

B. MUSZKATOWA

BADANIA NAD SKŁADEM AMINOKWASOWYM I UZUPEŁNIANIEM SIĘ BIAŁEK PRODUKTÓW SPOŻYWCZYCH Z ZASTOSOWANIEM ILOŚCIOWEJ CHROMATOGRAFII BIBUŁOWEJ

Cz. I. Metodyka i technika badań

Z Zakładu Higieny Żywnienia P.Z.H.

Celem pracy jest uzyskanie własnych danych analitycznych co do zawartości niezbędnych aminokwasów w białkach produktów spożywczych, zwłaszcza produkowanych w kraju, i zbadanie dokładności metody chromatografii bibułowej.

WPROWADZENIE

Prace Rosego i współpr. (1) nad zapotrzebowaniem człowieka na aminokwasy nadały nowy kierunek badaniom nad białkami w żywieniu człowieka, gdyż punkt ciężkości został przeniesiony z białek jako grupy związków o różnorodnym składzie i właściwościach, na takie aminokwasy (2), które muszą być dostarczone w pożywieniu. Badania te zwróciły uwagę na możliwości uzupełniania się pod względem aminokwasowym białek nawet niepełnowartościowych.

Obecnie na całym świecie podejmowane są badania w kierunku rozwiązania problemu ilościowych i jakościowych niedoborów białka. Problem ten okazał się ogromnie ważny w zapobieganiu wad w żywieniu olbrzymiej większości ludności i jest jednym z głównych tematów na kongresach i zjazdach międzynarodowych, poświęconych problematyce wyżywienia świata, gdzie szczególnie podkreśla się stronę praktyczną jej rozwiązania (3 — 8).

Do niedawna do poznania wartości odżywczej białek mieliśmy tylko metody biologiczne na zwierzętach (9—13 i inne). Mają one wiele zalet, gdyż pozwalają stwierdzić w jakim stopniu żywy ustrój może wykorzystywać poszczególne białka dla różnych celów (wzrost, rozwój, regeneracja itd.) Wadą tych metod jest to, że są kosztowne, długotrwałe i żmudne w wykonaniu.

W miarę rozwoju metod oznaczania aminokwasów w białkach otwierały się nowe perspektywy zastosowania w praktyce tzw. „oceny chemicznej” ich wartości odżywczej (14—16), której podstawą jest skład aminokwasowy poszczególnych produktów.

W Zakładzie Higieny Żywnienia PZH od kilku lat prowadzone są badania nad wartością odżywczą i uzupełnianiem się białek (17—21 i inne) metodami biologicznymi i metodą chemiczną Blocka i Mitchella z zastosowaniem danych o składzie aminokwasowym z obcych tablic. Jednak

aby badania te miały pełną wartość powinny opierać się na wynikach własnych oznaczeń składu aminokwasowego krajowych produktów.

W Polsce kilka prac z tego zakresu ogłosili *Janicki, Niewiarowicz* i współpr. (22—25). Dotyczyły one specjalnych preparatów np. wyciągów mięsnych, koncentratów żywnościowych itp.

Pracownia Mikrobiologiczna naszego Zakładu zajęła się oznaczaniem aminokwasów metodami mikrobiologicznymi, ja zaś metodą chromatografii bibułowej, ograniczając się na razie do kilku naszych podstawowych produktów spożywczych.

W poprzednich pracach stwierdziłam dobre uzupełnianie się białek ziemniaków, fasoli i mięsa, nawet przy małym udziale tego ostatniego w zestawach. W omawianej obecnie pracy szukałam potwierdzenia tego wniosku przez oznaczenie w tych produktach i ich mieszaninach niezbędnych aminokwasów i obliczenie wartości odżywczej ich białek na podstawie znalezionych wartości, przy użyciu jako wzorca białka jaja, którego skład aminokwasowy również oznaczyłam. Otrzymane wyniki porównałam z wynikami doświadczeń biologicznych na szczurach.

W tej części opisu pracy podaję metodykę i technikę prowadzenia badań.

