

OZNACZANIE SKŁADU AMINOKWASOWEGO PASZ PRZY ZASTOSOWANIU ELEKTROFOREZY WYSOKONAPIĘCIOWEJ

TERESA ŻEBROWSKA

Katedra Żywienia Zwierząt WSR w Olsztynie
Kierownik: prof. dr J. Dubiski

W ostatnich latach coraz bardziej odczuwa się potrzebę znajomości składu aminokwasowego pasz dla odpowiedniego jego zbilansowania w dawce pokarmowej. W polskiej literaturze brak jest prac dotyczących ilościowego oznaczania aminokwasów w paszach. Źródłem wiadomości na ten temat są prace obce, które nie zawsze mogą być z całą dokładnością odnoszone do naszych pasz, wyprodukowanych w innych warunkach, a więc różniących się składem chemicznym i wartością pokarmową.

Brak własnych danych o składzie aminokwasowym białka pasz spowodowany jest przede wszystkim trudnościami natury analitycznej. Stosowane dotychczas metody mikrobiologiczne i chromatograficzne okazały się zawodne przy ilościowym oznaczaniu aminokwasów w materiale biologicznym zarówno z powodu wielu czynników wpływających na ostateczny wynik analizy, jak też i wobec trudności w jej wykonaniu.

Podstawą dokładnego ilościowego oznaczania aminokwasów jest uzyskanie dobrego ich rozdziału, co przy zastosowaniu chromatografii bibułowej jest niezmiernie trudne. Opracowana przez Wielanda (16, 17, 18) metoda elektroforezy wysokonapięciowej, a przez Kickhofena, Westphala i Masłowskiego (10, 11, 12) metoda elektrochromatografii w dużym stopniu ułatwiły dokładny rozdział aminokwasów, skracając przy tym znacznie czas potrzebny do wykonania analizy.

Drugim ważnym czynnikiem wpływającym na dokładność ilościowego oznaczania aminokwasów w paszach jest właściwe przygotowanie hydrolyzatów. We wszystkich paszach pochodzenia roślinnego obok ciał azotowych znajdują się znaczne ilości innych składników wpływających niekorzystnie na wynik hydrolizy. Przede wszystkim zachodzi obawa strat aminokwasów w czasie hydrolizy białka w obecności tłuszczu i węglowodanów. Block (4) zaleca odtłuszczenie próbek i częściowe chociażby usuwanie węglowodanów. Jednak takie postępowanie jest związane

zawsze z pewnymi stratami białka (15). Bigwood (za Vogeli 15) hydrolizował próbki pasz bez uprzedniego usuwania węglowodanów; stwierdził on, że niekorzystny wpływ węglowodanów można zmniejszyć przez odpowiedni stosunek 6n kwasu solnego, stosowanego do hydrolizy, do ilości hydrolizowanego białka. Dunn (6) podaje, że obecność węglowodanów i małej ilości tłuszczu przy hydrolizie kwaśnej nie powoduje strat argininy, kwasu asparaginowego i glutaminowego, glicyny, histydyny, leucyny, izoleucyny, fenyloalaniny, treoniny i waliny. W czasie hydrolizy kwaśnej w obecności węglowodanów zupełnemu rozkładowi ulega tryptofan, a częściowemu cystyna i metionina (4, 6). Tryptofan, rozkładający się w czasie hydrolizy kwaśnej, nie wykazuje strat przy hydrolizie zasadowej. (4, 15).

Stopień rozkładu aminokwasów zależy od temperatury i czasu hydrolizy. Najczęściej stosuje się hydrolizę kwaśną 6n kwasem solnym przez 18—24 godz. w temp. 100—120°C (1, 4).

W naszej Katedrze już od kilku lat prowadzone są badania nad oznaczaniem aminokwasów w paszach. Pierwsze próby przeprowadzone przy zastosowaniu chromatografii bibułowej nie dały zadowalających wyników. Dopiero wprowadzenie elektroforezy wysokonapięciowej umożliwiło dokładne rozdzielenie i oznaczenie ilościowe aminokwasów w paszach. Celem ustalenia najwłaściwszego sposobu postępowania z badanym materiałem, sprawdzono dotychczas stosowaną metodę, przystosowując ją do oznaczania aminokwasów w paszach. Oznaczono skład aminokwasowy makucha lnianego, śruty poekstrakcyjnej lnianej, rzepakowej, sojowej i otrąb pszennych.

