze pirydynowym o pH 6,5 przy napięciu $28,5\text{ V/cm}$ długości paska bibuły w czasie 1,5 godziny. Następnie arkusz suszy się na powietrzu lub w suszarce w temperaturze 70°C do zaniku woni buforu i sprawdza położenie aminokwasów obojętnych pod analityczną lampą kwarcową. Po ustaleniu położenia aminokwasów wycina się z arkusza bibuły pasek z aminokwasami obojętymi. Pasek ten tnie się następnie na drobne skrawki i umieszcza w kolbie stożkowej o pojemności 50 ml, zalewa rozcieńczonym alkoholem etylowym, tak aby skrawki bibuły były całkowicie pogrążone w płynie i pozostawia na 24 godziny. Po tym czasie eluat przenosi się ilościowo do kolby Claysena i odparowuje do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze $40\text{--}50^{\circ}\text{C}$. Suchą pozostałość rozpuszcza się w 0,5 ml 10-procentowego izopropanolu i przechowuje w lodówce.

Roztwór ten jest przeznaczony do dalszego rozdziału aminokwasów obojętnych za pomocą elektroforezy i chromatografii.

ELEKTROFORETYCZNO-CHROMATOGRAFICZNY ROZDZIAŁ MIESZANINY AMINOKWASÓW OBOJĘTNYCH

Na arkuszu bibuły po stronie anody w odległości 3 i 6 cm od przyległych krawędzi arkusza zaznacza się ołówkiem grafitowym punkt naniesienia roztworu rozdzielanych aminokwasów.

Bibułę zwilża się buforem octowym o pH 2 i nanosi mikropipetą w zaznaczonym punkcie mieszaninę rozdzielanych aminokwasów w ilości 0,01 lub 0,02 ml, zależnie od ilości aminokwasów w roztworze.

Rozdzielaną mieszaninę aminokwasów może stanowić izopropanolowy roztwór aminokwasów obojętnych wydzielonych z hydrolizatu materiału nie utlenionego lub hydrolizatu materiału utlenionego lub standardowy roztwór aminokwasów obojętnych.

Rozdział elektroforetyczny aminokwasów obojętnych przeprowadza się w buforze kwaśnym o pH 2 przy napięciu 34,5 V/cm długości paska bibuły w czasie 2 godzin.

Po zakończonej elektroforezie bibułę suszy się na powietrzu lub w suszarce w temperaturze 70°C do zaniku woni buforu i przeprowadza chromatografię wstępującą w kierunku prostopadłym do elektroforezy w czasie 20 godzin. Następnie chromatogram suszy się na powietrzu do zaniku zapachu rozpuszczalnika i wywołuje ninhydryną.

Bibułę pozostawia się na powietrzu w ciemnym pomieszczeniu w temperaturze pokojowej do następnego dnia.

Na chromatogramie aminokwasy występują w postaci oddzielnych plam w różnych odcieniach barwy.

PRZYGOTOWANIE ELUATÓW DO POMIARÓW KOLORYMETRYCZNYCH

Oznaczane aminokwasy po rozdziale elektroforetycznym, względnie chromatograficznym, wywołane ninhydryną, rozpoznaje się na arkuszu bibuły przez prównanie rozmieszczenia plam pochodzących z roztworu badanego z układem plam wytworzonym przez wzorcowy roztwór aminokwasów.

Rozpoznane aminokwasy zaznacza się ołówkiem grafitowym, po czym arkusz bibuły zanurza się w roztworze odczynnika miedziowego w celu przeprowadzenia aminokwasów w kompleksy z miedzią o jednolitym, ciemnoróżowym zabarwieniu jednakowym dla wszystkich oznaczanych aminokwasów. Reakcja przebiega w suszarce w temperaturze 70°C w czasie 5 min.

Po zakończonej reakcji z arkusza bibuły wycina się krążki lub paski z plamkami aminokwasów, tnie się je na drobne skrawki i zbiera skrawki z każdego krążka lub paska z osobna w oddzielnych probówkach. Skrawki bibuły zalewa się metanolem w ilości 5 ml i pozostawia w temperaturze pokojowej na pół godziny.

