

MAKSYM NIKONOROW, HALINA PRZYBIŃSKA-KARPIŃSKA

WPLYW CZASU, TEMPERATURY I pH NA PRZEBIEG REAKCJI NIEKTÓRYCH AMINOKWASÓW Z GLIKOZĄ*

Z Wojskowego Centralnego Laboratorium Sanitarно-Higienicznego w Warszawie

WSTĘP

Zagadnienie zmian chemicznych następujących w artykułach żywności podczas ich utrwalania bądź przechowywania wiąże się z działalnością enzymów lub zdolnością reagowania aminokwasów z cukrowcami.

Historycznie łączy się je z tzw. reakcją Maillarda (1).

Warunki tworzenia się połączeń aminocukrowych są przedmiotem badań zarówno w technologii produktów spożywczych, jak i technologii leków (2). Jak dotąd nie doprowadziły one do poznania tych nowo powstałych związków, ani do jednolitego poglądu na mechanizm i warunki ich powstawania. Związki te mają duże znaczenie higieniczne; wytwarzanie się ich kosztem aminokwasów i cukrowców wiąże się ze zmniejszeniem wartości biologicznej produktów spożywczych. Według jednych autorów reakcja Maillarda przebiega z równoczesnym tworzeniem się brunatnego zabarwienia (1, 6), inni natomiast są przeciwnego zdania (3, 4).

Tworzenie się kompleksów aminocukrowych następuje nie tylko w produktach wysoko białkowych, lecz także i w tych, które zawierają znikome ilości związków aminowych, jak np. w sokach owocowych, koncentratach warzywnych (5) i innych. W niektórych przypadkach reakcja Maillarda korzystnie wpływa na cechy organoleptyczne produktów spożywczych na skutek wytwarzania się charakterystycznego zapachu i barwy np. przy wypieku pieczywa, bądź paleniu kawy (5). W innych przypadkach zmiany te są bardzo niekorzystne, jak w mleku w proszku (6), ponieważ towarzyszy im nieprzyjemny zapach i posmak rybi, brunatnienie proszku oraz zmniejszenie rozpuszczalności wraz ze wzrostem mocy redukcyjnej (26), a jednocześnie obniżenie wartości biologicznej tego produktu.

CZEŚĆ TEORETYCZNA

Istnieją dwa zasadnicze poglądy na mechanizm reakcji Maillarda: pierwszy uwzględnia tworzenie się kompleksów na drodze chemicznej, drugi na drodze enzymatycznej. Zdania co do ich budowy są podzielone.

Reakcja najprawdopodobniej przebiega etapami: następuje łączenie się grup aldehydowych cukrowców z grupami amidowymi, imidowymi i aminowymi, a następnie łączą się produkty ich rozpadu. W celu wy-

* Praca referowana na posiedzeniu Podsekcji Badania Żywności III Naukowego Zjazdu Farmaceutycznego w Gdańsku 23.IX.1958 r.

jaśnienia mechanizmu, kondensowano aldehydy octowy i mrówkowy ze związkami zawierającymi grupy iminowe i aminowe (7,8) i wykazano, że grupy iminowe reagują z jedną cząsteczką aldehydu, aminowe z jedną bądź dwiema cząsteczkami.

W reakcji aldehydów z białkiem nie jest to takie proste. Być może tworzą się mostki metylenowe pomiędzy grupami iminowymi, a różnymi grupami polarnymi. Początkowo wytworzonym połączeniom przypisywano budowę zasad Schiffa — $N=CH_2$. Wg *Heintzego* (9, 10) kondensacja cukrów redukujących z aminami przebiega w stosunkach ściśle molarnych z wytworzeniem bezpośrednio glikozaminy. Inni jeszcze sądzą, że glikozaminy tworzą się poprzez zasady Schiffa, chociaż nie zostały one wyodrębnione w czasie reakcji brunatnienia nieenzymatycznego.