BADANIA WŁASNE

I. Odczynniki:

1. Aminokwasy firm: BDH Anglia, L. Light & Co L. t. d. Anglia, La Roche Szwajcaria, Fluk Szwajcaria, Schurhardt NRF.
2. Bufor o pH 6,5: 100 ml pirydyny + 10 ml kwasu octowego lodow. + 890 ml wody.
3. Bufor o pH 2: 150 ml kwasu octowego lodow. + 50 ml kwasu mrówkowego + 800 ml wody.
4. Rozpuszczalnik: n butanol — kwas octowy lodowaty — woda (4 : 1 : 1).
5. Roztwór ninhydryny: 1 g ninhydryny + 600 ml metanolu + 350 ml butanolu + 30 ml 2n kwasu octowego.
6. Wywoływacz miedziowy: 2 ml nasyconego roztworu $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ + 0,2 ml 10% kwasu azotowego + 100 ml acetonu.
7. 0,5 mol roztwór siarczanu niklowego.
8. Bibuła Whatman nr 3 i nr 4.

II. Aparatura:

1. Komora elektroforetyczna wykonana wg Masłowskiego (12).
2. Prostownik.
3. Autotransformator.
4. Kolorymetr Pulfricha z przystawką ELPHO-2.

PRZYGOTOWANIE HYDROLIZATÓW

1. Hydroliza kwaśna

Próbkę dokładnie rozdrobnionej paszy, zawierającą 16 mg azotu, hydrolizowano w szklanej fiolce z 10 ml 6n kwasu solnego przez 21 godzin w temperaturze 110°C. Hydrolizat sączono przez sączek G 54 w celu oddzielenia humin i zagęszczano w kolbie Claysena przy temp. 50°C. Pozostałość przemywano trzykrotnie małymi ilościami wody redestylowanej w celu usunięcia kwasu solnego i odparowywano. Suchą pozostałość rozpuszczano w 5 ml 10% izopropanolu i przechowywano w lodówce. 1 ml hydrolizatu odpowiadał 3,2 mg azotu.

2. Hydroliza zasadowa

Próbkę zawierającą 16 mg azotu zbadano 10 ml nasyconego Ba(OH)₂ i w zatopionej szklanej fiolce hydrolizowano przez 20 godzin w temp. 110°C. Hydrolizat zobojętniano 1n kwasem siarkowym do pH około 6 i wirowano przez 10 min. przy 11 500 obrotach. Płyn odsyfonowano, a osad dwukrotnie przemywano wodą redestylowaną i wirowano. Otrzymany roztwór odparowywano w kolbie Claysena do sucha i pozostałość rozpuszczano w 5 ml 10% izopropanolu. 1 ml hydrolizatu zawierał 3,2 mg azotu.

Hydrolizat zasadowy służył do oznaczania tryptofanu. Wszystkie pozostałe aminokwasy oznaczano w hydrolizacie kwaśnym.

Huminy spalano z 2 ml kwasu siarkowego, a znajdujący się w nich azot oznaczono mikrodyfuzyjną metodą Conwaya (5).

N-NH₃ w hydrolizatach oznaczano również metodą Conwaya.
Roztwory wzorcowe.

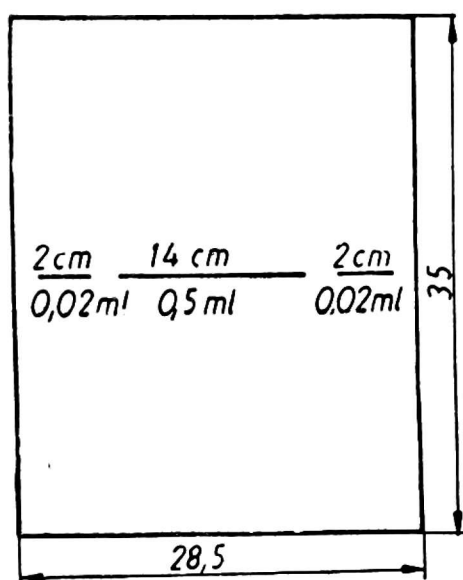
Przygotowano dwa rodzaje roztworów wzorcowych: 1) 0,01 mol roztwory pojedynczych aminokwasów, 2) 0,01 mol roztwory mieszanin aminokwasów obojętnych, kwaśnych i zasadowych w 10% izopropanolu.