METODYKA

Metoda chromatografii bibułowej wprowadzona do badań przez *Consenda* i współpr. (26), a następnie rozwijana i udoskonalana przez wielu autorów (m. innymi 27, 28), zaczęła coraz częściej wchodzić w użycie, najpierw do celów jakościowych, a następnie do ilościowych, jako nieszkodliwa i zasadniczo prosta w wykonaniu.

W swoich badaniach zastosowałam spływową metodę *McFarrena* (27) rozdziału aminokwasów na kilku jednokierunkowych chromatogramach równoległych, przy użyciu buforowanej bibuły i buforowanych rozpuszczalników oraz rozpuszczalnika *Partridge'a* (29). Posiłkując się wytycznymi podanymi przez *Fishera* i *Döffla* (28), oznaczałam ilościowo 7 niezbędnych aminokwasów w kwaśnych hydrolizatach produktów. Jednakże moje wstępne wyniki analiz hydrolizatów produktów nie były całkiem zadowolające.

W tym czasie tj. w latach 1955—56 ukazały się prace, podkreślające trudności ilościowego oznaczania aminokwasów metodą chromatografii bibułowej (30, 31) z powodu wielkiej liczby czynników, mających wpływ na ostateczne wyniki analiz.

W celu opanowania metodyki zbadałam dokładnie warunki analiz mieszanin aminokwasów wzorcowych i hydrolizatów produktów spożywczych. Napotykałam przy tym na różne trudności. W swoim opisie podaję niektóre modyfikacje lub ulepszenia wprowadzone przeze mnie, dotyczące pewnych szczegółów techniki chromatograficznej, oraz, co jest szczególnie ważne, odparowywania hydrolizatów pod próżnią.

WARUNKI I TECHNIKA WYKONANIA ANALIZY CHROMATOGRAFICZNEJ

Jednym z podstawowych warunków dla wykonywania chromatografii bibułowej jest odpowiednie pomieszczenie. Musi ono być tak urządzone, aby były zapewnione: zaciemnienie, dość stała temperatura, czystość

powietrza i możliwość bezpiecznego odpędzenia z bibuły nieraz bardzo szkodliwych dla zdrowia rozpuszczalników. Tego rodzaju pracownia została urządzona w Zakładzie Higieny Żywnienia PZH. wg mojego planu. Poza ogólnym wyposażeniem laboratoryjnym posiada ona: dobrą izolację od otoczenia, silne wentylatory w oknie i wyciągu, nagrzewnicę z termoregulacją, suszarkę elektryczną zwykłą, suszarkę z przepływem ciepłego powietrza (p. niżej), urządzenie do spryskiwania bibuły trującymi związkami za pomocą butli ze sprężonym powietrzem, suszarkę na bloku (wieszak z prętów) do suszenia bibuły oraz podium na komory chromatograficzne.

1. Rozdział mieszanin aminokwasów na bibule

Podstawą ilościowego oznaczania aminokwasów jest uzyskanie dobrego ich rozdziału. Należy tak dobrać warunki, by każdy z aminokwasów, który ma być oznaczony, został odizolowany od innych na chromatogramie, by można było wyciąć skrawek bibuły, na którym dany aminokwas się znajduje i wyeluować go z tego skrawka. Sądząc z prac wymienionych przeze mnie autorów polskich i obcych, metoda McFarrena jest do tego celu najodpowiedniejsza.

Na wyniki wpływa tu szereg czynników, które będą pokrótce omówione.

A. Komory chromatograficzne i sposoby umieszczania bibuły w komorach zostały opisane w doniesieniu tymczasowym (32). Przedstawiłam tam modyfikację, pozwalającą rozwijać chromatogramy na dużych arkuszach (warunek konieczny w chromatografii ilościowej) w małych komorach. Stosowanie pokazanych w doniesieniu dość kłopotliwych nacięć w celu poprawy rozdziału nie było potrzebne w późniejszych badaniach, kiedy poprawiłam niektóre warunki i nabrałam wprawy w technice chromatograficznej. Komory przykrywałam płytami szklanymi i uszczelniałam smarem wazelinowym. Wykonane otwory w płytach zostały tak umieszczone, by można było przez nie wlać rozpuszczalnik do płytki po skondycjonowaniu bibuły.