W pierwszej fazie reakcji Maillarda obserwowano absorpcję w ultrafiolecie bez zmiany barwy; przypuszcza się, że następuje tutaj łączenie się grupy aldehydowej cukrowca z aminą, wydzielenie wody i utworzenie się glikozaminy poprzez zasady Schiffa. Druga faza reakcji przebiega z wyraźną zmianą zabarwienia i większą absorpcją w ultrafiolecie. Tworzą się podwójne wiązania z powodu dehydratacji cukrów oraz wydziela się CO_2 z aminokwasu po skróceniu łańcucha, powstaje wówczas aldehyd uboższy o 1 atom węgla. Połączenia melanoidowe powstałe w temperaturze niższej wytwarzają mniejszą ilość CO_2 niż te, które powstają w temperaturze wyższej. W trzeciej fazie tworzenia się kompleksów melanoidowych, nazywanych tak przez *Maillarda*, a następnie wyodrębnionych przez *Amlera* (12), charakterystyczne jest tworzenie się związków barwnych, fluoryzujących, nienasyconych, zdolnych do kondensacji aldolowej, polimeryzacji aldehydów i amin i do tworzenia związków azotowych w pierścieniu heterocyklicznym.

Stosunkowo dobrze zbadano mechanizm reakcji glicyny z glikozą. Badania z węglem radioaktywnym (14, 15) doprowadziły do wniosku, że w wyniku kondensacji glicyny i glikozy powstają trzy grupy związków, z których jedno reagują z ninhydryną, drugie z fenylenodwuaminą, trzecie natomiast fluoryzują. Wprowadzając węgiel radioaktywny raz do glicyny, a raz do glikozy stwierdzono, że główny składnik rozdzielony na kolumnie chromatograficznej był produktem kondensacji glicyny i glikozy w stosunku molarnym 1:1, oprócz niego wyodrębniono jeszcze na chromatogramie cały szereg innych składników bliżej niescharakteryzowanych.

Sama budowa połączeń nie jest znana. Przypuszcza się, że są to połączenia o budowie N-glikozydów, które poprzez odwodnienie i cyklizację dają pochodną 5-hydroksymetylofurfuralu bądź też, że są to połączenia peptydowe. *Lawrance, Iacobellis i Smith* (16) wysunęli ten ostatni wniosek na podstawie badań chromatograficznych. Otrzymali oni, po autoklawowaniu sztucznych peptydów z glikozą, na chromatogramie obok plam aminokwasu i cukru jeszcze jedną plamę wybarwiająca się także ninhydryną. Mechanizm tworzenia się kompleksów aminokwasowo-cukrowych na drodze enzymatycznej jest także przedmiotem obszernych badań i dyskusji. W reakcji tej biorą udział enzymy utleniające: askorbinazy, peroksydazy, polifenolazy i cytochromooksydazy. Substratami enzymów biorących udział w reakcji brunatnienia są także substancje taninowe mało jeszcze zbadane.

Przypuszcza się, że w brunatnieniu enzymatycznym w sokach owocowych tworzy się trójcząsteczkowy kompleks między enzymem, substratem, a czynnikiem utleniającym (10).

Dużą rolę w tworzeniu się nowych niezbadanych połączeń przypisuje się wilgotności, środowisku i temperaturze. I tutaj zdania się podzielone. *Lea* i *White* oraz inni (8, 20, 21) przeprowadzali badania nad sproszkowanym mlekiem zawierającym 2,8; 4,7 oraz 7,8% wilgoci. Uderzającą cechą wyników jest duża szybkość psucia się mleka przy wyższej wilgotności. Stwierdza się wówczas obniżenie jego wartości biologicznej. Mleko paczkowe nawet w atmosferze azotu traci część aminokwasów. Przechowywano także odparowane mleko przez dwa lata przy 4°, 38° oraz w temperaturze pokojowej; przy końcu pierwszego roku składowania stwierdzono w mleku przechowywanym w temperaturze 38° tylko niewielkie ilości strat aminokwasów: tryptofanu, lizyny, argininy i histydyny. W mleku przechowywanym w temperaturze 4°, nie stwierdzono strat aminokwasów po dwu latach, zaś w mleku, które przechowywano w 38° straty aminokwasów były bardzo znaczne: 12% tryptofanu, 29% lizyny, 29% histydyny i 28% argininy. Innego zdania są *Schroeder*, *Iacobellis* i *Smith* (1c).