ANALIZA JAKOŚCIOWA AMINOKWASÓW

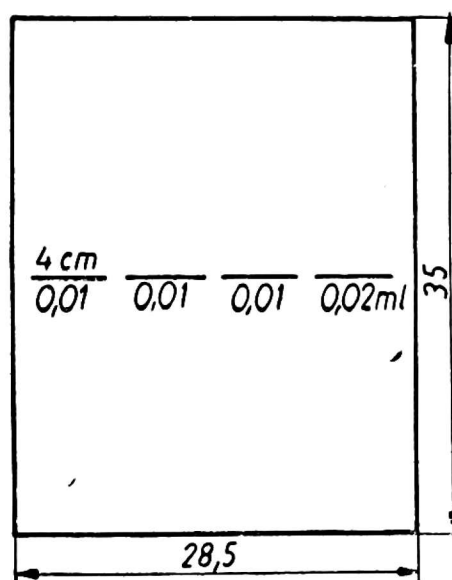
Arkusze bibuły Whatman 3 o wymiarach 35 × 28,5 cm zwilżano buforem pirydynowym i umieszczano na szklanej płycie komory elektroforetycznej. Na środku arkusza наносzono 0,5 ml hydrolizatu na pasek

długości 14 cm oraz po 0,02 ml na paski zewnętrzne o długości 2 cm. Sposób nanoszenia hydrolizatów podany jest na rys. 1. Bibułę łączono ze źródłem prądu w sposób podany przez Masłowskiego (12).

Elektroforegram rozwijano przez 1,5 godz. przy napięciu 28,5 V/cm długości paska bibuły. Po wyjęciu z komory elektroforegram suszono w temp. 70°C przez 30 min. Zewnętrzne paski odcinano i wywoływano roztworem ninhydryny w celu dokładnego oznaczania położenia aminokwasów obojętnych. Następnie pasek bibuły z aminokwasami obojętymi wycinano i aminokwasy eluowano wodą redestylowaną z dodatkiem etanolu przez 24 godziny. Eluat odparowywano do sucha w kolbie Claysena i pozostałość rozpuszczano w 0,5 ml 10% izopropanolu. Tak przygotowany roztwór służył do rozdziału jakościowego oraz do ilościowego oznaczania aminokwasów obojętnych.



Rys. 1. Sposób nanoszenia hydrolizatów do rozdziału na aminokwasy kwaśne, zasadowe i obojętne



Rys. 2. Sposób nanoszenia hydrolizatów do oznaczania aminokwasów kwaśnych i zasadowych

Aminokwasy kwaśne i zasadowe oznaczano bez uprzedniego oddzielenia ich od aminokwasów obojętnych. W tym celu na arkusz bibuły o wymiarach $35 \times 28,5$ cm nanoszono badane hydrolizaty w ilości 0,01 ml na trzy paski o długości 4 cm oraz po 0,02 ml mieszaniny standardów na jeden pasek o długości 4 cm. Sposób nanoszenia roztworów podany jest na rys. 2. Elektroforegram rozwijano w buforze pirydynowym przez 2 godziny przy napięciu 28,5 V/cm długości paska bibuły. Po wyjęciu z komory bibułę suszono w temp. 70°C przez 30 min., spryskiwano roztworem ninhydryny, pozostawiano przez 30 min. na powietrzu i wywoływano w suszarce w temp. 70°C przez 10 min.

Aminokwasy obojętne rozdzielano metodą elektrochromatografii. Arkusz bibuły Whatman 3 o wymiarach $35 \times 28,5$ cm nasycano buforem

kwaśnym i umieszczano w komorze. W odległości 3 cm od jednego brzegu bibuły i 6 cm od drugiego brzegu, наносono 0,01 ml roztworu aminokwasów obojętnych w postaci owalnej plamki o średnicy ok. 1 cm. Elektroforegram rozwijano przez 2 godziny przy napięciu 34,5 V/cm długości paska i suszono w sposób podany wyżej. Do wysuszonego elektroforegramu przyszywano pasek bibuły Whatman 4 i chromatografowano w kierunku prostopadłym do kierunku elektroforezy przez 32 godziny w rozpuszczalniku n butanol — kwas octowy lod. — woda (4 : 1 : 1). Następnie elektrochromatogram suszono do zaniku zapachu rozpuszczalnika i aminokwasy wywoływano roztworem ninhydryny, tak jak aminokwasy kwaśne i zasadowe.

Wszystkie aminokwasy identyfikowano przy pomocy standardowych roztworów aminokwasów.

ILOŚCIOWE OZNACZANIE AMINOKWASÓW

Ilościowe oznaczanie aminokwasów przeprowadzono metodą kolorymetryczną, posługując się kolorymetrem Pulfricha z przystawką ELPHO-2. Plamy aminokwasów, zaraz po wywołaniu ninhydryną, wycinano, starając się zachować jednakową powierzchnię pasków lub krążków, a aminokwasy przeprowadzono w kompleksowe związki z miedzią wg metody Fischera (8). Następnie bibułę z plamami aminokwasów cięto na drobne skrawki i eluowano 5 ml metanolu. Barwne roztwory kolorymetrowano, stosując filtr S 50; dla proliny S 42.

