

WANDA GRADOWA

CHELATY W ŻYWNOSCI I PASZACH

Wstęp

Współzależność różnych składników i wzajemne ich oddziaływanie stanowią ważne i ciekawe zagadnienie w nauce o żywieniu.

Wiele zjawisk pozornie nie związanych ze sobą, jak na przykład wpływ soków owocowych i jaj na twardość na wchłanianie żelaza zawartego w chlebie, synergetyczne działanie kwasu wersenowego z działaniem przeciwutleniaczy dodawanych do tłuszczów, czy też działanie tzw. „nieznanych czynników wzrostowych” zawartych w surowcach paszowych, wydaje się być przejawami tego samego procesu.

Badania naukowe w dużym stopniu polegają na znalezieniu wspólnych prawidłowości w pozornie oderwanych faktach doświadczalnych. Wspólnym mianownikiem, do którego można sprowadzić przykładowo przytoczone fakty są chemiczne i fizykochemiczne właściwości pewnej grupy kompleksowych związków metali, tzw. chelatów.

Ze względu na szerokie zastosowanie związków chelatujących w chemii analitycznej, ich właściwości chemiczne i fizykochemiczne są dokładnie zbadane.

Właściwości chemiczne i fizykochemiczne chelatów

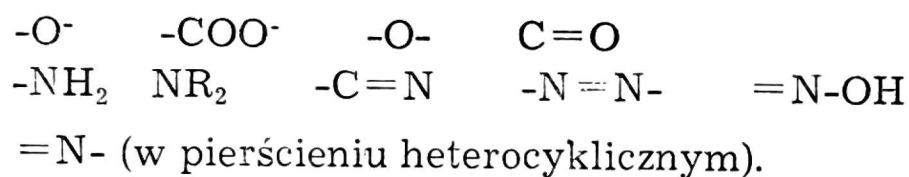
Związki o właściwościach chelatujących (po angielsku „chelating agents”) zwane są również kompleksonami.

Z syntetycznych związków tego typu stosunkowo najczęściej stosowany jest, m. in. w analityce, kwas etylenodwuaminooctowy, zwany inaczej kompleksonem II, kwasem wersenowym lub oznaczany skrótem EDTA, pochodzącym z angielskiej chemicznej nazwy związku.

Kompleksy związków chelatujących z metalami nazywane są chelatami.

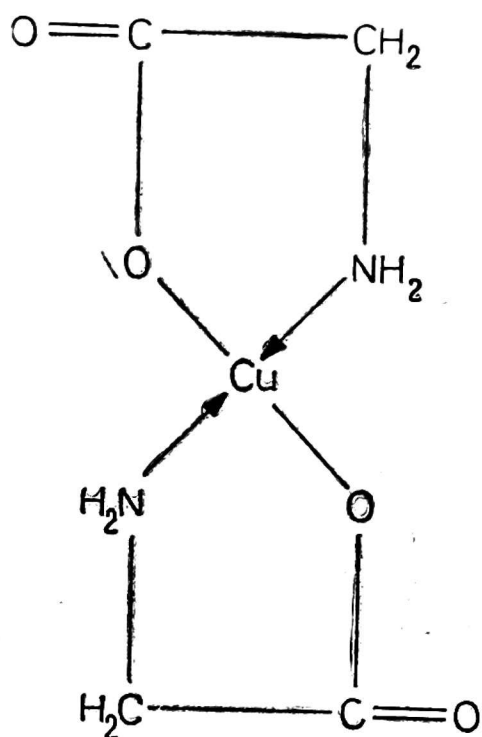
Nazwa ta obejmuje całą grupę związków kompleksowych, w których atom metalu ujęty jest jakby w kleszcze (chele po grecku — kleszcze kraba) przez wiązanie z dwoma atomami jednej cząsteczki, przeważnie związku organicznego, będącymi donorami elektronów w wiązaniu koordynacyjnym. Poza wiązaniami koordynacyjnymi mogą w chelatach występować również wiązania kowalencyjne i jonowe.

Atomami donorowymi są najczęściej tlen i azot wchodzące w skład następujących grup (Serafinowa, 1969):

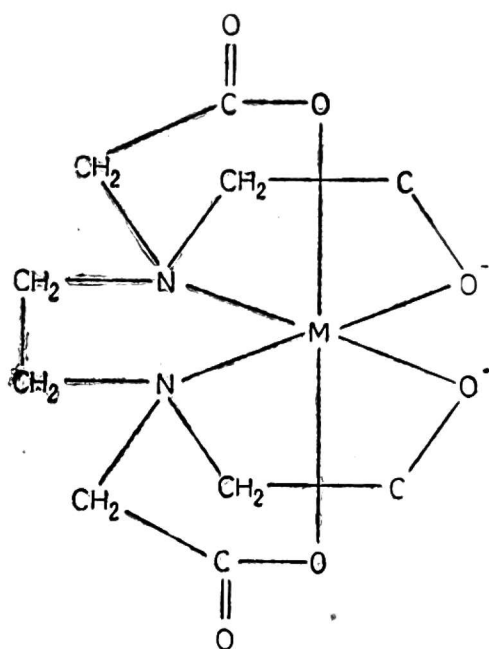


Utworzenie wiązania chelatowego prowadzi do powstania pięcio- lub sześciocząłowego pierścienia heterocyklicznego.

Przykłady związków chelatowych:



chelate miedzi z częściami kwasu aminooctowego



chelate kwasu etylenodwuaminoczworoctowego (EDTA)

Taki kompleks kwasu etylenodwuaminoczworoctowego zawierający 5 pierścieni pięciocząłowych jest bardzo trwały (Graddon, 1963).

Wejście jonu metalu w skład kompleksu chelatowego zmienia całkowicie właściwości chemiczne i fizykochemiczne metalu w stosunku do postaci jonowej.

Zmienia się reaktywność chemiczna i takie cechy fizyczne, jak np. rozpuszczalność w wodzie i innych cieczach, co modyfikuje oddziaływanie składników mineralnych w reakcjach chemicznych i biochemicznych zachodzących w żywności i organizmach żywych. W ten sposób obecność związków chelatujących w żywności czy paszy może wpływać na trwałość produktu i organizm żywiony.

Taki czy inny wpływ związku chelatującego na żywność, paszę czy przemiany w organizmie żywym zależy od trzech czynników związanych z charakterem związku chelatującego i wiązanej metali:

- 1) trwałość kompleksu metal-związek chelatujący,
- 2) charakter rozpuszczalności kompleksu i związku chelatującego,
- 3) wybiórczość chelatowania.

Trwałość kompleksu zależy zarówno od związku chelatującego, jak i od metalu. Ogólnie przyjmuje się dla różnych związków chelatujących następujące uszeregowanie metali według malejącej trwałości chelatów (Pejve, 1960): Cu, Ni, Co i Zn, Cd, Fe, Mn, Mg.

Związki o silniejszych właściwościach chelatujących wiążą wszystkie te metale, ale trwalsze chelaty dają z metalami stojącymi na początku szeregu.

Przyjmuje się, że trwałość heterocyklicznego pierścienia chelatowego jest w przybliżeniu proporcjonalna do kwadratu ładunku i odwrotnie proporcjonalna do promienia jonu metalu (Moeller i Horwitz, 1960).

Trwałość kompleksu zależy oczywiście i od czynników zewnętrznych, takich jak stężenie jonów wodorowych. Ilustruje to kolejność kompleksowania metali przez EDTA przy różnym pH (Welcher, 1963).