CEL PRACY

Celem pracy było ustalenie w jakich warunkach straty aminokwasów i glikozy są największe i czy jest możliwa ocena tych strat na podstawie stwierdzenia obecności nowych związków wytworzonych na skutek reakcji aminokwasów z glikozą. Jako kryteria jakościowe oraz ilościowe reakcji przyjęliśmy obecność nowo otrzymanego związku potwierdzonego metodą chromatografii bibułowej oraz oznaczenie ubytku azotu aminowego i glikozy.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Do badań użyliśmy 4 aminokwasy uwzględniając ich charakter, z jednoamino-jednokarboksylowych glicynę i α -alaninę, z jednoamino-dwukarboksylowych kwas glutaminowy i z dwuamino-jednokarboksylowych — lizynę.

METODYKA

Molarne zbuforowane roztwory aminokwasów i glikozy przygotowano w następujący sposób: odważki α -alaniny i glikozy, kwasu glutaminowego i glikozy, glicyny i glikozy, w stosunku 1:1, a lizyny i glikozy w stosunku 1:10 rozpuszczono w 50 ml płynów buforowych uprzednio doprowadzając pH do wartości 5,2; 7,0 i 8,2. Aminokwasy pochodziły ze Stalinogrodzkiej Podhurtowni Odczynników. Glikoza odpowiadała warunkom FP II. Jako płyny buforowe stosowano roztwory: cytrynianu dwusodowego (pH = 5,2), fosforanów (pH = 7) i boraksu (pH = 8,2). Posługując się znanymi ilościami aminokwasów i glikozy ubytek azotu aminowego oznaczaliśmy metodą Van Slyke'a, a ubytek cukru

początkowo metodą Hagedorna-Jensena, a w dalszym ciągu pracy z wielkości plam na chromatogramie.

W badaniach wstępnych oznaczono w roztworach poszczególnych aminokwasów zawartość azotu aminowego metodą Van Slyke'a i tę wartość, a nie teoretyczną (100%) przyjęto jako punkt wyjściowy w oznaczeniach ilościowych. Przekonano się również, że w temperaturze pokojowej oraz po ogrzaniu do wrzenia i natychmiastowym schłodzeniu mieszanin poszczególnych aminokwasów z glikozą nie nastąpił ubytek azotu aminowego.

Ogrzewając poszczególne próby do wrzenia pod chłodnicą zwrotną zaobserwowano, że ubytek azotu aminowego ustalił się już po trzech godzinach. Przy dalszym ogrzewaniu ubytek ten był już niewielki. W związku z tym przyjęto w pracy ogrzewanie trzygodzinne dla jednego szeregu doświadczeń, natomiast w drugim przyjęto temperaturę i czas (117° i 15 minut) stosowaną podczas wyjaławiania kondensowanego mleka.

Oznaczenie zawartości azotu aminowego i glikozy wykonywano posługując się roztworem podstawowym, przygotowanym w następujący sposób: z ogrzewanych roztworów poszczególnych aminokwasów i glikozy pobierano pipetą po upływie 1,2 i 3 godzin po 5 ml płynu i uzupełniano w kolbie miarowej do objętości 50 ml. Zawartość azotu aminowego i glikozy oznaczano w dwóch równoległych próbach pobranych z roztworu podstawowego. Jednocześnie wykonano w ten sam sposób oznaczenia zawartości azotu aminowego i glikozy w roztworach aminokwasów i glikozy, ogrzewanych oddzielnie w tych samych warunkach.