Przy pomocy rozcieńczeń standardów dla każdego aminokwasu wykreślano krzywą i oznaczano graniczne wartości, dla których istniała liniowa zależność między stężeniem oznaczanego aminokwasu i ekstynkcją barwnego roztworu. Odczytywano ekstynkcję w tych granicach i obliczano stężenie aminokwasu z proporcji:

$$X = \frac{Ex \cdot st}{Est}$$

X — stężenie oznaczanego aminokwasu,

Ex — ekstynkcja dla roztworu badanego aminokwasu,

st — stężenie standardu,

Est — ekstynkcja dla standardu.

Takie postępowanie okazało się znacznie prostsze niż każdorazowe odczytywanie wyników z krzywych wzorcowych.

Przy oznaczaniu ilościowym aminokwasów kwaśnych i zasadowych na arkuszu z badanymi próbkami наносono zawsze mieszaninę standardów tych aminokwasów („metoda świadka”). Przy oznaczaniu aminokwasów obojętnych metodą elektrochromatografii, razem z arkuszem

bibuły, na którym znajdowała się badana próbka, chromatografowano i wywoływano elektrochromatogram z mieszaniną standardów. Zapewniano w ten sposób jednakowe warunki rozdziału i wywoływania standardom i próbkom badanym.

Wszystkie oznaczenia wykonywano w dwóch powtórzeniach.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Tabela 1 podaje procentowy udział poszczególnych frakcji azotu w hydrolizatach badanych pasz. Ilość azotu huminowego, wyrażonego w procentach azotu ogólnego, wynosi: 7,33 dla makucha lnianego, 3,5 dla śruty lnianej, 4,67 dla śruty rzepakowej, 4,48 dla śruty sojowej i 9,5 dla otrąb pszennych.

Tabela 1

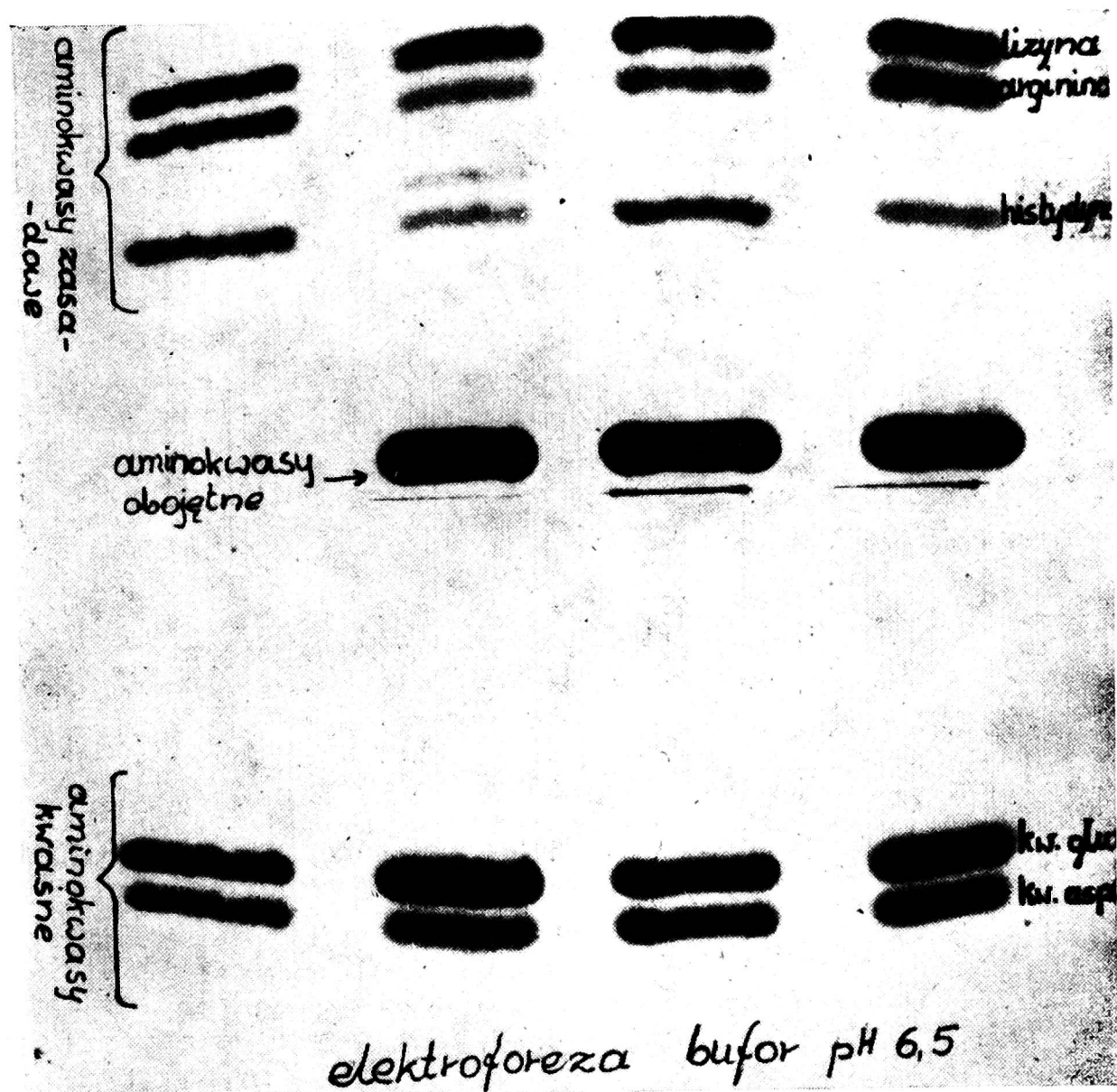
Procentowy udział N huminowego, N — NH₃ i N oznaczonych aminokwasów w hydrolizatach badanych pasz

