

WYDZIELANIE LIZYNY Z ODCHODÓW ZWIERZĄT

Jan Kryściak, Urszula Mirek, Danuta Kidzińska

Wydział Farmaceutyczny  
Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

WSTĘP

Aminokwasy zawarte w hydrolizacie białkowym można rozdzielać dwoma sposobami. Przy wydzieleniu najwyżej kilku aminokwasów stosuje się selektywne wytrącanie. W ściśle określonych warunkach różne aminokwasy tworzą bowiem z pewnymi odczynnikami nierozpuszczalne kompleksy. Jeśli z hydrolizatu wydzielone mają być wszystkie aminokwasy lub co najmniej większość - wtedy stosuje się preparatywny rozdział techniką jonowymiennej chromatografii kolumnowej. Większą wydajność, przy znacznie mniejszej czasochłonności uzyskuje się przy stosowaniu selektywnego strącania. Do stosowania na skalę masową technika ta jest jednak nieprzydatna z uwagi na koszt odczynników strącających, jak i z uwagi na nie zawsze łatwe do zapewnienia warunki strącania. Znacznie przydatniejsza do stosowania na skalę przemysłową byłaby metoda możliwie selektywnego wydzielenia jednego lub najwyżej kilku aminokwasów maksymalnie uproszczoną techniką jonowymiennej chromatografii kolumnowej. Taką uproszczoną technikę do selektywnego wydzielenia kwasu dwuaminopimelinowego (DAP) z moczu opracowano do celów analitycznych [1]. Analiza wykazała, że wraz z DAP selektywnie wydziela się lizyna. Z uwagi na dużą wartość lizyny w żywieniu zwierząt celowe było tę analityczną procedurę adaptować na skalę preparatywną pod kątem zastosowania do wydzielenia tego aminokwasu z hydrolizatów białkowych. W niniejszej pracy tę zaadaptowaną procedurę zastosowano do wydzielenia lizyny z hydrolizatu odchodów zwierząt.

## MATERIAŁ I METODY

Do przygotowania hydrolizatu użyto kału królików. Porcje o masie 250 g umieszczono w okrągłodennych kolbach o pojemności 2000 ml, zadawano 1000 ml 6 N HCl i gotowano pod chłodnicą zwrotną przez 24 godziny. Po zakończonej hydrolizie mieszaninę reakcyjną studzono, odbarwiano węglem aktywnym i sączono. Osad kilkakrotnie przemyto wodą destylowaną i odrzucono, a przesącz i popłuczyny łączono razem. Dla usunięcia nadmiaru HCl przesącz odparowywano w wyparce obrotowej (w porcjach po 500 ml) pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze około 50°C do gęstej mazi, którą wypłukiwano z kolby około 50 ml wody destylowanej. Po zhydrolizowaniu 1 kg kału otrzymano około 1000 ml roztworu hydrolizatu gotowego do dalszej obróbki. Tak przygotowany roztwór nazywany jest dalej „hydrolizatem wyjściowym”.

Do odsalania na skalę preparatywną przygotowano złożo wysokości 10 cm w kolumnie o średnicy 63 mm z kationitu w formie wodorowej. Kationit przygotowywano do uformowania złoża i uformowane złożo obrabiano przed użyciem w sposób opisany uprzednio [1]. Jednorazowo przez złożo kationitu przepuszczano 2500 ml roztworu i odrzucano wyciek przy przepuszczaniu hydrolizatu. Następnie złożo przemyto 500 ml 0,2 N HCl i wyciek także odrzucono. Po przemyciu złożo eluowano 1,4 N HCl odrzucając pierwsze 2000 ml wycieku. Jako wyciek odsolony zbierano 5000 ml dalszego wycieku, czyli od 2001 do 7000 ml 1,4 N HCl.

Chemikalia - wszystkie stosowane były cz.d.a.

Oznaczenia aminokwasów prowadzono na automatycznym analizatorze aminokwasów AAA 881. Rozdzielano w układzie parametrów stosowanych dla hydrolizatów białkowych.

## WYNIKI

Przygotowanie hydrolizatu wyjściowego do odsalania.