Do badań chromatograficznych na obecność związków wytwarzających się w wyniku reakcji aminokwasów z glikozą oraz w celu ustalenia ubytku aminokwasu i glikozy używano roztworów po 3 godzinnym

Tabela I

L.p.	Badane związki	Ilość użytych aminokwasów i glikozy w molach	pH		Zawartość azotu aminowego		Użytek azotu aminowego w %
			przed	po	przed	po	
			autoklawowaniu		autoklawowaniu w %		
1	Glicyna	1:10	8,2	8,2	102,6	100,3	2,3
2	Glicyna-glikoza	1:1	8,2	7,9	102,6	88,5	14,1
3	Glikoza	0:1	8,2	8,0	—	—	—
4	Alanina	1:0	8,2	8,2	101,7	99,8	1,9
5	Alanina-glikoza	1:1	8,2	8,15	101,7	83,0	18,7
6	Lizyna	1:0	8,2	8,15	95,2	91,1	4,1
7	Lizyna-glikoza	1:10	8,2	7,0	95,2	59,6	35,6
8	Kw. glutaminowy	1:0	8,2	7,8	100,8	98,1	3,7
9	Kw. glutam.-glikoza	1:1	8,2	7,6	100,8	75,5	26,3

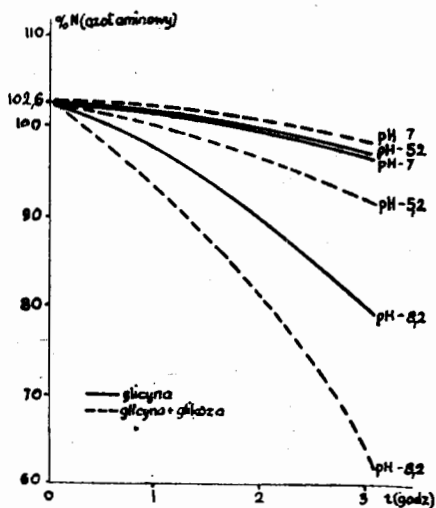
Tabela II

Lp.	Badane związki	Ilość uży- tych amino- kwasów i glikozy w molach	pH		Zawartość azotu aminowego		Ubytek azotu amino- wego w %
			przed	po	przed	po	
			autoklawowaniu		autoklawowaniu w %		
1	Glicyna	1:0	7,0	7,0	102,6	99,5	3,1
2	Glicyna-glikoza	1:1	7,0	7,6	102,6	96,5	6,1
3	Glikoza	0:1	7,0	6,8	—	—	—
4	Alanina	1:0	7,0	7,1	101,7	90,8	1,9
6	Alanina-glikoza	1:1	7,0	6,9	101,7	97,5	4,2
5	Lizyna	1:0	7,0	7,0	95,2	94,4	0,8
7	Lizyna-glikoza	1:1	7,0	7,3	95,2	85,6	9,6
8	Kw. glutaminowy	1:0	7,0	7,0	101,8	101,6	0,2
9	Kwas glutam.-glikoza	1:1	7,0	7,0	101,8	99,8	10,0