Badana pasza	N huminowy	N-NH ₃	N aminokwasów	Suma N oznaczonego w stosunku do N ogólnego
Makuch lniany	7,35	11,31	77,75	96,39
Śruta lniana	3,50	12,68	76,68	92,86
Śruta rzepakowa	4,67	12,25	83,06	99,98
Śruta sojowa	4,48	10,31	84,18	98,97
Otręby pszenne	9,50	10,28	78,62	98,40

Przyczyną dużej ilości azotu huminowego, pozostałego po hydrolizie makucha lnianego mogła być stosunkowo wysoka zawartość tłuszczu; dla otrąb pszennych większa niż u pozostałych badanych pasz zawartość węglowodanów. Przy hydrolizie drożdży pastewnych Vögeli uzyskiwał 3,22% azotu huminowego (15).

Ilość azotu amoniakalnego waha się w granicach od 10,28 do 12,68% i jest najniższa dla otrąb pszennych i najwyższa dla śruty lnianej.

Suma azotu huminowego, amoniakalnego i azotu oznaczonych aminokwasów wyrażona w procentach azotu ogólnego wynosi od 92,86% dla śruty lnianej do 99,98% dla śruty rzepakowej. Ilość azotu nie oznaczonego w analizie, obliczona z różnicy azotu ogólnego przyjętego za 100 i azotu oznaczonego wynosi: dla makucha lnianego 3,61%, dla śruty lnianej 7,14%, dla śruty rzepakowej 0,02%, dla śruty sojowej 1,03% i dla otrąb pszennych 1,60%. Bigwood sugeruje, że azot nie oznaczony pochodzi głównie z nieaminokwasowych połączeń, a tylko w niewielkiej ilości z aminokwasów nie oznaczonych (3).