B. R o z p u s z c z a l n i k i. Zastosowałam następujące rozpuszczalniki, polecane przez McFarrena (27):

- 1) fenol nasycony buforem o pH 12 i bibułę buforowaną o pH 12 do izolowania treoniny (skrót F pH 12).
- 2) m-krezol i bibułę — nasycone buforem o pH 8,4 (skrót m-Kr pH 8,4), oraz
- 3) o-krezol i bibułę — nasycone buforem o pH 6,2 (skrót o-Kr pH 6,2) do izolowania waliny, metioniny i fenyloalaniny.
- 4) mieszaninę 1 : 1 (w stos. obj.) alkoholi n-butyłowego z benzyłowym i bibułę — nasycone buforem o pH 8,4 (skrót nB-B pH 8,4) do izolowania leucyny, izoleucyny i fenyloalaniny, przy czym otrzymywałam również niekiedy wydzielenie waliny i metioniny.
- 5) mieszaninę 2,6-lutydyny z wodą 2 : 1 (w stos. obj.) (skrót Lut-w) do wydzielenia lizyny i waliny.
Do wyizolowania lizyny skuteczniejszy okazał się rozpuszczalnik Partridge'a (29):
- 6) mieszanina alkoholu n-butyłowego z kwasem octowym lodowatym i wodą 4 : 1 : 5 (w stos. obj.), (skrót nB-o-w), gdyż w lutydynie trudno

uzyskać rozdział lizyny od argininy. Przy omawianiu w II części pracy ilościowych wyników oznaczania aminokwasów z zastosowaniem do rozwijania chromatogramów tych rozpuszczalników podam ich wady i zalety. Wspomnę tu tylko o pewnych szczegółach laboratoryjnych, związanych z ich przygotowywaniem.

Rozpuszczalniki organiczne, zwłaszcza fenol i krezol, powinny być przed każdorazowym użyciem oczyszczone przez destylację. Tworzenie mieszanin rozpuszczalników i nasywanie ich buforem przeprowadza się w rozdzielaczu i pozostawia do uzyskania klarownych warstw. Z dobrym skutkiem stosowałam dodawanie do fazy organicznej 5% odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego np. do fenolu nasyconego buforem o pH 12 dodawałam jeszcze 5% czystego fenolu. Wówczas faza organiczna jest mniej wrażliwa na drobne wahania temperatury.

Wszelkie czynności związane z przygotowywaniem rozpuszczalników wykonywałam w tym samym pomieszczeniu, w którym rozwijałam chromatogramy, by zachować te same warunki temperatury.

C. Buforowałam bibułę przez przeciąganie arkusza trzymanego za przyczepioną bagietkę, przez odpowiedni bufor, a suszyłam na wieszaku, zbierając nadmiar płynu złożonym pasem bibuły filtracyjnej. Przyjęłam skład buforów podany przez *McFarrena*.

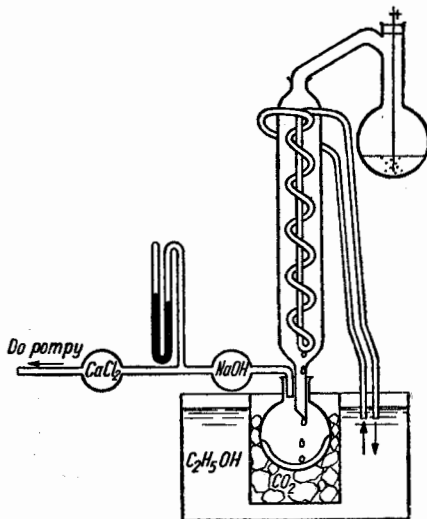
D. Roztwory do nanoszenia na bibułę. Roztwory wzorcowe. Przygotowywałam roztwory wodne (27) 18 czystych (sprawdzone chromatograficznie) aminokwasów indywidualnie i w mieszaninach. Były to poza 7 już wymienionymi: kw. asparaginowy, kw. glutaminowy, alanina, arginina, cystyna, glicyna, histydyna, prolina, seryna, tryptofan i tyrozyna. Stężenie każdego aminokwasu w roztworze wynosiło przeważnie 0,5 do 1. $10^{-8}M$ w 1 μl .