Sporządzony eluat jest przeznaczony do pomiarów kolorymetrycznych.

W tych samych warunkach przygotowuje się próbę ślepą. Pomiar kolorymetryczny przeprowadza się bezpośrednio po elucji.

ILOŚCIOWE OZNACZANIE AMINOKWASÓW

Pomiary kolorymetryczne roztworów barwnych — oznaczenia ilościowe — przeprowadza się na spektrofotometrze uniwersalnym Zeissa przy długości fali 510 mμ.

Stężenie aminokwasu oblicza się z proporcji:

$$C_x = \frac{A_x \cdot C_s}{A_s}$$

gdzie:

C_x — stężenie aminokwasu badanego, $\mu\text{g/ml}$,

A_x — absorpcja roztworu badanego, odczytana z tablic,

C_s — stężenie aminokwasu wzorcowego, w $\mu\text{g/ml}$,

A_s — absorpcja roztworu wzorcowego, odczytana z tablic.

Podany sposób odczytywania wyników jest wygodny i szybki, może być dokonywany tylko w przypadku zachodzącej zależności prostoliniowej absorpcji od stężenia.

Do sporządzenia krzywych wzorcowych dla poszczególnych aminokwasów używa się standardowej mieszanki aminokwasów w różnych rozcieńczeniach. Z krzywych wybiera się odcinki, na których wartości absorpcji stosują się do prawa Lamberta-Beera i z tych wartości korzysta się przy odczytywaniu wyników. Jeżeli stężenie aminokwasu w badanym roztworze nie stosuje się do tego prawa (stężenie za niskie lub za wysokie), dla niższych stężeń nanosi się na bibułę większe ilości mieszaniny wyjściowej, a dla wyższych — eluaty się rozcieńcza. Takie postępowanie jest znacznie prostsze niż każdorazowe odczytywanie wyników z krzywych wzorcowych.

Korzystając z określonych wartości absorpcji dla poszczególnych aminokwasów wzorcowych przy odczytywaniu wyników, można — obok próbki badanej — rozdzielić mieszaninę standardową w tych samych warunkach przyjmując jedno z rozcieńczeń stosujące się do prawa Lamberta-Beera.

Wyniki oblicza się z wzoru:

$$Z = \frac{C_x \cdot r \cdot V \cdot 1600}{p \cdot m}$$

gdzie:

Z — zawartość aminokwasu (g) przy 16 g N,

C_x — stężenie aminokwasu oznaczanego w roztworze — eluacie, w $\mu\text{g/ml}$,

r — iloczyn rozcieńczeń hydrolizatu,

V — objętość hydrolizatu, w ml,

p — procentowa zawartość N w paszy,

m — wielkość odważki, w mg.

OZNACZANIE LEUCYNY I IZOLEUCYNY METODĄ ROLANDA-GROSSA

O d c z y n n i k i:

Rozpuszczalnik: 120 ml II rz. butanolu + 40 ml 3-procentowego amoniaku.

Bibuła: Whatman Nr 1.

PRZYGOTOWANIE KOMORY CHROMATOGRAFICZNEJ

Chromatografię przeprowadza się w okrągłej komorze szklanej. Na dnie komory umieszcza się szalkę Petriego z rozpuszczalnikiem. Brzeg komory przykrywa się okrągłą płytą szklaną z wycięciem w środku przeznaczonym do zawieszenia dwóch rynienek szklanych. Po zawieszeniu rynienek komorę zamyka się szklaną przykrywką z otworem szlifowanym pośrodku zamkniętym korkiem (wszystkie powierzchnie styku komory, przykrywy i płyty szklanej są powleczone wazeliną silikonową).

METODA

Na arkuszu bibuły o wymiarach 18×56 cm w odległości 7 cm od jednego końca arkusza zaznacza się ołówkiem grafitowym pięć punktów naniesienia rozdzielanej mieszaniny, po czym nanosi się mikropipetą mieszaninę aminokwasów w roztworach: na dwa punkty — po 0,005 ml mieszaniny standardowej aminokwasów, na trzy punkty — po 0,01 ml roztworu badanego (hydrolizat kwasowy lub elektroforetycznie wydzielona mieszanina aminokwasów obojętnych).