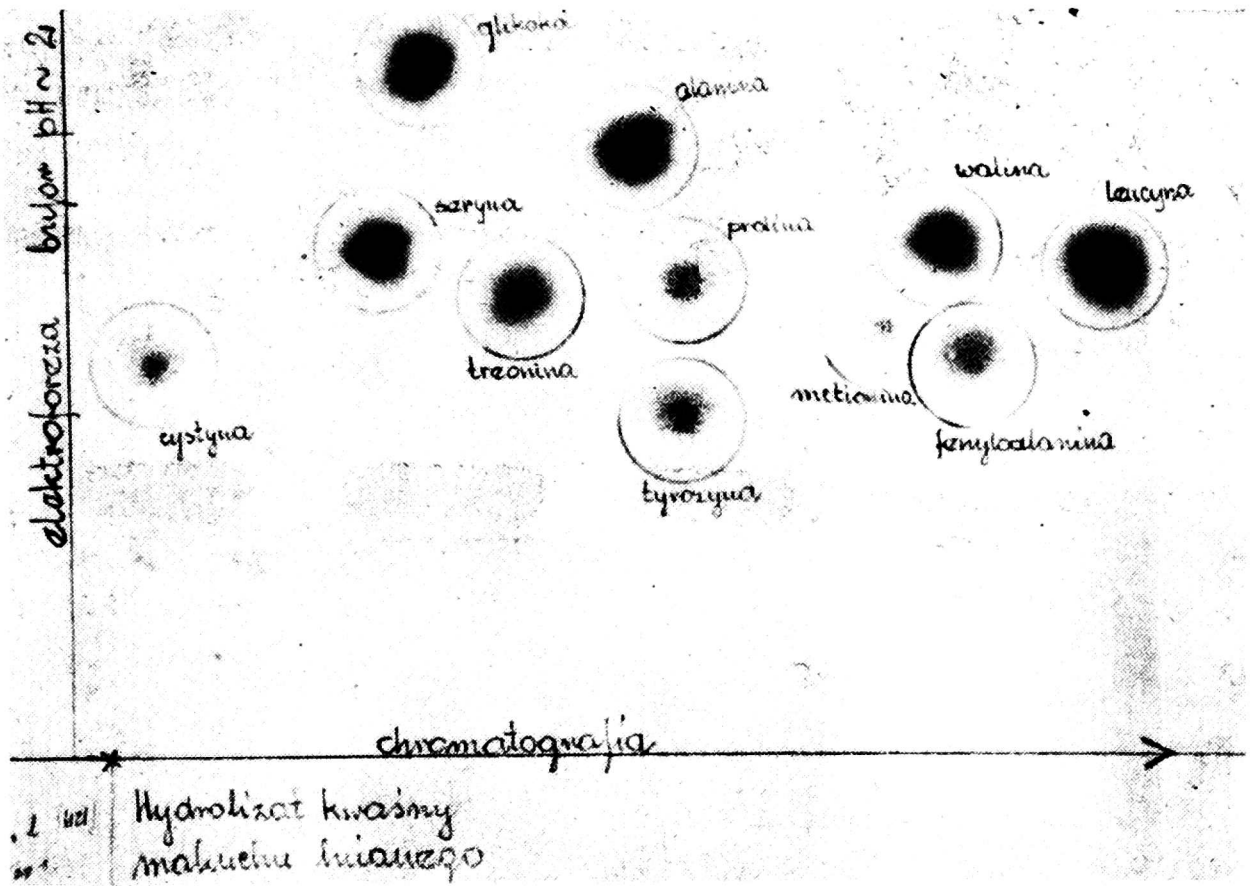


Rys. 3. Elektroforegram aminokwasów kwaśnych i zasadowych

Załączone fotografie (rys. 3, 4, 5, 6) ilustrują rozdział 17 aminokwasów w hydrolizatach kwaśnych makucha lnianego, śruty sojowej i rzepakowej. Jak widać, rozdział aminokwasów jest dokładny, uzyskane plamy są zwarte, a ich identyfikacja nie przedstawia żadnych trudności.

Podawane przez Masłowskiego (12) napięcia 70 V/cm długości paska dla aminokwasów kwaśnych i zasadowych oraz 80 V/cm dla aminokwasów obojętnych, przy zastosowaniu naszej aparatury okazały się za wysokie. Najlepsze wyniki uzyskano przy stosowaniu napięcia 28,5 V/cm długości paska dla aminokwasów kwaśnych i zasadowych oraz 34,3 V/cm dla aminokwasów obojętnych, przy przedłużeniu czasu rozwijania elektroforegramu do 2 godzin.

Stosując metodę elektrochromatografii po 16 godzinach chromatografowania w rozpuszczalniku n butanol — kwas octowy lod. — woda (4 : 1 : 1) uzyskano dobry rozdział wszystkich aminokwasów obojętnych z wyjątkiem metioniny i waliny oraz leucyny i izoleucyny. Walina i metionina rozdzielały się dopiero po 32 godzinach chromatografowa-



Rys. 4. Elektrochromatogram aminokwasów obojętnych w hydrolizacie kwaśnym makucho lnianego