Z początku badań doprowadzałam pH roztworów wzorcowych i hydrolyzatów do 6,2 wg *McFarrena*. Wobec małej trwałości aminokwasów w tym środowisku przeszedłam następnie na roztwory o pH 3,5 tj. pH większości aminokwasów w wodzie. Roztwory przechowywałam w lodówce pod toluenem. Stwierdziłam ich trwałość przez okres dwóch miesięcy.

Hydrolyzaty. Zastosowałam początkowo dwa sposoby hydrolyzy kwaśnej (narażenie się zajmuję) produktów spożywczych: Kofranyiego (33) oraz Hendersona i Snella stosowaną w naszym Zakładzie przez Kurzepę i współpr. (34) do oznaczania aminokwasów metodami mikrobiologicznymi. Metoda wprowadzana przez Kofranyiego w 1950 r. do produktów, zawierających większą ilość węglowodanów, jest dwustopniowa: najpierw hydrolyzuje się produkt kwasem mrówkowym, który rozkłada wielocukrowce na cukry. Przez tzw. „strącenie Neuberga” octanem rtęciowym wydziela się z roztworu substancje azotowe i te, już pozbawione cukrów, hydrolyzuje się kwasem solnym. Jest to metoda interesująca lecz wymaga jeszcze opracowania. Większość produktów hydrolyzowałam metodą Hendersona i Snella za pomocą 2,5n kwasu solnego (w ilości 20 ml na 0,5 g białka) w ciągu 5 godzin w autoklawie przy 1 atm. nadciśnienia. Zawartość kolbki przenosiłam do kolbki destylacyjnej i odparowywałam pod próżnią kilkakrotnie do sucha, dolewając za każdym razem kilkanaście ml wody redestylowanej. Pozostałość rozpuszczałam w takiej ilości wody, by stężenie azotu w hydrolyzacie odpowiadało zawartości 10 do 20 μg białka ogólnego (N x 6,25)

produktu w 1 μ l hydrolizatu. Metodą tą odzyskiwałam w hydrolizatach 92 do 98% N produktu.

Odparowywanie hydrolizatów pod próżnią. Z początku destylacja próżniowa sprawiła mi wiele trudności wobec braku odpowiedniej aparatury do liofilizacji, trwała długo, a otrzymywane roztwory miały ciemne zabarwienie i pH około 0,5. Następnie przy współudziale mgr H. Ziombkiego zestawiłam wydajną i łatwą w obsłudze aparaturę z wymrażaniem, której schemat jest przedstawiony na ryc. 1. Składa się ona z następujących części: kulistej kolbki destylacyjnej zaopatrzonej w kapilarę i połączonej szlifem za pomocą wygiętej rury z górną częścią chłodnicy pionowej, wewnątrz której jest węzownica z przepływającą stale cieczą chłodzącą, odbieralnika pod chłodnicą zanurzonego do naczynia z zestalonym CO_2 . Naczynie to umieszczone jest wewnątrz ultratermostatu, napełnionego ochłodzonym uprzednio w lodówce alkoholem skażonym. Ten alkohol jako ciecz chłodząca, jest stale przetłaczany przez węzownicę chłodnicy mieszadłem



Ryc. 1. Destylacja próżniowa

elektrycznym. Od odbieralnika, w którym pozostaje skroplona prawie cała ilość par z kolbki destylacyjnej, odchodzi rurka boczna odprowadzająca gazy do płuczek z NaOH i CaCl_2 przez manometr a potem przez kran trójdrożny do pompy próżniowej olejowej. Kolbkę destylacyjną, zawierającą roztwór odparowywany, ogrzewałam do 40° przez podstawianie łaźni wodnej. Z tego urządzenia otrzymywałam roztwory jaśniejsze o pH 1,7.