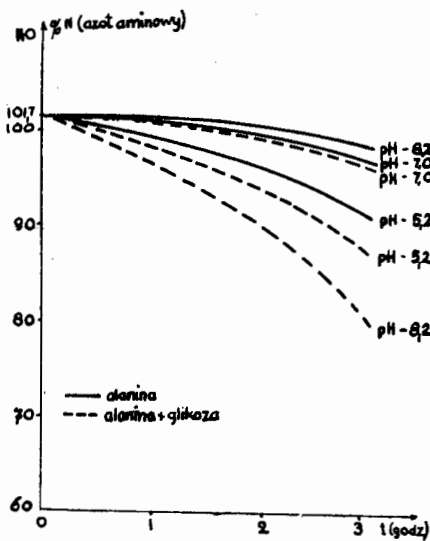
Tabela III

Lp.	Badanie związeki	Ilość użytych aminokwasów i glikozy w molach	pH		Zawartość azotu aminowego		Ubytek azotu amino- wego w %
			przed	po	przed	po	
			autoklawowaniu		autoklawowaniu		
1	Glicyna	1 ; 0	5,2	5,1	102,6	104,0	—
2	Glicyna-glikoza	1 ; 1	5,2	5,3	102,6	99,4	3,2
3	Glikoza	0 ; 1	5,2	5,2	—	—	—
4	Alanina	1 ; 0	5,2	5,3	101,7	98,9	2,8
5	Alanina-glikoza	1 ; 1	5,2	5,3	101,7	92,6	9,1
6	Lizyna	1 ; 0	5,2	5,1	95,2	90,3	4,9
7	Lizyna-glikoza	1 ; 10	5,2	5,1	95,2	77,1	18,1
8	Kw. glutaminowy	1 ; 0	5,2	5,2	101,8	100,0	1,8
9	Kwas glutam.-glikoza	1 ; 1	5,2	5,2	101,8	92,1	9,7

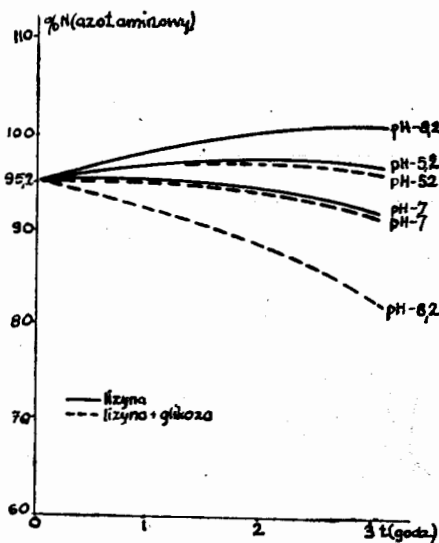
ogrzewaniu. Zastosowano metodę chromatografii wstępującej w układzie n-butanol, kwas octowy, woda w stosunku 4:1:5 przy użyciu bibuły Whatman nr 1. Chromatogram rozwijano 22 godziny w komorze uprzednią nasycionej. Dla każdego aminokwasu przygotowano dwa chromatogramy. Na jeden z nich nanoszono mikropipetą roztwór odpowia-



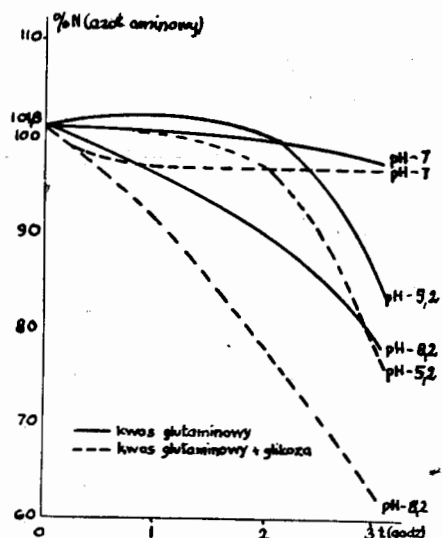
Ryc. 1. Glicyna + glikoza.



Ryc. 2. Alanina + glikoza.



Ryc. 3. Lizyna + glikoza



Ryc. 4. Kwas glutaminowy + glikoza.