Dla ustalenia stężenia kwasu w hydrolizacie wyjściowym 1 ml tego roztworu zmiareczkowano ustalając pH-metrycznie punkt równoważnikowy. Dodatkiem stechiometrycznie obliczonej ilości roztworu NaOH obecny w hydrolizacie HCl zobojętniono, pozostawiając niezobojętnione około 1 mola kwasu. Następnie hydrolizat rozcieńczono do końcowej objętości równej 5000 ml. W powstałym rozcieńczonym roztworze stężenie HCl wynosiło około 0,2 M. W tak przygo-

towanym roztworze oznaczono skład aminokwasowy i po przeliczeniu na całą objętość hydrolizatu wyjściowego przedstawiono w tabeli 1.

T a b e l a 1

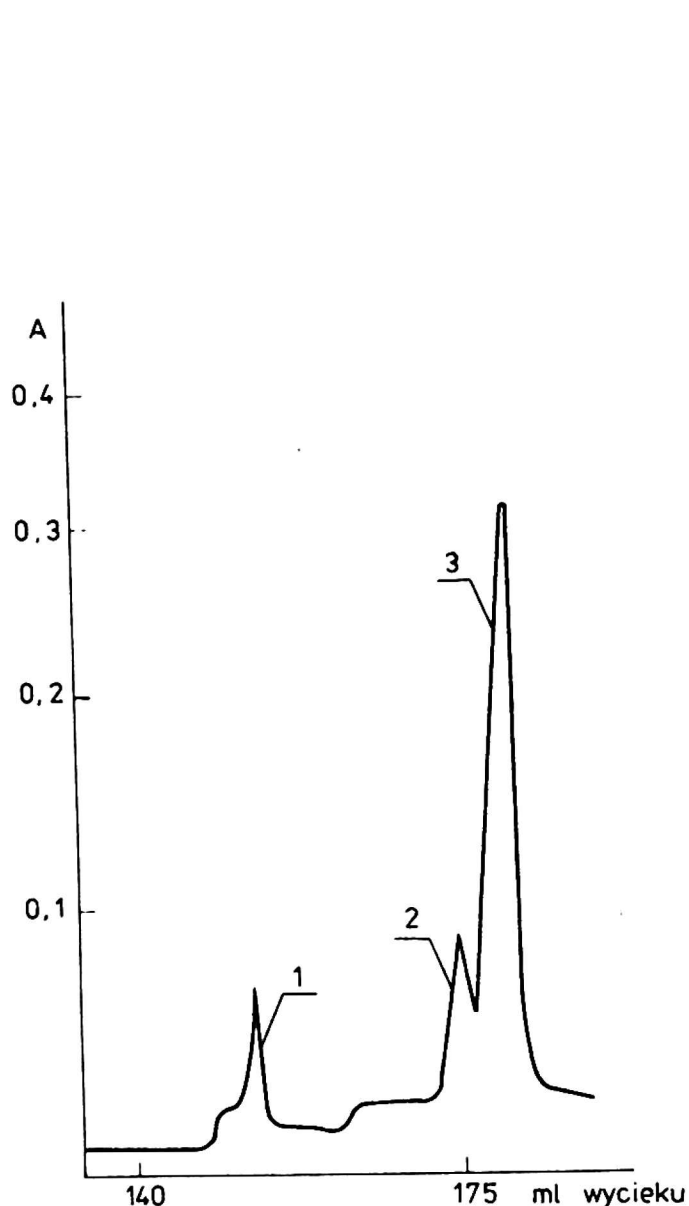
Skład aminokwasowy hydrolizatu wyjściowego i wycieku odsolonego (wartości wyrażone jako ilości gramów poszczególnych aminokwasów w całych objętościach tych roztworów)

Aminokwas	Hydrolizat wyjściowy	Wyciek odsolony
Kwas asparaginowy	4,51	-
Treonina	2,93	-
Seryna	1,46	-
Kwas glutaminowy	5,93	-
Prolina	2,03	-
Glicyna	2,64	-
Alanina	3,04	-
Cystyna	0,36	-
Walina	2,19	-
DAP	0,24	0,20
Metionina	0,73	-
Izoleucyna	1,77	-
Leucyna	2,89	-
Tyrozyna	0,85	0,44
Fenylalanina	2,40	1,52
Lizyna	3,58	2,44
Histydyna	0,70	0,62
Amoniak	1,48	-
Arginina	2,11	-