Bibułę z naniesionymi roztworami umieszcza się w komorze chromatograficznej na 2 godziny w celu wysycenia bibuły parami rozpuszczalnika. Po upływie tego czasu do rynienek wprowadza się rozpuszczalnik za pomocą rurki połączonej z korkiem przykrywy i przeprowadza chromatografię zstępującą w czasie 40 godz.

Po zakończonej chromatografii bibułę suszy się na powietrzu i wywołuje ninhydriną przez zanurzenie.

Chromatogramy pozostawia się do dnia następnego w temp. pokojowej w ciemnym pomieszczeniu, a następnie plamy z aminokwasami oznaczanymi — Leu i Ileu — wycina się i przeprowadza w związki kompleksowe z miedzią.

Oznaczenia ilościowe wykonuje się w sposób podany przy elektroforzezie.

Do oznaczenia tryptofanu przyjęto metodę mikrobiologiczną wg Kurzepy (1).

W tabeli 2 podano skład aminokwasowy śruty kukurydzanej, śruty owsianej, drożdży paszowych, odtłuszczonego mleka w proszku, mączki mięsno-kostnej i mączki rybnej, określony powyższymi metodami.

Zawartość poszczególnych aminokwasów w badanych surowcach jest zgodna ze składem ogólnie podawanych dla tego rodzaju surowców. Jedynie wyraźne różnice wystąpiły w zawartości metioniny oznaczonej według uprzednio przyjętych metod jako sulfonu. Należy sądzić, że nowy sposób przygotowania hydrolizatu do oznaczania aminokwasów siarkowych pozwoli znacznie dokładniej oznaczyć zawartość metioniny i cystyny.

Tabela 2

Skład aminokwasowy pasz

Aminokwasy	Sruta kukury- dzana		Sruta owsiana		Drożdże paszowe		Mleko w proszku odtłusz.		Mączka mięsno- kostna		Mączka rybna						
	zawartość N g w 100 g paszy																
	1,4	1,4	1,4	1,5	1,5	1,6	7,1	5,7	7,5	5,5	5,7	7,9	8,2	8,0	11,4	11,6	11,2
Ala	7,8	7,6	4,8	5,4	5,6	7,7	3,7	9,5	8,7	6,7	6,2	6,2	6,2	6,7	6,2	6,2	6,2
Arg	3,8	3,0	4,7	4,9	2,9	3,6	2,2	5,5	5,7	4,2	5,2	5,2	5,7	4,2	5,2	5,2	5,2
Asp	5,4	5,2	8,7	10,1	8,1	10,9	10,5	7,2	7,1	6,0	7,9	7,9	7,1	6,0	7,9	7,9	7,9
Cys	1,5	1,5	2,5	2,4	1,9	1,1	2,1	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
Fen	4,3	3,4	4,9	5,0	3,9	4,9	5,8	6,2	3,3	4,0	3,8	3,8	3,3	4,0	3,8	3,8	3,8
Gli	2,6	2,5	3,3	3,7	4,3	3,9	2,8	5,2	—	5,6	4,8	4,8	—	5,6	4,8	4,8	4,8
Glu	16,6	15,7	17,3	23,9	10,7	16,5	15,9	12,6	12,1	10,0	14,1	14,1	12,1	10,0	14,1	14,1	14,1
His	2,1	1,1	2,4	2,0	2,6	2,2	2,4	2,3	—	3,0	1,1	1,1	—	3,0	1,1	1,1	1,1
Leu + Ileu	12,4	12,0	8,9	11,3	8,6	9,5	14,9	12,7	8,2	10,7	10,2	10,2	8,2	10,7	10,2	10,2	10,2
Liz	3,7	2,7	5,1	4,1	5,1	7,0	6,1	6,9	3,5	8,4	6,2	6,2	3,5	8,4	6,2	6,2	6,2
Met	1,4	0,4	1,6	1,0	0,7	0,8	1,7	0,8	0,6	2,4	1,6	1,6	0,6	2,4	1,6	1,6	2,3 ¹
Ser	3,9	3,5	4,3	4,2	5,3	4,5	5,7	5,4	3,9	3,8	3,1	3,1	3,9	3,8	3,1	3,1	3,1
Tre	3,2	—	3,0	—	4,8	—	4,7	5,7	—	4,4	—	—	—	4,4	—	—	—
Try	0,4	0,5	0,7	1,0	0,8	0,9	0,9	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7
Tyr	2,3	2,2	1,8	2,3	3,1	2,3	4,7	3,5	1,9	2,3	1,5	1,5	1,9	2,3	1,5	1,5	1,5
Wal	4,4	3,2	2,3	2,3	3,3	2,5	4,2	7,1	3,1	3,8	4,1	4,1	3,1	3,8	4,1	4,1	4,1