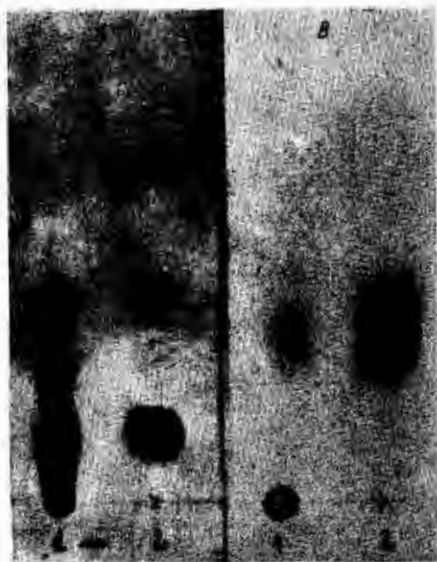
dający 25 mikrogramom aminokwasu z glikozą oraz samego aminokwasu, na drugi zaś roztwór aminokwasu z glikozą w ilości odpowiadającej 25 mikrogramom glikozy i samej ogrzewanej glikozy. W pierwszym przypadku chromatogram wybarwiano 0,1%-owym acetonowym roztworem ninhydryny i umieszczano w suszarce w temperaturze 100° na okres 3 minut do wystąpienia fioletowych plam. Drugi chromatogram wybarwiano roztworem szczawianu aniliny*. Z próbami ogrzewanymi w autoklawie postępowano w ten sam sposób.

* (1,66 g kwasu szczawowego, 0,93 g aniliny rozpuszczono w 100 ml n-butanolu nasyconego wodą. Chromatogramy po spryskaniu umieszczano w suszarce w temp. 105° na okres 10 min.).

Wyniki badań są zebrane w tabelach (I, II i III) i przedstawione graficznie (ryc. 1—4). Wykresy sporządzono odkładając na osi rzędnych %-ową zawartość azotu aminowego, na osi odciętych czas ogrzewania. Krzywe wykreślano interpolując pomiędzy punktami pomiarów.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W środowisku alkalicznym zawartość azotu aminowego obniża się w przypadku wszystkich badanych aminokwasów, jednak kwas glutaminowy ogrzewany bez glikozy traci również azot aminowy, prawdopodobnie na skutek dezaminacji. Podobne wyniki jak podczas 3-godzinnego ogrzewania otrzymano również po 15 min. ogrzewania wszystkich aminokwasów z glikozą w autoklawie w temp. 117° (tabela I).



Ryc. 5.



Ryc. 6.

Ryc. 5. A) I-chromatogram lizyny ogrzewanej w temperaturze wrzenia z glikozą w środowisku alkalicznym. I-lizyna glikoza 2-lizyna kontrolna. B) I-lizyna glikoza 2-glikoza kontrolna.

Ryc. 6. A) I-lizyna glikoza 2-glikoza kontrolna. B) Chromatogram lizyny ogrzewanej z glikozą w autoklawie w środowisku alkalicznym. I-lizyna glikoza 2-lizyna kontrolna.

Obecność nowych związków powstałych z aminokwasu i cukru stwierdzono chromatograficznie jedynie w przypadku lizyny i glicyny, po ich ogrzewaniu w autoklawie i pod chłodnicą zwrotną (Ryc. 5, 6). W wyniku ogrzewania lizyny z glikozą obok plam wzorcowych uzyskano nową plamę dodatkową wybarwiająca się ninhydryną i widoczną w świetle zwykłym. W przypadku glicyny na chromatogramie uwidocznił się cały szereg związków fluoryzujących widocznych w świetle lampy kwarcowej. Dało się również zauważyć ugrupowania intensywniej fluoryzujące w trzech miejscach, jedno z nich wybarwiało się ninhydryną, drugie szczawianem aniliny, trzeciego natomiast tymi wywo-

ływaczami nie udało się wybarwić. Rf tego związku wynosiło 0,25, glicyny kontrolnej 0,18.

W roztworach α alaniny i kwasu glutaminowego po ogrzewaniu pod chłodnicą zwrotną oraz w autoklawie stwierdzono na chromatogramach zmniejszenie plam w porównaniu z aminokwasami kontrolnymi, natomiast nowych związków nie wykryto. Podobnie potwierdzono ubytek glikozy.