Tabela 2

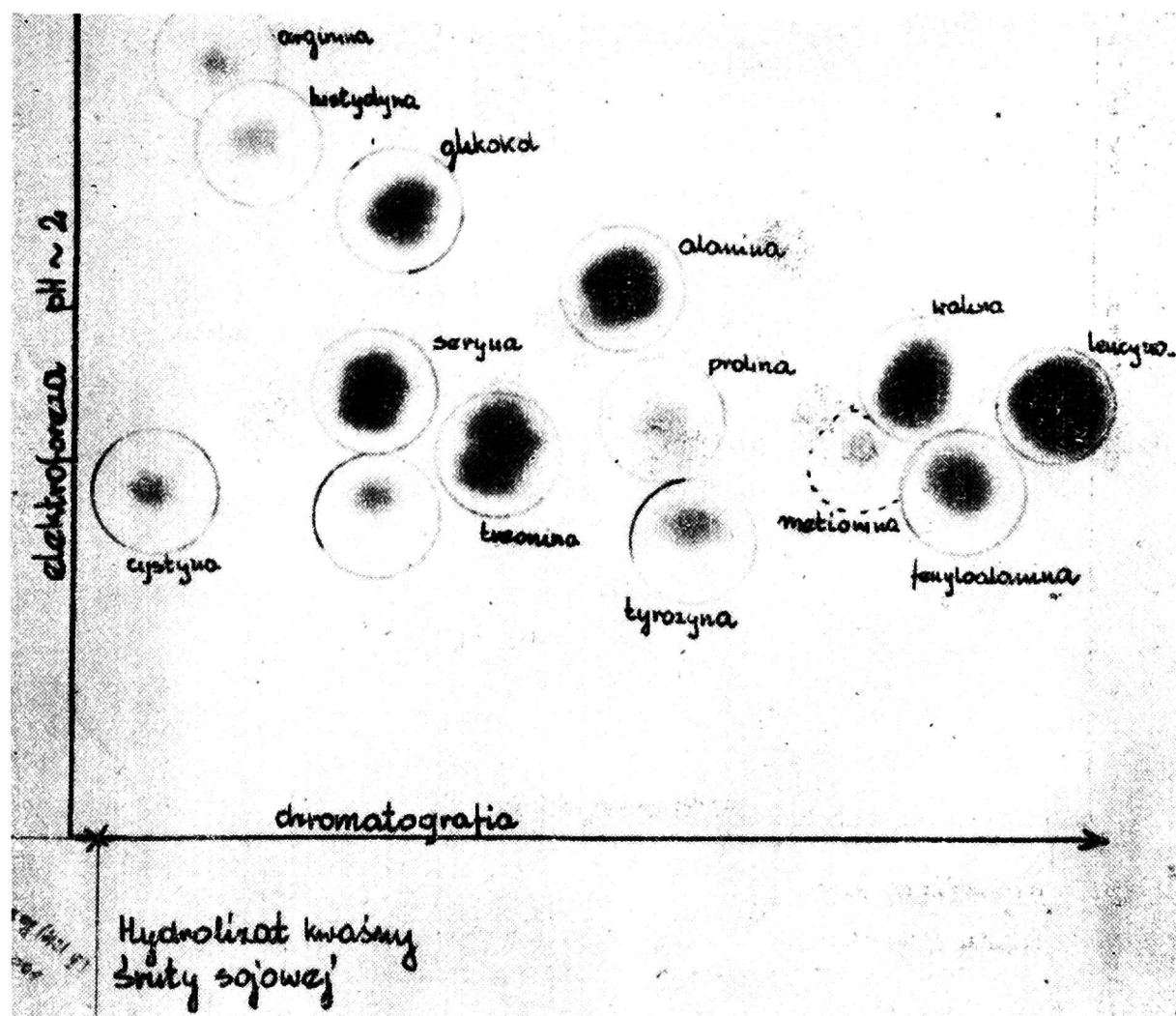
Skład aminokwasowy makucho lnianego
(zawartość aminokwasów w gramach przy 16 g N)

Lp.	Nazwa aminokwasu	Badania własne	Dustin (wg R. J. Block 4)	Williams (wg R. J. Block 4)
1	Kwas asparaginowy	8,90	9,6	—
2	Kwas glutaminowy	18,34	18,4	—
3	Histydyna	1,45	1,8	1,9
4	Arginina	10,72	9,6	8,6
5	Lizyna	4,21	3,3	4,1
6	Glicyna	3,03	5,6	—
7	Alanina	4,60	4,7	—
8	Seryna	4,19	4,8	—
9	Treonina	3,26	4,1	3,6
10	Tryptofan	0,94	1,3	1,5
11	Tyrozyna	1,22	2,4	2,2
12	Cystyna	2,07	1,9	—
13	Metionina	1,13	1,2	1,0
14	Leucyna + izoleucyna	9,12	6,4+4,1	5,6+5,9
15	Walina	5,29	4,7	4,9
16	Fenyloalanina	4,19	4,6	4,1
17	Prolina	3,54	3,4	—