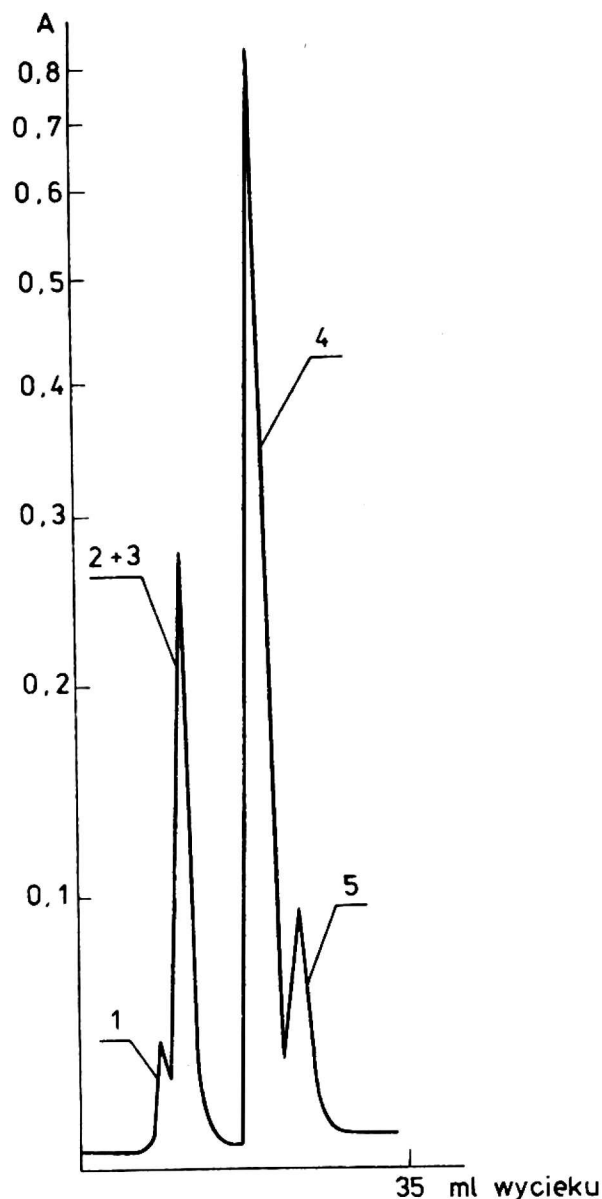
#### Odsalanie i badanie wycieku odsolonego.

Cały rozcieńczony roztwór hydrolizatu wyjściowego odsolono w dwóch porcjach po 2500 ml każda. Zebrano około 10 litrów wycieku odsolonego, który odparowano do konsystencji gęstej mazi i rozpuszczono w wodzie destylowanej. Po odparowaniu całości otrzymano 300 ml zagęszczonego roztworu wycieku odsolonego. Dla oznaczenia zawartości aminokwasów 1 ml tego zagęszczonego roztworu rozcieńczono do 20 ml i na kolumnę długą naniesiono 0,2 ml roz-

tworu rozcieńczonego, a na kolumnę krótką 0,1 ml. Na chromatogramie z kolumny długiej została zarejestrowana obecność trzech pików: DAP, tyrozyny i fenyloalaniny (rys. 1). Na chromatogramie z kolumny krótkiej (rys. 2) oprócz tamtych trzech aminokwasów zarejestrowana została jeszcze obecność lizyny i histydyny. Zarejestrowane ilości aminokwasów po przeliczeniu na całą objętość wycieku odsolonego zestawiono w tabeli 1.



Rys. 1. Chromatogram analizy wycieku odsolonego. Kolumna długa, 1 - DAP, 2 - tyrozyna, 3 - fenyloalanina



Rys. 2. Chromatogram analizy wycieku odsolonego. Kolumna krótka, 1 - DAP, 2 i 3 - tyrozyna wraz z fenyloalaniną, 4 - lizyna, 5 - histydyna. Naniesiono tu połowę ilości naniesionej na kolumnę długą

W hydrolizacie wyjściowym obok aminokwasów znajdowały się monosacharydy pochodzące z niestrawionych polisacharydów, uwolnione