W środowisku obojętnym po ogrzewaniu wszystkich aminokwasów z glikozą w temperaturze wrzenia nie stwierdzono zasadniczego ubytku azotu aminowego, podobnie zachowywały się one podczas ogrzewania w autoklawie. Wyjątek stanowiła lizyna i kwas glutaminowy, gdzie nastąpił ubytek azotu aminowego. W przypadku lizyny na chromatogramie po wybarwieniu ninhydryną uwidocznił się nowy związek położony wyżej, niż plama aminokwasu kontrolnego (Ryc. 7).



Ryc. 7. A) chromatogram lizyny ogrzewanej z glikozą w autoklawie w środowisku obojętnym. 1-lizyna glikoza 2-lizyna kontrolna. B) 1-lizyna glikoza 2-glikoza kontrolna

W przypadku kwasu glutaminowego nie stwierdzono obecności nowego związku.

W środowisku kwaśnym w mieszaninach glicyny i glikozy, α -alaniny i glikozy oraz kwasu glutaminowego z glikozą stwierdzono ubytek azotu aminowego podobnie jak w roztworach samych aminokwasów, natomiast w obecności lizyny i glikozy nie zaobserwowano tego. Wskazuje to, że nieobecność glikozy w roztworze ma wpływ na ubytek azotu aminowego, lecz być może temperatura i odczyn środowiska.

Ubytek azotu aminowego jest jednak niższy niż w środowisku alkalicznym. Próby ogrzewane w autoklawie wykazały obniżkę azotu aminowego, jednak nie udało się wykryć nowo powstałych związków metodą chromatograficzną.

WNIOSKI

1. Spośród trzech zbadanych parametrów, największy wpływ na przebieg reakcji aminokwasu z glikozą ma odczyn środowiska i temperatura. Czas trwania reakcji nie ma wpływu istotnego. Wprawdzie podczas 15 minutowego ogrzewania w temp. 117° ubytek azotu aminowego następuje zarówno w środowisku alkalicznym obojętnym, jak i w kwaśnym, jednak jest on najbardziej zaznaczony w środowisku alkalicznym.

2. Ocena strat na podstawie chromatograficznego stwierdzenia obecności nowych związków jest możliwa jedynie w poszczególnych przypadkach, ponieważ nie zawsze równolegle z ubytkiem azotu aminowego można je wykryć. Obecność nowych związków stwierdzono jedynie w wyniku reakcji glicyny i lizyny z glikozą w środowisku alkalicznym oraz lizyny z glikozą w środowisku obojętnym podczas ogrzewania w autoklawie.

М. Никоноров, Х. Шиби́нская-Карпинская

ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕНИ, ТЕМПЕРАТУРЫ И pH ПО ОТНОШЕНИЮ К РЕАКЦИЯМ НЕКОТОРЫХ АМИНОКИСЛОТ С ГЛЮКОЗОЙ

Содержание

Химические перемены выступающие в пищевых продуктах во время хранения выясняют действием энзимов, а также способностью аминокислот реагировать с сахарами. Реакции эти очень часто принято называть — реакцией Maillarda.

Возникновение в пищевых продуктах соединений аминокислот с сахарами уменьшают их биологическую и питательную стоимость; например в молочном порошке изменяется также органолептические свойства.

Существующие до сих пор исследования этих соединений не выяснили строения, а также нет обще принятого взгляда на механизм и условия их образования.

Учитывая химические свойства аминокислот исследовано обстоятельства, которые способствуют химическим соединениям глицина, аланина, лизина и глутаминовой кислоты с глюкозой. Реакцию провели в кислой, нейтральной и щелочной средах.

Убыток аминокислот определено методом Van Slyke'a (количество аминного азота), а также хроматографически (величина пятна). Убыток глюкоза определено хроматографически. На хроматограммах видны были, в случае присутствия лизина и глицина, новые соединения возникшие как результат реакции аминокислот с глюкозой.