Tabela 1

Kolejność kompleksowania metali przez EDTA przy różnym pH

pH	M e t a l e								
4,0	Cr	Cu	Ni	Pb					
6,5	Ni	Cu	Co	Zn, Cd	Ca				
8,5	Ni	Co	Cu	Zn, Cd	Ca	Mg	Sr	Ba	
11,0	Co	Ni	Cu	Zn, Cd	Ca	Mg	Sr	Ba	

Charakter rozpuszczalności kompleksu, druga cecha ważna z punktu widzenia aktywności biologicznej, zależy od grup funkcyjnych cząsteczki, nie biorących udziału w wiązaniu metalu. Grupy funkcyjne -COOH -SO₃H -PO₃H -OH i -SH zwiększają rozpuszczalność kompleksu w wodzie, a łańcuchy i pierścienie węglowodorowe obniżają rozpuszczalność kompleksu w wodzie zwiększają jego rozpuszczalność w tłuszczach i niektórych rozpuszczalnikach organicznych. Przez odpowiednie rozmieszczenie w cząsteczce grup hydrofilowych i hydrofobowych otrzymuje się syntetyczne związki chelatujące o pożądanej rozpuszczalności.

Ważna, z punktu widzenia aktywności biologicznej, wybiórczość chelatowania zależy m. in. od ładunku i średnicy kationu metalu oraz od obecności lub nieobecności grup chemicznych o dużej objętości

w sąsiedztwie atomów będących donorami (Albert, 1961). Ponadto niektóre jony metali łatwiej wiążą się z tlenem, inne z azotem czy siarką.

Zależności wpływające na wybiórczość chelatowania znajdują odbicie w liczbie będącej stałą równowagi reakcji chelatowania. Wraz ze wzrostem stałej równowagi rośnie ilość metalu wiązanego przez dany związek chelatujący, a maleje ilość pozostającego w postaci kationowej. Stałe równowagi metali z poszczególnymi związkami chelatującymi (Furia, 1964) obrazują w pewnym stopniu wybiórczość chelatowania. Metal o wyższej stałej równowagi wypiera z kompleksu metal o niższej stałej (tab. 2).

Chelaty w nawożeniu gleby

Ze względu na istnienie tzw. łańcucha żywieniowego dla kompletności obrazu, mówiąc o chelatach w żywieniu zwierząt i ludzi, należy również wspomnieć o próbach stosowania syntetycznych związków chelatujących w żywieniu roślin, ponieważ istnieje teoretyczna możliwość przechodzenia tych związków z roślin do dalszych ogniw łańcucha.

Nawożenie mineralne gleby z zastosowaniem syntetycznych związków chelatujących stosowane jest głównie dla wprowadzania żelaza do gleb bogatych w wapń, na których u drzew owocowych występuje niedobór żelaza, bez względu na ogólną jego zawartość w glebie (Pejve, 1960).

Wersenian żelaza jest kompleksem dobrze rozpuszczalnym i trwałym przy odczynie obojętnym i słabozasadowym. Żelazo w tej postaci przenika do tkanek rośliny, uwalniając się z kompleksu w liściach lub łodygach pod wpływem światła.

Mikroelementy w roślinach są w postaci naturalnych chelatów z szeregiem kwasów organicznych, np. jabłkowym, cytrynowym, aminokwasami i in. Korzenie roślin wydzielają do otaczającego środowiska niewielkie ilości kwasów organicznych, które wpływają na rozpuszczalność i wchłanianie mikroelementów. Prawdopodobnie kwasy te tworzą z metalami chelaty. Również mikroorganizmy w glebie mogą wydzielać substancje chelatujące. Dodatek niektórych syntetycznych związków chelatujących ułatwia roślinom wchłanianie mikroelementów z gleby. Dla dwuwartościowych jonów żelaza, miedzi, cynku, manganu i kobaltu odpowiednim związkiem chelatującym okazał się EDTA i związki pokrewne.

Chelaty w żywieniu zwierząt

Składniki mineralne surowców paszowych związane są w kompleksy z szeregiem naturalnych związków chelatujących. Naturalne związki chelatujące mogą polepszać lub pogarszać wykorzystanie niezbędnych dla organizmu zwierzęcia składników mineralnych. Zaobserwowano większe

Tabela 2

Stale równowagi kompleksów z metalami

Związek chelatujący	Mg	Ca	Mn ⁺²	Fe ⁺²	Co ⁺²	Zn	Cu	Ni	Fe ⁺³
EDTA	8,7	10,7	14,0	14,3	16,3	16,5	18,8	18,6	25,7
Kwas cytrynowy	2,8	3,5	3,4	3,2	4,4	4,5	6,1	4,8	10,9
Kwas winowy	1,2	1,7	—	—	2,1	1,4	3,2	—	—
Polifosforan	3,2	3,0	5,5	3,0	3,0	2,5	3,5	3,0	—
Pyrofosforan	5,7	5,0	—	—	—	8,7	6,7	5,8	22,2
Kwas szczawiowy	2,4	3,0	4,1	—	5,5	—	8,9	7,2	18,5
Kwas aminoocetowy	—	1,4	3,0	—	4,4	4,8	8,1	5,6	—
Cysteina	—	—	—	11,0	9,1	9,9	19,4	—	—
Kwas glutaminowy	1,9	1,4	2,8	4,1	4,6	5,0	7,4	5,5	—

zapotrzebowanie na cynk u kurcząt otrzymujących wyodrębnione białko sojowe, niż u spożywających paszę, w której źródłem białka była żelatyna, kazeina lub białko jaja. Przypisywano to ujemnemu wpływowi zawartych w soli fitynianów wiążących cynk w kompleks chelatowy (O'Dell i Savage, 1957; Moeller i Scott, 1958). Również mączka sezamowa zawierała czynnik obniżający wykorzystanie cynku z dawki paszowej (Lease i in., 1960). Naturalne związki chelatujące zmieniały również wykorzystanie innych kationów zawartych w paszach, jak wapń, żelazo, miedź i mangan (Wasserman, 1962; Davis i in. 1962 b; Miles i Watts, 1964).

Przypuszczano również, że część tzw. „nieznanych czynników wzrostowych” zawartych np. w wywarze gorzelnianym — to naturalne związki chelatujące, których działanie polega na zwiększaniu przyswajalności składników mineralnych (Pecht, 1966) lub znoszeniu wzajemnego antagonistycznego działania poszczególnych pierwiastków. Dowodziłoby to słuszności stwierdzenia Roine i Ahlstroma (1969), że wzajemnego oddziaływania składników mineralnych nie można ograniczać do zależności między parami czy trójkami pierwiastków, takimi jak wapń-fosfor-magnez czy żelazo-miedź. Podjęto więc próby wprowadzenia do żywienia zwierząt syntetycznych związków chelatujących, głównie EDTA. Miały one konkurować w wiązaniu metali ze związkami naturalnymi, przeszkadzającymi w prawidłowym wykorzystaniu przez organizm zwierzęcia składników mineralnych zawartych w surowcach paszowych i mieszkankach mineralnych.

Przeprowadzono szereg doświadczeń, z których większość dowiodła korzystnego wpływu określonych dawek EDTA na produkcję zwierzęcą. I tak dodatek 0,1% EDTA (1000 cz.n.m.) zwiększał przyrosty kurcząt żywionych paszą kazeinowo-żelatynową o niskiej zawartości cynku i z dodatkiem kwasu fitynowego (O'Dell i in., 1964).

Dodatek 300 cz.n.m. EDTA do dawki paszowej, zawierającej wyodrębnione białko sojowe i tylko 5 cz.n.m. cynku, powodował przyrosty kurcząt prawie równe przyrostom uzyskanym przy skarmianiu paszy zawierającej 60 cz.n.m. cynku, bez dodatku EDTA (Scott i Zeigler, 1963). Podobne polepszenie wykorzystania cynku z dawek paszowych z dodatkiem EDTA zaobserwowano i w innych doświadczeniach (Kratzer i in., 1959; Vohra i Kratzer, 1964).

Davis i in. (1962 a) stwierdzili u kurcząt dodatni wpływ EDTA na wykorzystanie cynku, manganu i miedzi z paszy zawierającej wyodrębnione białko sojowe. Dodatek EDTA obniżał zapotrzebowanie ptaków na te pierwiastki, nie wpływał jednak na wykorzystanie żelaza, które było dostępne z białka sojowego również bez dodatku EDTA. Że kwas wersenowy i jego homologi z powodzeniem konkurowały z zawartymi

w białku sojowym związkami wiążącymi metale, dowodzi obniżenie ich zawartości w białku przemywanym wodą i dwusodową solą kwasu etylenodwuaminoczworoocowego (EDTA) lub dwuetylenotrójaminopięcioocowego (DTPA) (Davis i in., 1962 b).