¹ Metionina oznaczona jako sulfon metioniny.

Przyjęte sposoby postępowania zestawiono w jednolity układ, który przyjęto dla oznaczania składu aminokwasowego pasz treściwych stosowanych do produkcji mieszanek przemysłowych. Omówiono technikę postępowania w kolejności wykonywania poszczególnych oznaczeń. Wszystkie aminokwasy, z wyjątkiem tryptofanu oraz leucyny i izoleucyny, rozdzielono metodą elektroforezy wysokonapięciowej.

Tryptofan oznaczono metodą mikrobiologiczną, która okazała się najbardziej przydatna do tego rodzaju oznaczeń.

WNIOSKI

Przedstawione metody oznaczania aminokwasów zostały sprawdzone w warunkach przeciętnego laboratorium i mogą być polecane bez zastrzeżeń do prac nad oceną wartości pokarmowej białka.

Aminokwasy zawierające siarkę oznaczono w hydrolizatach materiału utlenionego kwasem mrówkowym. Otrzymane wyniki są bardziej dokładne niż otrzymane dla pasz hydrolizowanych bez uprzedniego utlenienia.

Tryptofan oznaczono mikrobiologicznie, stwierdzając że jest to jedna z najdokładniejszych metod oznaczania tego aminokwasu.

Zawartość aminokwasów w badanych paszach jest zbliżona do wartości podawanych przez innych autorów.

LITERATURA

1. Kurzepa H. i Trzebska-Jeske I.: Rocz. Państw. Zakł. Hig., IX, 2, 1958, s. 6.
2. Moore S.: Biol. Chem., 238, 235, 1963.
3. Roland J. F. i Gross A. M.: Anal. Chem., 26, 1954, s. 502.
4. Żebrowska T.: Zeszyty Problem. Post. Nauk Roln., 3, 2, 1963 s. 41.

M. Вуйцяк, Е. Пэтрышин, К. Стэнца

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА КОРМОВ

Резюме

В настоящей работе обычные методы применены в комбинации, дающей возможность получить полную характеристику аминокислотного состава кормов.

Представлен последовательный ход анализа — от исходного материала до конечных результатов.

Все аминокислоты, за исключением триптофана и лейцина с изолейцином, определяются методом высоковольтного электрофореза на бумаге. Аминокислоты, содержащие серу, определяются в кислотных гидролизатах материала окисленного надмуравьиной кислотой.

Триптофан определяется микробиологически, лейцин и изолейцин — методом Ролянда-Гросса.

Получаемые результаты согласны с данными других исследователей. Определен аминокислотный состав 6 кормов.

M. Wójciak, J. Petryszyn, K. Stencka

METHODS FOR DETERMINING AMINO ACID COMPOSITION OF FEEDSTUFFS

Summary

In present work accepted analytical methods are combined to procedure yielding full characteristics of amino acid composition of feedstuffs.

The course of analysis from original material to final results is described. All amino acids with exception of tryptophane, leucine and isoleucine are determined by high-voltage electrophoresis.

Sulphur containing amino acids are determined in hydrolysates oxidized with performic acid.

Tryptophane is determined by microbiological method, leucine and isoleucine — by method of Roland-Gross.

Amino acid contents in feedstuffs examined is similar to values given by other authors. Amino acid composition of 6 feedstuffs was investigated.