М. Nikonorow, H. Przybińska-Karpińska

INFLUENCE OF TIME, TEMPERATURE AND pH ON THE COURSE OF REACTION OF SOME AMINOACIDS WITH GLUCOSE

Summary

Chemical changes that occur in foods when preserved or stored can be explained by an action of enzymes or by an ability of aminoacids to react with carbohydrates. They are sometimes called Maillard's reactions.

Formation of joinings of aminoacids and carbohydrates in foods brings about the decrease in their biological nutritional value and the changes in their apparent properties as in powdered milk, c. g. The studies of these compounds up to now did not permit to fini their structure and to form a unique opinion about the mechanism and conditions of their formation. Taking into account the chemical properties of aminoacids we studed in what conditions are formed the joinings of glycine, alamine, lysine and glutaminic acid with glucose. The reaction was performed in acid, neutral and basic environments. Decrease of aminoacids was determined by the Van Slyke's method from the amount of amino-nitrogen and by the chromatographic method from the sizes of the spots. Decrease of glucose was determined chromatographically. In cases with lysine and glycine some new compounds appeared on a chromatogram that were formed in the reaction of aminoacids with glucose.

PIŚMIENICTWO

1. Maillard L. C.: *Comp. Rend.*, 154, 66, 1912. — 2. Betzecka K.: *Acta Bioch. Pol.*, III, 497, 1956. — 3. Cavalieri L. F., Wolfrom M. L.: *J. Am. Chem. Soc.*, 68, 2022, 1946. — 4. Wolfrom M. L., Liebe G., Cavalieri L. F., Doris K.: *J. Am. Chem.*, 69, 2412, 1947. — 5. Lea C. H.: *Chem. Ind.*, 9, 155, 1950. — 6. Lea C. H., White C. D.: *J. Dairy Res.*, 15, 298, 1948. — 7. Levy M., Silberman D.: *J. Biol. Chem.*, 99, 767, 1933. — 8. Levy M.: *J. Biol. Chem.*, 118, 723, 1937. — 9. Heintze K.: *Dtsch. Lebensmitt. Rdsch.*, 51, 69, 1955. — 10. *Guide de Luca*: *Ind. Conserve*, 2, 322, 1954.
11. Gulland D., Mead A.: *J. Chem. Soc.*, 210, 1935. — 12. Ambler J. A.: *Ind. Eng. Chem.*, 21, 47, 1929. — 13. Scallet B. L., Gardner J. H.: *J. Am. Chem.*, 67, 1934, 1945. — 14. Stadtman F.: *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 3583, 1948. — 15. Stadtman F. H., Chischester C. O., Macinney G.: *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 3194, 1954. — 16. Lawrance J.: *J. Biol. Chem.*, 212, 973, 1955. — 17. Friedman L., Kline O.: *J. Nutr.*, 40, 295, 1950. — 18. Friedman L., Kline O.: *J. Biol. Chem.*, 184, 599, 1950. — 19. Schroeder L., Jacobellis M., Smith A. H.: *J. Biol. Chem.*, 212, 973, 1955. — 20. Henry K. M., Kon S. H., Lea C. H., White J. C.: *D-XII-th Intern. Dairy Congr.*, 11s, 2, 166, 1949.
21. *Przem. Roln. i Spoż.*, 12, 1953. — 22. Mauron J., Mottu F., Bujard E., Egli R.: *Arch. Biochem. Bioph.*, 59, 433, 1955. — 23. Lea C. H.: *J. Dairy Res.*, 15, 364, 1948. — 24. Van Slyke D. D.: *J. Biol. Chem.*, 9, 185, 1911. — 25. Van Slyke D. D.: *J. Biol. Chem.*, 12, 275, 1912. — 26. Markuze Z.: *Rocz. PZH*, VII, 5, 395, 1956.