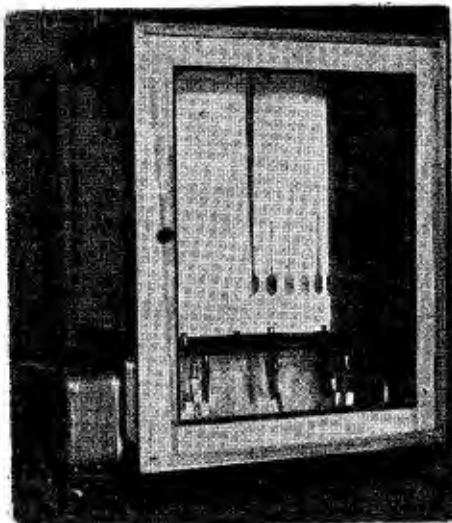
E. Nanoszenie roztworów na bibułę. Na bibule zaznaczałam linię startową w odległości 8,5 cm od górnego brzegu arkusza (u nasady zębów, które mają być zanurzone w rozpuszczalniku (32) — ryc. 2b str. 104). Nanosiłam roztwory w danym punkcie startowym mikropipetami o pojemności 5 do 10 μ l z podziałką co 2 μ l, zależnie od stężenia aminokwasów w roztworze w ilości 2 do 30 μ l. Odstęp między punktami startowymi wynosiły 3,5 do 4 cm.

F. Kondycjonowanie bibuły. Na dno komory nalewałam fazę wodną rozpuszczalnika. Gotowy do chromatografii arkusz zawieszalam na pustej płytce w komorze. Po sprawdzeniu położenia płytki (poziomicą) zamykałam komorę i pozostawiałam na noc dla skondycjonowania tj. nasycenia bibuły parami rozpuszczalnika i wody. Następnie wlewałam przez otwór w płycie fazę organiczną rozpuszczalnika do płytki tak, by zęby arkusza były zanurzone w płynie na głębokość ok. 1,5 cm.

G. Rozwijanie chromatogramów; temperatura i czas rozwijania. Czas rozwijania jak wiele innych parametrów zależy od warunków lokalnych, głównie od rodzaju rozpuszczalnika, bibuły i od

temperatury. Rozwijałam chromatogramy w temperaturze dość stałej 18 do 22°. W niższej temperaturze czas rozwijania jest zbyt długi, w wyższej zaś znacznie krótszy, lecz wynik rozwijania gorszy. Na ogół przy zastosowaniu bibuły Whatmana Nr 1 stosowałam dla fenoli i krezoli 22 — 24 godz. Przy użyciu krezoli fenyloalanina może po dłuższym czasie spłynąć wraz z czołem rozpuszczalnika. Czas rozwijania pozostałymi rozpuszczalnikami był dłuższy — 45 do 60 godz. W przypadku rozpuszczalnika nB-B pH 8,4 rozwijanie 50 do 55 godzin pozwala wyizolować metioninę, walinę, leucynę i izoleucynę. Na chromatogramie krócej rozwijanym, ok. 45 godz., można jeszcze uchwycić na arkuszu fenyloalaninę, która przy dłuższym rozwijaniu spływa, ale wówczas rozdział czterech pozostałych aminokwasów może być nieco gorszy. Czas rozwijania chromatogramów na bibule Whatmana Nr 3 jest krótszy, ale że na tej grubszej bibule trudno jest przeprowadzać reakcje barwne, do ilościowych oznaczeń używałam tylko bibuły Nr 1.