Tabela 3

Obniżenie zawartości składników mineralnych w przemywanym białku sojowym (w %)

Rozpuszczalnik	Zn	Mo	Mn	Ca	Mg	Cu	Fe
Woda	35	40	75	85	95	—	—
Roztwór soli sodowej chelatora	100	70	80	85	95	65	50

Dane te wskazują na większe powinowactwo większości badanych metali do wymienionych syntetycznych związków chelatujących niż do naturalnych, zawartych w białku sojowym.

Wyniki szeregu doświadczeń pozwalających stwierdzić dodatni wpływ EDTA na wykorzystanie cynku przez drób przytacza Foll (1966 d). Zastąpienie zwykłej mieszanki mineralnej mieszanką chelatowaną w doświadczeniu na 5 000 nioskach dało następujące wyniki: produkcja jaj — wzrost o 1,4%, obniżenie zużycia paszy na tuzin jaj o 0,11 funta, obniżenie liczby odrzutów o 0,47%. W tabeli 4 zamieszczono wyniki uzyskane w doświadczeniach na brojlerach w czasie 8-tygodniowego tuczu.

Tabela 4

Wpływ chelatowania mieszanki mineralnej na tucz brojlerów

Wyszczególnienie	Grupa kontrolna		Mieszanka chelatowana
	I	II	
Śmiertelność	0,79%	1,57%	1,18%
Średni ciężar	2,685 lb	2,736 lb	2,843 lb
Ilość paszy na jednostkę przyrostu	2,40	2,40	2,29
Koszt paszy w centach na funt przyrostu	10,59	10,69	10,13

Foll (1966 d) przypuszcza, że wprowadzenie EDTA do paszy dla drobiu nie tylko czyni dostępnym cynk zawarty w nierozpuszczalnych kompleksach ze związkami naturalnymi, ale chroni przed inaktywacją cynk

dodany w mieszance mineralnej. Wskazują na to wyniki doświadczeń zamieszczone w tabeli 5.

Tabela 5

*Wpływ dodatku cynku i EDTA do startera dla drobiu
na przyrosty i występowanie perosis*

Dodatek cynku (cz.n.m.)	Dodatek ETDA	Przyrosty (g)	Wskaźnik perosis
0	0	162	2,4
20	0	259	2,9
40	0	272	1,8
0	227	308	0,9
20	227	295	1,4
40	227	294	0,8

Ely (1952) opatentował paszę dla kurcząt z dodatkiem 15—200 cz.n.m. trój- i czterosodowej soli EDTA, zwiększającą przyrosty. Optymalny efekt uzyskiwał przy dodatku 30—90 cz.n.m.

Wysokie dawki EDTA (2500 cz.n.m. i więcej) znacznie obniżały przyrosty brojlerów (Greene i in., 1965). Działanie to częściowo znosił dodatek cynku i manganu, co wskazuje, że nadmiar EDTA pogarsza wykorzystanie tych metali.

Waldroup i in. (1968), dodając do paszy zbożowo-sojowej dla brojlerów 1000—1600 cz.n.m. EDTA nie uzyskali zwiększenia przyrostów i lepszego wykorzystania paszy, a nawet w jednym doświadczeniu dodatek 1600 cz.n.m. pogarszał te wskaźniki.

Jak podaje Foll (1966 d), chelatowanie mieszanki pierwiastków śladowych znosiło u 5-tygodniowych indyków objawy schorzenia zwanego T.S.65 lub „Y disease”, w czasie której ptaki tracą pióra. Po 28 dniach pióra odrastały i zawierały około 2,5 raza więcej manganu niż u grupy kontrolnej otrzymującej paszę bez chelatów. Nasunęło to przypuszczenie, że przyczyną schorzenia może być inaktywacja manganu w dawce paszowej.

EDTA łagodził też u indycząt objawy zatrucia nadmiernymi dawkami cynku i miedzi, choć dodany w większej ilości obniżał przyrosty (Vohra i Kratzer, 1968). Dodatni wpływ EDTA na wykorzystanie cynku stwierdzono również u trzody chlewnej. Valdmanis (1967) przypuszcza, że związkami obniżającymi przyswajalność cynku nie jest sam kwas fitynowy, ale że w skład nieprzyswajalnego kompleksu wchodzi i inne składniki, a dodatni wpływ EDTA polega na blokowaniu jonów wapnia.

Szereg prac badawczych dotyczących wykorzystania składników mineralnych przez przeżuwacze opisał Foll (1966 a, b, c, d). Przytoczył szereg wyników stwierdzających, że nieprzyswajalność szeregu pierwiastków z niechelatowanych mieszanek mineralnych powoduje różne objawy niewłaściwego odżywiania mineralnego, m. in. bezpłodność. Wprowadzenie chelatowanych mieszanek mineralnych wpływało ponadto na zwiększenie energii strawnej dawek paszowych.

Szczególnie dodatek melasy do paszy obniżał wykorzystanie składników mineralnych, podnosił zużycie paszy na jednostkę przyrostu i obniżał średnie dzienne przyrosty.

Foll (1966 a) przeprowadził również badania *in vitro*, porównując mieszanekę mineralną chelatowaną z niechelatowanymi.

Jedno z doświadczeń dotyczyło rozpuszczalności siarczanów i chelatów w obecności melasy i dowiodło lepszej rozpuszczalności chelatów w przypadku większości badanych metali (tab. 6).

Tabela 6

*Rozpuszczalność siarczanów i chelatów w obecności
0,5% melasy (%)*

	Ca	Cu	Fe	Mn	Zn
Siarczany	73,5	89,9	6,4	7,9	4,9
Chelaty	100,0	88,4	89,9	97,4	100,0

Drugie doświadczenie polegało na mieszanii soku żwacza z mieszaneką mineralną chelatowaną względnie z jedną z 3 rynkowych mieszanek niechelatowanych (x, y, z), wytrząsaniu przez 30 minut, odwirowaniu i spektrofotometrycznym oznaczaniu metali w supernatancie. Wyniki potwierdziły lepszą rozpuszczalność chelatów większości metali (tab. 7).

Badano też wpływ dodatku EDTA na szereg organów i tkanek cieląt normalnych i z niedoborem cynku (Miller i in., 1968; Hiers i in., 1968). Badania, poza wpływem dodatku EDTA, dotyczyły również wpływu dodatku kadmu. Stwierdzono dodatni wpływ EDTA względnie kadmu na zniesienie objawów niedoboru.

Jedna z firm zachodnich (FMS Limited Farm Supplies) wprowadziła na rynek chelatowany preparat zastępczy mleka dla cieląt pod nazwą „Superfat Milk Equivalent”, stwierdzając że podnosi on ciężar cieląt odstawionych z 10 do 20 funtów. Preparat zawiera mieszanekę tłuszczów zwierzęcych i roślinnych z odtłuszczonym mlekiem, homogenizowaną przed suszeniem, cukrowce poddane działaniu enzymów oraz dodatek chelatowanych pierwiastków śladowych, zawierający jod, cynk, mangan,

Tabela 7

Rozpuszczalność rynkowych i chelatowanych mieszanek mineralnych
w soku żwacza przy różnym pH