w trakcie hydrolizy składniki tłuszczów (kwasy tłuszczowe, gliceryna, aminy, kwas fosforowy), aminy biogenne, amoniak, różne produkty degradacji i katabolizmu składników materiału roślinnego i biomasy bakterii (bytujących w przewodzie pokarmowym królika) powstałe w przewodzie pokarmowym królika jak i w czasie hydrolizy, sole nieorganiczne. Z tej mieszaniny, drogą jednej operacji odsalania, usunięte zostały wszystkie związki o cząsteczkach elektrycznie obojętnych w środowisku kwaśnym, a więc wszystkie monosacharydy, gliceryna itp. Usunięte zostały wszystkie związki o cząsteczkach zjonizowanych z ładunkiem ujemnym, a więc wszystkie kwasy tłuszczowe, różne związki organiczne o kwaśnym charakterze i im podobne. Usunięte zostały także sole nieorganiczne, które jak stwierdzono wcześniej [1] opuszczają złożę kationitu na początku eluowania 1,4 M roztworem HCl. Na złożu kationitu w kwaśnym środowisku zatrzymywane są: aminokwasy, aminy i amoniak. W warunkach stosowanych w trakcie odsalania część z nich opuszcza złożę przed frakcją wycieku odsolonego, część pozostaje nadal w złożu kationitu silnie z nim związana, a do wycieku odsolonego przechodzi tylko pięć aminokwasów: DAP, tyrozyna, fenyloalanina, lizyna i histydyna. Amoniak i różne aminy reagują z ninhydryną z wytworzeniem barwnych produktów reakcji i dlatego brak innych pików na chromatogramie zarejestrowanym z kolumny krótkiej analizatora pozwala sądzić, że aminy w wycieku odsolonym mogą znajdować się tylko w śladowych ilościach.

Porównanie zawartości aminokwasów obecnych w wycieku odsolonym z ich zawartościami w hydrolizacie wyjściowym (tab. 1) wskazuje, że procedura odsalania powoduje najmniejsze straty w przypadku DAP i histydyny. Do wycieku odsolonego przeszła około połowa pierwotnej ilości tyrozyny, około  $3/5$  pierwotnej ilości fenyloalaniny i około  $2/3$  pierwotnej ilości lizyny. W wycieku odsolonym powinna także znajdować się pewna ilość cystyny. Prawdopodobnie uległa ona w trakcie odsalania i odparowywania roztworów utlenieniu do kwasu cysteinowego, a także procesowi destrukcji.

#### WNIOSKI

1. Oceniając procedurę odsalania, zastosowaną na skalę preparatywną do hydrolizatu kału królika, pod kątem ewentualnego wydzielania zawartej w hydrolizacie lizyny można stwierdzić, że

jest to procedura bardzo wydajna. Droga jedną tylko operacji można uwolnić lizynę od całego balastu składników innych niż aminokwasy i od większości aminokwasów występujących w hydrolizacie wyjściowym.

2. Uzyskany po odsoleniu preparat mógłby być stosowany w żywieniu zwierząt bez dalszego oczyszczania. Obok lizyny obecne są tylko: DAP, tyrozyna, fenyloalanina i histydyna.

3. Opisanemu procesowi odsolenia można poddać tylko dość silnie rozcieńczone roztwory hydrolizatu materiału białkowego. W konsekwencji, wydzielona z hydrolizatu lizyna znajduje się w roztworze w znacznym rozcieńczeniu. Pociąga to za sobą konieczność odparowywania znacznych ilości wody. Oznacza to, że opisany proces może być stosowany do wydzielania lizyny z hydrolizatów materiałów białkowych po znalezieniu taniej i efektywnej metody wykrywania tego aminokwasu z rozcieńczonych roztworów wodnych.

#### LITERATURA

1. Kryściak J., Chem. Anal., 20, 549, 1975.

Я. Крысцяк, У. Мирек, Д. Кидзиньска

#### ИЗОЛИРОВАНИЕ ЛИЗИНА ИЗ ОТХОДОВ ЖИВОТНЫХ

#### Р е з ю м е

Для изолирования лизина из белкового гидролизата применяли особую обессоливающую процедуру. В качестве исходного материала использовали кроличьи отходы. После гидролиза этого материала и обессоления гидролизата, получали обессоленный сок. Проведенный анализ показал, что в обессоленном соке содержатся только пять аминокислот, в частности: диаминопимелиновая кислота, тирозин, фенилоаланин, лизин и гистидин.

J. Kryściak, U. Mirek, D. Kidzińska

ISOLATION OF LYSINE FROM ANIMAL FAECES

S u m m a r y

For isolation of lysine from the protein hydrolysate a special desalting procedure was applied. Rabbit faeces were used as the starting material. Upon hydrolyzing this material and desalting the hydrolysate, a desalted effluent was obtained. The analysis has proved that in the desalted effluent only five amino acids occur, viz.: diaminopimelic acid, tyrosine, phenylalanine, lysine and histidine.