H. Wyjmowanie bibuły z komory i ich suszenie. Po otwarciu komór najkorzystniej jest wysączyć płyn z płytki, albo odciąć część bibuły (zęby) zanurzoną w płytce, rozciąć nitki jeżeli arkusz był zwinięty w rulon i przenieść go, po lekkim podsuszeniu do suszarki. Trzeba dokładnie pozbyć się rozpuszczalników z bibuły. Ich pozostałości wpływają ujemnie na tworzenie się związków barwnych, a także powodują ciemnienie całego arkusza, co utrudnia badanie ekstynkcji eluatów. Ten warunek mogłam spełnić dopiero w suszarce z przepływem ciepłego powietrza. Takie suszarki są w piśmiennictwie opisywane i zalecane ale trudne do uzyskania. Wspólnie z mgr H. Ziombskim opracowaliśmy bardzo prostą i łatwą do wykonania przez stolarza, drewnianą szafkę, do której dostawia się, do odpowiednio przystosowanego otworu, termowentylator, powodujący przepływ nagrzanego powietrza o temp. 50 do 60° (ryc. 2). Arkusz po rozwijaniu — w rozpuszczalniku nB-o-w suszyłem godzinę — w innych rozpuszczalnikach — 2 godziny.



Ryc. 2. Suszarka z przepływem ciepłego powietrza

W połowie każdego z tych okresów zmieniałam położenie arkusza o 180° dla bardziej równomiernego wysuszenia.

I. Wywoływanie chromatogramu. Chromatogramy wywoływałam przez spryskiwanie pod wyciągiem bibuły z rozpylacza dwukrotnie z obu stron arkusza 0,2% roztworem ninhydryny w acetonie, zakwaszonym kwasem octowym lodowatym (dodanym w ilości 2 ml lub 7 ml do 100 ml roztworu ninhydryny zależnie od pH rozpuszczalników). Zastosowałam do tego celu sprężone powietrze.

Dzięki spryskiwaniu odczynnikami pod ciśnieniem szybko zaczynały się pokazywać plamy aminokwasów. Szybkość ukazywania się ich była

największa po rozwijaniu w rozpuszczalniku nB-o-w, najmniejsza po nB-B pH 8,4. Najpóźniej po godzinie, kiedy już były widoczne wszystkie plamy, zaznaczyłam ołówkiem granice plam poszukiwanych aminokwasów. Następnie wkładałam arkusz na 20 minut do suszarki o temp. 60°. Odtąd wszystkie czynności do chwili skompleksowania barwnika trzeba przeprowadzić szybko i w zaciemnionym pokoju.

Wyniki rozdziału mieszanin aminokwasów będą pokazane na fotografiach chromatogramów i omówione w następnej części pracy.

2. Ilościowa chromatografia aminokwasów.

Posługiwałam się metodą pomiarów ekstynkcji eluatów kompleksu miedzi dwuwartościowej z barwnikiem utworzonym z aminokwasu i ninhydryny, opisaną dokładnie przez Fishera i Dörfla (28).

Ekstynkcje oznaczałam w fotokolorymetrze Bauscha-Lomba przy $\lambda = 510 \text{ m}\mu$.

Wyniki ilościowych badań zawartości aminokwasów w roztworach wzorcowych i hydrolizatach produktów i ich mieszanin będą przedmiotem następnych części tej pracy.

Б. Мушкатова

ИССЛЕДОВАНИЯ НАД СОСТАВОМ АМИНОКИСЛОТ И ДОПОЛНЕНИЕМ БЕЛКА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ, ПРИМЕНЯЯ ДЛЯ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВЕННУЮ БУМАЖНУЮ ХРОМАТОГРАФИЮ

Содержание

В этой части труда представлены условия количественного определения аминокислот в стандартных растворах и кислых гидролизатах продуктов и их смесей при помощи бумажной хроматографии.

Представлены автором проектированные лабораторные приспособления, а также представлены поочередные этапы работы при этих определениях в которых применялись также собственные улучшения.

B. Muszkato wa

QUANTITATIVE PAPER CHROMATOGRAPHY STUDIES ON THE AMINO ACID COMPOSITION AND THE SELFSUPPLEMENTATION OF FOOD PROTEINS

Summary

This paper deals with quantitative paper chromatography of amino acids in standard solutions and in acid hydrolyzates of proteins. Author describes in details the instrumentation and the procedure as invented or modified by herself.