Metal		Sok żwacza	Sok żwacza plus			
			chelaty	miesz. x	miesz. y	miesz. z.
Mangan	Teoretyczna ilość cz.n.m.	0,00	47,40	39,00	3,40	94,00
	Znaleziona przy pH 8,02 cz.n.m.	0,05	48,40	15,40	0,56	17,90
	Znaleziona przy pH 6,00 cz.n.m.	0,06	48,99	22,50	2,13	65,36
	% odzyskania przy pH 8,02	0,00	102,00	39,50	16,50	19,00
	% odzyskania przy pH 6,00	0,00	103,00	57,50	60,90	69,50
Cynk	Teoretyczna ilość cz.n.m.	0,00	67,40	16,00	1,60	372,00
	Znaleziona przy pH 8,02 cz.n.m.	0,07	64,60	0,25	0,12	0,13
	Znaleziona przy pH 6,00 cz.n.m.	0,18	56,14	2,37	0,25	11,05
	% odzyskania przy pH 8,02	0,00	95,70	1,10	3,10	0,02
	% odzyskania przy pH 6,00	0,00	83,00	13,70	4,40	2,90
Żelazo	Teoretyczna ilość cz.n.m.	0,00	58,60	89,20	20,00	106,00
	Znaleziona przy pH 8,02 cz.n.m.	0,10	54,20	6,46	0,35	0,35
	Znaleziona przy pH 6,00 cz.n.m.	0,58	50,21	22,63	0,36	0,29
	% odzyskania przy pH 8,02	0,00	92,50	7,20	1,86	0,30
	% odzyskania przy pH 6,00	0,00	84,70	24,70	0,00	0,00
Miedź	Teoretyczna ilość cz.n.m.	0,00	12,00	1,80	1,00	22,40
	Znaleziona przy pH 8,02 cz.n.m.	0,36	6,54	1,02	0,41	0,40
	Znaleziona przy pH 6,00 cz.n.m.	0,34	4,43	0,49	0,46	0,34
	% odzyskania przy pH 8,02	0,00	51,50	36,70	5,00	0,18
	% odzyskania przy pH 6,00	0,00	34,10	8,30	12,00	0,00
Kobalt	Teoretyczna ilość cz.n.m.	0,00	11,66	2,00	0,60	0,40
	Znaleziona przy pH 8,02 cz.n.m.	0,00	10,70	0,10	0,38	0,10
	Znaleziona przy pH 6,00 cz.n.m.	0,10	10,64	0,65	0,27	0,48
	% odzyskania przy pH 8,02	0,00	92,20	0,00	53,30	0,00
	% odzyskania przy pH 6,00	0,00	31,70	32,50	45,00	120,00

kobalt, żelazo, miedź i magnez. Przeprowadzono próby na ponad 500 000 cieląt w Stanach Zjednoczonych i Zjednoczonym Królestwie. Preparat pomagał przezwyciężyć zaburzenia metaboliczne, spowodowane niedo-

borem mikroelementów, obniżał o 5% śmiertelność, podnosił o 7% strawność paszy, o 5—10% przyrosty, polepszał przemienność paszy o 0,5 na 1 funt skarmiany (wg „New Chelated Feed for Calves”, 1968).

Chelaty w żywności

Z chelatami w żywności stykamy się w dwojaki sposób. Stanowią one naturalne składniki żywności albo dostają się do niej w procesie produkcji lub przetwarzania.

Po pierwsze w zasadzie wszystkie tzw. składniki mineralne, z wyjątkiem sodu, znaleziono w żywności i organizmach żywych w kompleksach z naturalnymi związkami chelatującymi (Furia, 1964).

Naturalne związki chelatujące, to m. in.: kwasy wielokarboksylowe (szczawiowy, bursztynowy i in.), kwasy hydroksykarboksylowe (cytrynowy, winowy, askorbinowy, jabłkowy, salicylowy i in.), związki polihydroksylowe (cukrowce, glicerol, pirokatechina, inozytol), związki polifosforanowe (sześciometafosforan, pirofosforan, kwas fitynowy, ATP), aminocukry, aminokwasy, peptydy, białka, flawonoidy, porfiryryny i inne.

Mechanizm powstawania i trwałość kompleksów metali z aminokwasami, białkami i innymi ligandami, będącymi naturalnymi składnikami żywności i organizmów, są coraz bardziej szczegółowo badane (McCormick i in., 1969).

Drugą przyczyną zainteresowania żywieniowców chelatami jest fakt, że do żywności w czasie produkcji i przetwarzania mogą dostawać się lub być celowo dodawane syntetyczne związki chelatujące.

Czy wprowadzenie syntetycznych związków chelatujących do żywienia zwierząt i roślin może wpływać tylko pośrednio na żywienie człowieka, to jest czy tylko zwiększy produkcję roślinną i zwierzęcą oraz być może zawartość niektórych składników mineralnych w żywności, czy też należy spodziewać się przechodzenia syntetycznych związków chelatujących do produktów żywnościowych — to sprawa do wyjaśnienia.

Że przechodzenie syntetycznych chelatów z gleby do rośliny jest możliwe, dowodzi fakt, że EDTA zastosowany przy wodnej uprawie rajgrasu w celu utrzymania żelaza w stanie rozpuszczalnym został wykryty w roślinie w postaci kompleksu Zn-EDTA (Bremner i Knight, 1970).

Syntetyczne związki chelatujące znajdują też zastosowanie w przetwórstwie żywności, głównie jako środki konserwujące.

Jednak w miarę ulepszania technologii i wyposażenia, np. w przemyśle tłuszczowym, do tłuszczów i olejów dostaje się coraz mniej metali i w związku z tym zmniejsza się potrzeba stosowania syntetycznych związków chelatujących (Furia, 1968).

W tabeli 8 przedstawiono niektóre produkty spożywcze, do których wolno dodawać pochodne kwasu wersenowego w Stanach Zjednoczonych AP (Furia, 1964).

Tabela 8

Część produktów spożywczych, do których wolno dodawać pochodne EDTA
w Stanach Zjedn. AP (dane z 1964 r.)

Produkt spożywczy	Cel, dla którego dodaje się EDTA	Ograniczenie ilości (części na milion)	
		Na ₂ Ca EDTA	Na ₂ EDTA
Fasola zwykła konserwowana w puszkach	utrzymanie barwy	nie dozwolone	165
Napoje gazowane w puszkach	polepszenie utrzymania smaku i zapachu, opóźnienie korozji puszek, przedłużenie trwałości barwników	33	nie dozw
Mięso krabów, gotowane w puszkach	opóźnienie powstania struwitu, utrzymanie barwy	275	nie dozw
Majonez	utrzymanie zapachu i smaku, ochrona przed jęłczeniem	75	nie dozw
Oleomargaryna	utrzymanie zapachu i smaku	75	nie dozw
Sałatka ziemniaczana	polepszenie trwałości	100	nie dozw
Ziemniaki (białe, mrożone)	utrzymanie barwy	nie dozw	100
Pasty do kanapek	utrzymanie smaku i zapachu, ochrona przed jęłczeniem, utrzymanie warzyw w stanie kruchości	100	100
Sosy	utrzymanie zapachu i smaku, ochrona przed jęłczeniem	75	75
Krewetki (gotowane w puszkach)	opóźnienie powstania struwitu, utrzymanie barwy	250	nie dozw
Roztwory witamin zawierające B ₁₂	utrwalenie witaminy B ₁₂	nie dozw	150

Mechanizm działania kwasu wersenowego jako środka konserwującego polega na tzw. sekwestrowaniu jonów metali ciężkich, tj. przeciwdziałaniu ich katalitycznemu wpływowi w procesach utleniania przez zmniejszenie ich reaktywności.

Wpływ pochodnych kwasu wersenowego na trwałość i właściwości organoleptyczne poszczególnych grup produktów spożywczych jest następujący (Furia, 1964).

Tłuszcze, oleje, tłuszcze cukiernicze: EDTA nie jest wprawdzie przeciwutleniaczem, ale działa synergetycznie z przeciwutleniaczami, takimi jak BHT, BHA, kwas askorbinowy i izoaskorbinowy i in.

Produkty ziemniaczane: choć zmianom barwy produktów ziemniaczanych częściowo zapobiega dodatek kwasu cytrynowego, askorbinowego, kwaśnego pirofosforanu sodu, kwaśnego siarczynu i ałunu, wersenian sodu działa jednak skuteczniej.

Koncentraty witaminowe spożywcze i farmaceutyczne, witaminy naturalnie występujące: EDTA chroni przed katalizującym wpływem metali na utlenianie, np. kwasu askorbinowego w obecności miedzi; dodatek EDTA przy wyciskaniu soków z pomidorów i owoców chroni zawartą w nich witaminę C; EDTA chroni też witaminy rozpuszczalne w tłuszczach i witaminy grupy B.

Ryby, skorupiaki, małże: EDTA zapobiega odbarwianiu po gotowaniu, związanemu z wysoką zawartością metali; zapobiega mięknięciu krewetek na szereg lat, powstawaniu szklistych kryształów struwitu (fosforan magnezowo-amonowy), w konserwach z ryb i skorupiaków.

Produkty mleczne: EDTA zapobiega powstawaniu niewłaściwego smaku i zapachu wskutek utleniania katalizowanego przez miedź, ale nie zapobiega zmianom wywołanym przez działanie światła słonecznego; EDTA hamuje gęstnienie zachodzące w czasie przechowywania mleka skondensowanego, zwiększa pianistość odtworzonego mleka zbieranego, przeciwdziała koagulacji cieplnej mleka w czasie przeróbki, nie wpływa natomiast na koagulację mleka przez pepsynę, hamuje koagulację mleka odtworzonego za pomocą twardej wody.

Jaja: tendencja masy jajowej do koagulacji podczas poprzedzającej mrożenie sterylizacji cieplnej jest zmniejszana przez dodatek Na_2EDTA ; sole wapniowe EDTA dodane po sterylizacji chronią przed utlenianiem i innymi niekorzystnymi zmianami w czasie przechowywania w stanie zamrożonym.

Puszkowane warzywa strączkowe: oddziaływanie metali na składniki organiczne powoduje w czasie przetwarzania zmiany barwy i uszkodzenia skórki; w czasie przechowywania warzywa w puszkach nadal ciemnieją, a czasem powstaje niewłaściwy smak; można temu zapobiec dodając Na_2EDTA do wody do moczenia strączkowych albo — jak to się robi ostatnio — do słonej zalewy.

Piwo: EDTA zapobiega niepożądanym zmianom w czasie przechowywania (mętnienie, burzenie się).

Napoje gazowane: w puszkowanych EDTA zmniejsza zmiany smaku i zapachu, odbarwienie i mętnienie w czasie mieszania z alkoholem, korozję puszek.

Produkty mięsne: EDTA zmniejsza aktywność koagulujących enzy-

mów aktywowanych przez wapń, co ma znaczenie w produkcji kiełbas; Na_2EDTA zapobiega szarzeniu powierzchni past mięsnych i zawierających mięso odżywek dla zwierząt domowych, gdy jego roztworem spryskuje się powierzchnię; dodatek azotynów wzmacnia to działanie; w mielonej wołowinie mrożonej uzyskuje się stabilizację barwy, smaku i zapachu przez równoczesne zastosowanie kwasu askorbinowego i Na_2EDTA .

Do wyrobów mięsnych, takich jak szynka i parówki dodaje się sole magnezu (zwykle fosforan), które przeprowadza się w stan rozpuszczalności za pomocą EDTA. EDTA opóźnia również tworzenie się nitrozo-hemoglobiny w wędlinach.

Konserwy owocowe i warzywne: EDTA zapobiega zmianom barwy warzyw i owoców (jak np. ciemnieniu jabłek, różowieniu brzoskwiń i ciemnieniu kalafiorów, brukselki i buraków); nie wpływa na zmiany barwy wywołane rozkładem chlorofilu.

Wino i ocet: dodatek EDTA wiąże żelazo i miedź, które powodują ciemnienie i inne zmiany w winie, ponieważ katalizują procesy utleniania; Na_2EDTA zapobiega mętnieniu i tworzeniu się osadu w niedestylowanym occie, nie zmieniając jego smaku i zapachu; osad i zmętnienie powstaje wskutek wytrącania się białek i związków metali z taniną i fosforanami.

EDTA stosuje się także do czyszczenia urządzeń i aparatury w przemyśle spożywczym.

Wodny roztwór EDTA usuwa kamień piwny ze zbiorników i przewodów. Roztwór alkaliczny rozpuszcza osady szczawianów, siarczanów, fosforanów i węglanów wapnia. Na_2EDTA nie powoduje korozji stali. W przemyśle mleczarskim i cukrowniczym używa się go także do usuwania osadów.

Inne zastosowania: EDTA polepsza krystalizację cukru rozkładając cukrzany metali; użyty z BHA stabilizuje wyciągi korzenne; zmieszanie Na_2EDTA z inozynianem sodu daje substancję aromatyzującą, bardzo trwałą.

Na_2EDTA poprawia klarowność i ubijalność żelatyny i opóźnia niepożądane zmiany w koncentratkach deserowych zawierających skleikowaną skrobię.

Również naturalne związki chelatujące stosowane są jako dodatki do żywności dla zapobieżenia samoutlenianiu zachodzącemu w czasie przechowywania. Kwas cytrynowy może być w St. Zjedn. A.P. stosowany bez ograniczeń (Furia, 1968), często również dodawany jest kwas L-askorbinowy. Działania tego ostatniego nie można tłumaczyć wyłącznie jego właściwościami redukującymi, ponieważ w niektórych produktach sprzyja utlenianiu. Właściwości antyoksydacyjne zawdzięcza więc również swym zdolnościom do kompleksowania metali (Pfeilsticker, 1969).

Biologiczne właściwości chelatów

Zwolennicy stosowania pochodnych kwasu wersenowego w przetworstwie żywności piszą o zupełnej jego nieszkodliwości w stosowanych ilościach do żywności (Furia, 1964; Oser, 1961).

Niemniej istnieje szereg dowodów, że drobnocząsteczkowe chelaty odgrywają poważną rolę w pobieraniu i transporcie metali w układach biologicznych (Saltman, 1965).

Modyfikującego działania związków kompleksujących należy spodziewać się na trzech poziomach:

- 1) trawienie i wchłanianie,
- 2) metabolizm,
- 3) wydalanie.

Chelaty a wchłanianie składników mineralnych. Fakt wiązania składnika mineralnego w związek kompleksowy może dodatnio lub ujemnie wpływać na strawność i wchłanianie tego składnika.

Poszczególne odcinki przewodu pokarmowego mają różną zdolność wchłaniania pierwiastków śladowych. Różnice te przypisywane są częściowo różnicom pH w tych odcinkach (Kroe i in., 1966). Bremner i Knight (1970) przypuszczają, że różnice pH działają w tym przypadku, między innymi, poprzez zmianę właściwości kompleksów. Jak wiadomo, pH wpływa na trwałość i rozpuszczalność kompleksów oraz na wybiórczość kompleksowania.

Szereg prób modelowych nad wpływem postaci chemicznej na bierne wchłanianie miedzi wykonano za pomocą dializy ciągłej przez błony półprzepuszczalne sztuczne i naturalne (Weser i Kirchgessner, 1965 a, b, c, Kirchgessner i Weser, 1965 a, b, c; Kirchgessner, Weser i Müller, 1967 a, b). Stwierdzono zróżnicowany wpływ różnego rodzaju składników żywności, m. in. związków o właściwościach chelatujących na szybkość przechodzenia miedzi.

W doświadczeniach na szczurach niewielki dodatek EDTA do karmy polepszał wykorzystanie miedzi (Skorkowska-Zieleniewska i in., 1969). Według Harrisa i Sass-Kortsaka (1967) skompleksowanie miedzi z aminokwasami wpływa na pobieranie jej przez wątrobę.

Związki chelatujące zawarte w jednych produktach mogą konkurować ze związkami chelatującymi zawartymi w innych produktach i utrudniającymi wchłanianie składników mineralnych. Tym należałoby prawdopodobnie tłumaczyć dodatni wpływ soków cytrusowych na wchłanianie żelaza z chleba (Callender i Werner 1968, Elwood i in., 1968), czy podobne działanie produktów zwierzęcych na wchłanianie żelaza z diety zawierającej kukurydzę lub fasolę. Okazało się, że nawet dodatek występujących w mięsie ryb aminokwasów siarkowych znacznie podnosił wchłanianie żelaza zawartego w fasoli (Layrisse i in., 1968). Skompleks-

sowanie żelaza z glicyną i seryną ma bezpośrednio wpływać na pobieranie go przez śluzówkę jelitową (Brown i Rother, 1963).