PIŚMIENNICTWO

1. Rose W., Johnson J., Haines W.: J. Biol. Chem., 1950—1955. — 2. Mitchell H. H.: Nutr. Rev., 10, 2, 1952. — 3. Whitelock V. V. S. (wyd.). Protein Nutrition. Annals of the N. Y. Academy of Sciences, 69, Art. 5, 855, 1958. — 4. Protein Requi-

rements. FAO Nutritional Studies Nr 16. Rzym, FAO, 1957. — 5. *Albanese A. A.*: Proteins and Amino Acid Nutrition. New York Acad. Press, 1959. — 6. Proteins and Amino Acids in Nutrition. Pannel II, 5th Int. Congress on Nutrition. Washington D. C., 1960. — 7. *Szczygieł A.*: Podstawy fizjologii żywienia. PZWL, 1956. — 8. *Brock J. F., Autret M.*: Kwashiorkor in Africa. FAO/WHO, 1952. — 9. *Thomas K.*: Arch. Anat. u Physiol., Physiol. Abstr., str. 219, 1909. — 10. *Mitchell H. H.*: J. Biol. Chem., 58, 613 i 873, 1924.

11. *Osborne T. B., Mendel L. B., Ferry E. L.*: J. Biol. Chem., 37, 225, 1919. — 12. *Bender A. E., Miller B. S.*: Biochem. J. 53, 7, 1953; Brit. J. Nutr., 9, 382, 1955. — 13. *Harrison H. C., Long C. N. H.*: J. Biol. Chem., 161, 545, 1945. — 14. *Block R. J., Mitchell H. H.*: Nutr. Abstr. Rev., 16, 249, 1946. — 15. *Oser B. L.*: J. Amer. Diet. Ass., 27, 396, 1951. — 16. *Sheffner A. L., Eckfeldt G. A., Spector H.*: J. Nutr., 60, 105, 1956. — 17. *Muszkatowa B., Wojna L.* (Doniesienie tymczasowe): Roczn. PZH, 3, 307, 1953. — 18. *Muszkatowa B. i wsp.*: Roczn. PZH, 2, 123, 1956. — 19. *Muszkatowa B., Szkillądziowa W.*: Przem. Rol. i Spoż., 11, 211, 1957, J. Hyg. Epid. Micr. Imm., 1, 309, 1957; IV Congr. Int. de Nutr., Paris, str. 161, 1957. — 20. *Szkillądziowa W., Rudowska-Koprowska J., Muszkatowa B.*: Roczn. PZH, 2, 141, 1956.

21. *Szkillądziowa W.*: Roczn. PZH, XI, 191 i 295, 1960. — 22. *Jankowski St., Sujak S.*: Przem. Spoż., 9, 105, 1955. — 23. *Niewiarowicz A.*: Przem. Spoż., 9, 501, 1955. — 24. *Janicki J., Niewiarowicz A. i wsp.*: Prace Inst. Lab. Bad. Przem. Rol. i Spoż., 6, 29, 1956. — 25. *Niewiarowicz A.*: Przem. Spoż., 10, 280, 1956. — 26. *Consdan R. i wsp.*: Biochem. J., 38, 224, 1944. — 27. *McFarren E. F.*: Anal. Chem., 23, 1, 1951. — 28. *Fisher F. G., Dörfel H.*: Bioch. Zeitschrift, 324, 544, 1953. — 29. *Partridge S. M.*: Biochem. J., 42, 238, 1948 i 44, 521, 1949. — 30. *Kofranyi E.*: Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Ch., 299, 129, 1955.

31. *Schönenberg H.*: Klin. Wochenschr., 34, 269, 1956. — 32. *Muszkatowa B.* (Doniesienie tymczasowe): Roczn. PZH, 11, 103, 1960. — 33. *Kofranyi E.*: Naturwiss., 37, 11, 1950 i Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Ch., 287, 170, 1951. — 34. *Kurzepa H., Trzebska-Jeske I.*: Roczn. PZH, IX, 497, 1958.