Tam, gdzie głównym źródłem żelaza są produkty zbożowe, występuje niedokrwistość, wskutek złej przyswajalności żelaza w obecności fitynianów (Venkatachalam, 1968).

Żelazo zawarte w chlebie było słabiej wchłaniane, gdy wraz z chlebem podawano świeżo ugotowane jajko (Elwood i in., 1968). Być może związane jest to z faktem występowania wśród białek jaja takich, których przeznaczeniem wydaje się być działanie w pewnym sensie bakteriostatyczne (Lowe, 1958). Jedno z nich wiąże żelazo niezbędne dla prawidłowego rozwoju niektórych drobnoustrojów.

Należy przypuszczać, że trwałość, wybiórczość i rozpuszczalność kompleksów żelaza z różnego rodzaju związkami chelatującymi zawartymi w pożywieniu, takimi jak kwas askorbinowy, fityniany, porfiryny czy aminokwasy, odgrywa poważną rolę w mechanizmie wchłaniania, w który włączone są na pewnym etapie specyficzne substancje znajdujące się w organizmie. Stwierdzono na przykład, że dodatek kwasu askorbinowego podnosi, a desferrioksaminy obniża wchłanianie żelaza z pszenicy, kukurydzy i soi, nie wpływa natomiast na wchłanianie z kompleksu porfiryнового zawartego w hemoglobinie (Kuhn i in., 1968). Stwierdzono również, że dodatni wpływ kwasu askorbinowego na wchłanianie żelaza zawartego w chlorku żelazowym zależy od właściwego stężenia jonów wodorowych, koniecznego do utworzenia rozpuszczalnego kompleksu żelaza z kwasem askorbinowym. Odczynem właściwym jest tu kwaśny odczyn soku żołądkowego. Natomiast w przypadku, jak wiadomo, lepiej wchłanianego chlorku żelazowego kompleks ten powstaje nawet w alkalicznym środowisku dwunastnicy (Conrad i Schade, 1968).

Dyskutowany jest również charakter wiązania żelaza przez substancje naturalne, obecne w organizmie zwierzęcym i ludzkim, regulujące wchłanianie. Wiązanie to według jednych jest luźnym połączeniem żelaza koloidalnego z glikoproteinami, według innych ma się do czynienia z chelatowym wiązaniem żelaza z cukrowcą częścią cząsteczki (Luke i in., 1968; Wynter i Williams, 1968, a b; Morgan i in., 1969). Kwestionowany jest również mechanizm regulacji wchłaniania żelaza przez unieruchamianie go w postaci związku z mukoproteidem, na rzecz regulacji drogą aktywnego wchłaniania za pomocą substancji wiążącej (Murray i Stein, 1968). Niektórym badaczom udało się nawet wykryć dwie różne substancje białkowe, wiążące żelazo, w śluzówce jelitowej szczura (Pearson i Reich, 1969).

Stwierdzono też na zwierzętach dodatni wpływ kwasu wersenowego i jego soli na wykorzystanie cynku z produktów roślinnych.

Na podstawie wyników badań innych autorów oraz prac własnych,

jeden z badaczy (O'Dell, 1969) stwierdził, że niemożliwe jest określenie zapotrzebowania na cynk dla wszystkich składów diety, ponieważ składniki diety wpływają na przyswajalność cynku. Uważa, że czynniki chelatujące, zarówno naturalne jak syntetyczne, mogą wpływać korzystnie jeżeli tworzą rozpuszczalne kompleksy o takiej trwałości, że mogą współzawodniczyć z fitynianem w walce o jon cynkowy i mogą przekazywać ten jon śluzówce jelitowej.

W szeregu doświadczeń stwierdzono dodatni wpływ kwasu wersenowego na pozorną strawność wapnia, gdy w diecie szczurów obok wapnia obecny był szczawian sodu, dający z wapniem nierozpuszczalny osad (Varela i Murillo, 1967).

Dodatni wpływ kwasu wersenowego na wykorzystanie składników mineralnych w porównaniu z wykorzystaniem ich z prostych soli nieorganicznych często wiązany jest z lepszą rozpuszczalnością kompleksów kwasu wersenowego. Potwierdzono to w doświadczeniach *in vitro* nad rozpuszczalnością w soku żwacza 3 zwykłych mieszanek mineralnych i jednej chelatowanej (Foll, 1966 a — tab. 7).

Rola chelatów w metabolizmie. Istnieją poglądy, że proces mineralizacji kości i skorupy jajowej rozpoczyna się od chelatowego wiązania metali przez białko (Sporedo i Becker, 1970).

Działanie związków chelatujących nie kończy się więc na procesie wchłaniania.

Charakter chemiczny związku, w którym metal jest zawarty, określa również szybkość, z jaką metal zostanie włączony w kompleks białkowy o określonej roli w metabolizmie. Potwierdziły to doświadczenia na psach, którym podawano kobalt w postaci różnych związków (Merkulova i in., 1969).

Związki chelatujące wchłaniane z przewodu pokarmowego mogą ponadto wpływać na przemieszczanie się i aktywność pierwiastków śladowych i innych składników mineralnych. Mając niejednokrotnie większe powinowactwo do danego pierwiastka niż substancje biologicznie czynne, z którymi pierwiastek jest związany, mogą bądź to usuwać pierwiastek śladowy z jego naturalnego usytuowania powodując jego niedobór, bądź też wiązać go *in situ*, zakłócając jego normalną fizjologiczną funkcję. Przy czym różne substancje chelatujące mogą różnie oddziaływać na dany enzym i z różną łatwością przekraczać barierę błony komórkowej. Dlatego nie można uznać w pełni za uspokajające wyników badań *in vitro* opisanych przez Westerfelda (1961). Badał on wpływ różnych związków chelatujących, w tym związków, które mają być dodawane do żywności, na szereg metaloproteidów, szczególnie enzymów. Stwierdził, że przy fizjologicznym stężeniu jonów wodorowych większość żelaza, miedzi, cynku i molibdenu nie była usuwana z biologicznie czynnych metalopro-

teidów działaniem czynników chelatujących. Możliwy jest jednak również dodatni wpływ syntetycznych związków chelatujących w przypadku zaburzeń metabolicznych. Na przykład u pacjentów z zaburzeniami w metabolizmie tryptofanu stwierdzono polepszenie po podaniu wersenianu sodu (Price, 1961). Przypisano to oddziaływaniu na poprawę bilansu mineralnego.

Przy zaburzeniach w metabolizmie porfiryn, poprawa stanu chorych uzyskana po podaniu EDTA wiązana jest z faktem, że może on zastąpić wyczerpane naturalne substancje chelatujące, utrzymując równowagę mineralną organizmu (Peters, 1961).

Omawiając powyższe dwa doniesienia Meltzer (1961) suponuje, że rola syntetycznego związku chelatującego może polegać nie tylko na usuwaniu np. nadmiaru miedzi czy cynku, które hamowały aktywność czy syntezę pewnych układów enzymatycznych, ale również na ułatwieniu właściwego rozmieszczania i przemieszczania się metali w organizmie.

Podobnie dodatni wpływ EDTA w leczeniu chorób krążenia i tkanki łącznej przypisywany jest wpływowi wersenianu sodu na dystrybucję wapnia w organizmie. EDTA obniża poziom wapnia w surowicy krwi, co z kolei wywołuje wzmożenie, w granicach fizjologicznych, działania przytarczyc, wpływające również na bardziej dynamiczny ruch wapnia w organizmie (Boyle i in., 1961).

Podzielone są zdania na temat mechanizmu działania chelatów w miażdżycy. Jedni (Albert, 1961) sądzą, że ponieważ synteza cholesterolu z kwasu octowego jest w organizmie przyspieszana przez mangan, a opóźniana przez wanad i żelazo, wprowadzenie do diety niewielkiej ilości związku wiążącego mangan hamuje syntezę. Inni (Gould, 1961) kwestionują to wyjaśnienie sądząc raczej, że EDTA obniża zdolność osocza do przenoszenia cholesterolu. Jeszcze inni (Perry jr., 1961), stwierdzając korzystne działanie pochodnych EDTA (kompleks wapniowy soli sodowej) w miażdżycy, drogą obniżenia poziomu krążącego cholesterolu, nie przypisują temu znaczenia w opóźnianiu rozwoju schorzenia i nie uważają mechanizmu oddziaływania za dostatecznie wyjaśniony.

Warto nadmienić, że działanie szeregu znanych leków, m. in. środków bakteriostatycznych, ma według niektórych badaczy polegać na zdolności do chelatowego wiązania metali (Weinberg, 1961; Maynard, 1961). Między innymi stwierdzono synergizm EDTA z antybiotykami w ich aktywności przeciwbakteryjnej, co przypisuje się wpływowi EDTA na przepuszczalność błon bakteryjnych dla leków. Nie stwierdzono synergizmu tego typu w stosunku do drobnoustrojów opornych na działanie danego antybiotyku (Neu i Winshell, 1970).

Chelaty a wydalanie składników mineralnych. Próby zastosowania związków chelatujących w leczeniu wiążą się też z ich wpływem na wydalanie metali z organizmu, np. w przypadku zaburzeń związanych z nienormalnym nagromadzeniem się metalu prowadzącym do powstawania patologicznych złogów. I tak penicyllamina zwiększa wydalanie miedzi w moczu (Aposhian, 1961), kwas dwuetyloczteroaminopięciooctowy (DTPA) usuwa z organizmu nadmiar żelaza, a kwas wersenowy złogi wapnia (Moeller i Horwitz, 1960). Kwas ten uruchamia zresztą również wapń nie będący w nadmiarze. Wprowadzony do organizmu szczura obok szczawianu, w diecie bezwapniowej poważnie zwiększa wydalanie wapnia endogennego (Varela i Murillo, 1967). Ta zdolność kwasu wersenowego do usuwania wapnia z organizmu była nawet wykorzystywana do uzyskiwania doświadczalnego odwapniania (de Torrenté, 1969 a, b).

Innym wykorzystaniem wpływu syntetycznych związków chelatujących na wydalanie metali jest zastosowanie ich w przypadku zatrucia metalami. Proponuje się zastosowanie do tego celu wapniowego kompleksu wersenianu, aby uniknąć równocześnie odwapnienia organizmu.

Mechanizm działania wersenianu wapnia przy wychwytywaniu z organizmu metali o właściwościach toksycznych polega na wspomnianym już wypieraniu z kompleksu metalu o niższej stałej kompleksowania przez metal o wyższej stałej, dający kompleks o większej trwałości (Elbowicz-Waniewska, 1961).

Omówiono w piśmiennictwie zastosowanie syntetycznych związków chelatujących do leczenia zatruc ołowiem, arsenem, chromem, manganem, torem, uranem, niklem, plutonem i izotopami promieniotwórczymi strontu i lekkich lantanowców, takich jak cer-144 (Foreman, 1961; Kehoe, 1961; Hardy, 1961; Catsch 1961); stwierdzono jednak uszkodzenie nerek przy dłuższym stosowaniu EDTA i DTPA (Catsch, 1961).

W przypadku radiostrontu, dla całkowitego usunięcia go z kości w postaci chelatów, trzeba by równocześnie doprowadzić do znacznego odwapnienia, na co można sobie pozwolić u zwierząt doświadczalnych, ale nie u ludzi (Schubert, 1961).

Wnioski

1. Syntetyczne związki chelatujące okazały się w wielu przypadkach skutecznym środkiem przedłużającym trwałość żywności, szczególnie tam, gdzie niepożądane zmiany zachodzące w trakcie przechowywania związane są z oddziaływaniem składników mineralnych.

2. Wydaje się stwierdzony dodatni wpływ niektórych syntetycznych związków chelatujących w żywieniu roślin uprawnych i zwierząt przez ułatwienie zaopatrzenia ich w niezbędne składniki mineralne. Uwidocz-

nia się to szczególnie w tych przypadkach, gdy syntetyczne związki chelatujące znoszą ujemny wpływ niektórych związków zawartych w paszy na przyswajanie określonego składnika mineralnego.

3. Syntetyczne związki chelatujące znajdują prawdopodobnie szersze zastosowanie w leczeniu niektórych zaburzeń wchłaniania, metabolizmu i wydalania składników mineralnych oraz w przypadku zatruc metalami.

4. W związku z daleko idącą ingerencją związków chelatujących w gospodarkę mineralną organizmu decyzja wprowadzenia ich do żywności, np. w charakterze środków konserwujących, musiałaby być poprzedzona wyczerpującym badaniem wpływu, jaki dany związek może mieć na organizm.

5. Z tych samych względów należy zbadać, czy syntetyczne związki chelatujące, mające znaleźć zastosowanie w nawozach mineralnych i mieszankach paszowych, nie przechodzą do produkowanej w ten sposób żywności pochodzenia roślinnego i zwierzęcego.

6. Dowiedziona zależność między wykorzystaniem składników mineralnych z diety a obecnością w niej naturalnych i syntetycznych związków chelatujących uniemożliwia ustalenie zapotrzebowania na poszczególne składniki mineralne, bez uwzględnienia działania innych składników diety.

L I T E R A T U R A

1. Albert A.: Federation Proc. 1961 t. 20 suppl. 10 s. 137.
2. Aposhian H. V.: Federation Proc. 1961 t. 20 suppl. 10 s. 185.
3. Boyle A. J., Clarke N. E., Mosher R. E., McCann D. S.: Federation Proc. t. 20 suppl. 10 s. 243.
4. Bremner I., Knight A. H.: Br. J. Nutr. 1970 t. 24 nr 1 s. 279.
5. Brown E. B., Rother M. L.: J. Lab. clin. Med. 1963 t. 62 s. 357. (wg Bremner i Knight, 1970).
6. Callender S. T., Werner G. T.: Am. J. Clin. Nutr. 1968 t. 21 nr 10 s. 1170.
7. Catsch A.: Federation Proc. 1961 t. 20 suppl. 10 s. 206.
8. Conrad M. E., Schade S. G.: Gastroenterology 1968 t. 55 nr 1 s. 35.
9. Davis P. N., Norris L. C., Kratzer F. H.: J. Nutrition 1962 (a) t. 77 nr 2 s. 217.
10. Davis P. N., Norris L. C., Kratzer F. H.: J. Nutr. 1962 (b) t. 78 nr 4 s. 445.
11. Elbowicz-Waniewska Z.: Polski Tygodn. Lek. 1961 t. 16 nr 17 s. 646.
12. Elwood P. C., Newton D., Eakins J. D., Brown D. A.: Am. J. Clin. Nutr. 1968 t. 21 nr 10 s. 1162.
13. Ely C. M.: Method of accelerating the growth of chicks. U. S. Patent No. 2,604,401, July 22, 1952.
14. Foll N. J.: Fertil. Feed. Stuffs J. 1966(a) nr 14 s. 487.
15. Foll N. J.: Fertil. Feed. Stuffs J. 1966(b) nr 15 s. 524.
16. Foll N. J.: Fertil. Feed. Stuffs J. 1966(c) nr 16 s. 555.
17. Foll N. J.: Fertil. Feed. Stuffs J. 1966(d) nr 17 s. 594.
18. Foreman H.: Federation Proc. 1961 t. 20 suppl. 10 s. 191.

19. Furia T. E.: Food Technology 1964 t. 18 nr 12 s. 50.
20. Furia T. E.: Handbook of food additives. Cleveland, Ohio, 1968.
21. Graddon D. P.: Wstęp do chemii związków kompleksowych. Warszawa, 1963.
22. Gould R. G.: Federation Proc. 1961 t. 20 suppl. 10 s. 252.
23. Greene D. E., White C. L., Stephenson E. L.: Poultry Sci. 1965 t. 44 nr 5 s. 1374.
24. Hardy H. L.: Federation Proc. 1961 t. 20 suppl. 10 s. 199.
25. Harris D. M. I., Sass-Kortsak A.: J. clin. Invest. 1967 t. 46 s. 659 (wg Bremner i Knight, 1970).
26. Hiers J. M. jr, Mille W. J., Blackmon D. M.: J. Dairy Sci. 1968 t. 51 nr 2 s. 205.
27. Kohoe R. A.: Federation Proc. 1961 t. 20 suppl. 10 s. 196.
28. Kirchgessner M., Weser U.: Z. Tierphys. Tierern. u. Futtermittelk. 1965(a) t. 20 nr 1 s. 44.
29. Kirchgessner M., Weser U.: Z. Tierphys. Tierern. u. Futtermittelk. 1965(b) t. 20 nr 5 s. 261.
30. Kirchgessner M., Weser U.: Z. Tierphys. Tierern. u. Futtermittelk. 1965(c) t. 20 nr 5 s. 317.
31. Kirchgessner M., Weser U., Müller H. L.: Z. Tierphys. Tierern. u. Futtermittelk. 1967(a) t. 20 nr 2 s. 76.
32. Kirchgessner M., Weser U., Müller H. L.: Z. Tierphys. Tierern. u. Futtermittelk. 1967(b) t. 23 nr 1 s. 28.
33. Kratzer F. H., Alred J. B., Davis P. N., Marschall B. J., Vohra P.: J. Nutr. 1959 t. 68 s. 313.
34. Kroe D. J., Kaufman N., Klavins J. V., Kinney T. D.: Am. J. Physiol. 1966 t. 211 s. 414 (wg Bremner i Knight, 1970).
35. Kuhn J. N., Layrisse M., Roche M., Martinez C., Wolker R. B.: Am. J. Clin. Nutr. 1968 t. 21 nr 10 s. 1184.
36. Layrisse M., Martinez-Torres C., Roche M.: Am. J. Clin. Nutr. 1968 t. 21 nr 10 s. 1175.
37. Lease J. B., Barnett B. D., Lease E. J., Turk D. E.: J. Nutr. 1960 t. 72 s. 66.
38. Lowe B.: Experimental cookery. N. York, London, 1958.
39. Luke C. G., Davis P. S., Deller D. J.: Lancet 1968 t. 2 nr 7573 s. 844.
40. Maynard B. C.: Federation Proc. 1961 t. 20 suppl. 10 s. 125.
41. McCormick D. B., Sigel H., Wright L. D.: Biochem. et Biophys. Acta 1969 t. 184 nr 2 s. 318.
42. Meltzer D. E.: Federation Proc. 1961 t. 20 suppl. 10 s. 234.
43. Merkulowa I. S.: Soroka V. R., Rudenko N. Z.: Vopr. Pitaniya 1969 t. 28 nr 6 s. 48.
44. Miles J. E., Watts A. B.: Poultry Sci. 1964 t. 43 nr 5 s. 1342.
45. Miller W. J., Powell G. W., Blackmon D. M., Gentry R. P.: J. Dairy Sci. 1968 t. 51 nr 1 s. 82.
46. Moeller Th., Horwitz E. Ph., Chelation W.: Comar C. L., Bronner F. Mineral metabolism. New York — London 1960, t. 1, s. 101.
47. Moeller M. W., Scott H. M.: Poultry Sci. 1958 37 s. 1227.
48. Morgan O. S., Gatenby P. B. B., Weir D. G., Scott J. M.: Lancet 1969 t. 1 nr 7600 s. 861.
49. Murray M. J., Stein N.: Lancet 1968 t. 1 nr 7543 s. 614.
50. Neu H. C., Winshell E. B.: Nature 1970 t. 225 nr 5234 s. 763.

51. New chelated..., *Fertil. Feed. Stuffs J.* 1968 t. 65 nr 2 s. 56.
52. O'Dell B. L.: *Am. J. Clin. Nutr.* 1969 t. 22 nr 10 s. 1315.
53. O'Dell B. L., Savage J. E.: *Poultry Sci.* 1957 36 s. 459.
54. O'Dell B. L., Yohe J. M., Savage J. E.: *Poultry Sci.* 1964 t. 43 nr 2 s. 415.
55. Oser B. L.: *Federation Proc.* 1961 t. 20 suppl. 10 s. 158.
56. Pearson W. N., Reich M. B.: *J. Nutr.* 1969 t. 99 nr 2 s. 137.
57. Pecht: *Krafftutter* 1966 t. 49 nr 11 s. 580.
58. Pejve Ja. V.: *Mikroelementy i fermenty*, Riga, 1960.
59. Perry H. M. jr.: *Federation Proc.* 1961 t. 20 suppl. 10 s. 254.
60. Peters H. A.: *Federation Proc.* 1961 t. 20 suppl. 10 s. 227.
61. Pfeilsticker K.: *Dtsch. Lebensmittel—Rundsch.* 1969 t. 65 nr 11 s. 348.
62. Price J. M.: *Federation Proc.* t. 20 suppl. 10 s. 223.
63. Roine P., Ahlstrom A.: *Interrelations of mineral elements. Symposium der Studiengruppe Europäischer Ernährungswissenschaftler „Biologische Wechselbeziehungen und Ernährung“*, 15—18.IV.1969, Zürich und Feldbach (maszynopis referatu uzyskany dzięki uprzejmości prof. dr A. Szczygła).
64. Saltman P.: *J. Chem. Educ.* 1965 t. 42 s. 682 (wg Bremner i Knight, 1970).
65. Schubert J.: *Federation Proc.* 1961 t. 20 suppl. 10 s. 219.
66. Scott M. L., Zeigler T. R.: *J. Agric. Fd. Chem.* 1963 nr 11 s. 123.
67. Serafinowa B.: *Wiadomości chemiczne* 1969 t. 23 nr 3 s. 151.
68. Skorkowska-Zieleniewska J., Bartnik J., Mentel M.: *Przemysł Spożywczy* 1969 t. 22 nr 6 s. 237.
69. Sporedó J. A., Becker R. O.: *Nature* 1970 t. 225 nr 5238 s. 1134.
70. de Torrenté A.: *Schweiz. med. Wschr.* 1969 nr 10s. 317.
71. de Torrenté A.: *Schweiz. med. Wschr.* 1969 t. 99 nr 11 s. 355.
72. Valdmanis A.: *Aktualnye voprosy biochemii polnocennogo pitanija selkochozjajstvennych životnych dostiženija i perspektivy.* Latvij. Akad. Vestis. 1967.
73. Varela G. Murillo A.: *An. Bromatol.* 1967 t. 19 s. 91.
74. Venkatachalam P. S.: *Am. J. Clin. Nutr.* 1968 t. 21 nr 10 s. 1156.
75. Vohra P., Kratzer F. H.: *J. Nutr.*, 1964 t. 82 s. 249.
76. Vohra P., Kratzer F. H.: *Poultry Sci.* 1968 t. 47 nr 3 s. 699.
77. Waldroup P. W., Bowen T. E., Morrison H. L., Hull S. J., Tollett V. E.: *Poultry Sci.* 1968 t. 47 nr 3 s. 956.
78. Wasserman R. H.: *J. Nutr.* 1962 t. 77 s. 69.
79. Weinberg E. D.: *Federation Proc.* 1961 t. 20 suppl. 10 s. 132.
80. Welcher F. J.: *Analityczne zastosowanie kwasu wersenowego* Warszawa 1963.
81. Weser U., Kirchgessner M.: *Z. Tierphys. Tierern. u. Futtermittelk.* 1965(a) t. 20 nr 1 s. 34.
82. Weser U., Kirchgessner M.: *Z. Tierphys. Tierern. u. Futtermittelk.* 1965(b) t. 20 nr 1 s. 37.
83. Weser U., Kirchgessner M.: *Z. Tierphys. Tierern. u. Futtermittelk.* 1965(c) t. 20 nr 1 s. 41.
84. Westerfeld W. W.: *Federation Proc.* 1961 t. 20 suppl. 10 s. 158.
85. Wynter C. V. A., Williams R.: *Lancet* 1968 t. 2, nr 7580, s. 1243.
86. Wynter C. V. A., Williams R.: *Lancet* 1968 t. 2 nr 7567 s. 534.