Suma aminokwasów

85,39

91,9



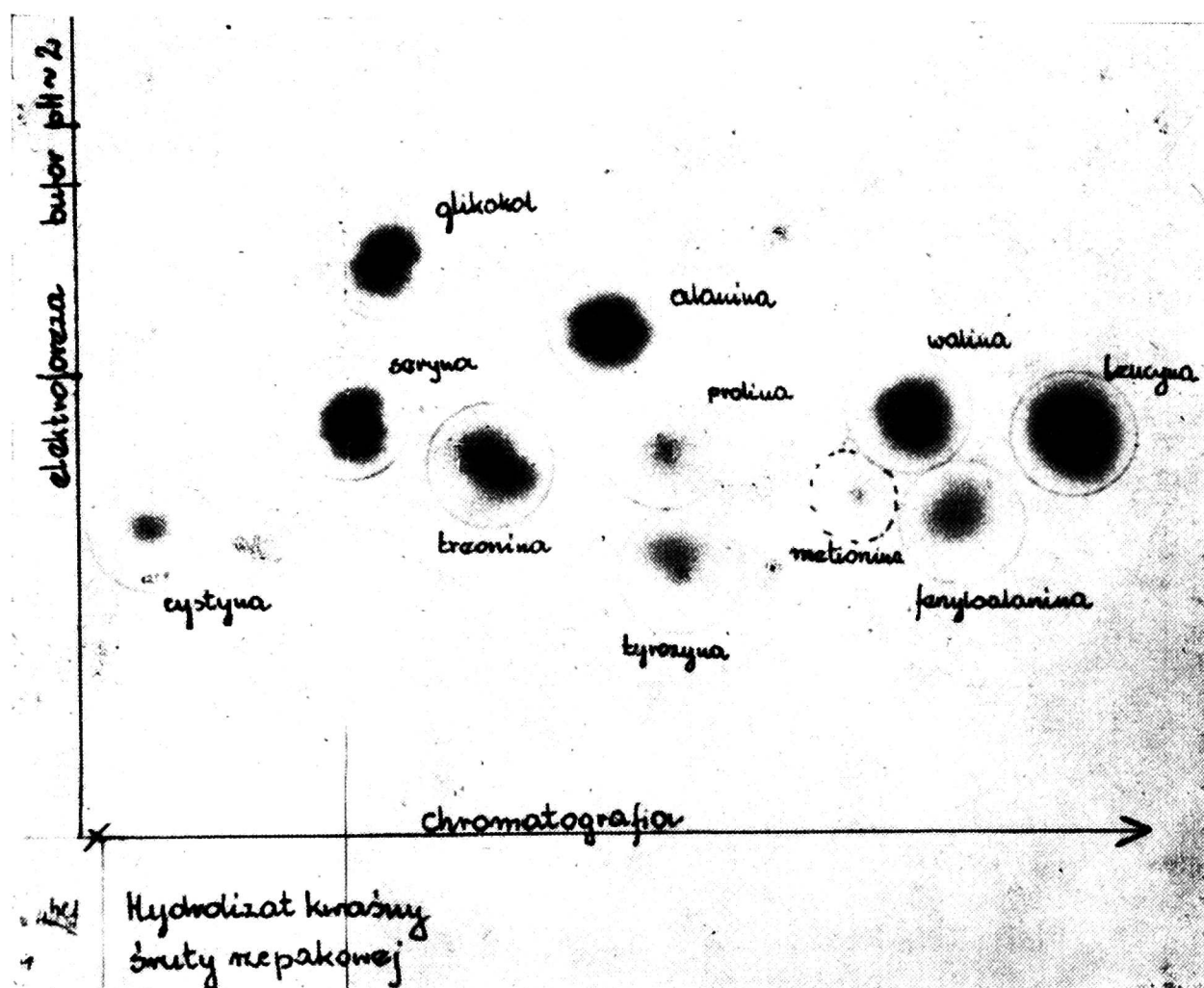
Rys. 5. Elektrochromatogram aminokwasów obojętnych w hydrolizacie kwaśnym śruty sojowej

nia, natomiast leucyna i izoleucyna przy tym układzie rozpuszczalników dawały zawsze jedną plamę.

Przy zastosowaniu metody elektroforezy wysokonapięciowej okazało się niepotrzebne dodatkowe oczyszczanie i odbarwianie hydrolizatów.

Tabela 2 podaje skład aminokwasowy makucha lnianego. Porównując wyniki analiz własnych z przytoczonymi wynikami innych autorów (4) większe różnice stwierdzamy tylko dla kilku aminokwasów. Zawartość glicyny w oznaczenia własnych wynosi 3,03 g. wg Dustina (7) — 5,6 g; tyrozyny znaleziono 1,22 g, wg Dustina — 2,1 g tryptofanu 0,94, wg Dustina — 1,3.

W tabeli 3 podany jest skład aminokwasowy śruty lnianej. Porównując wyniki uzyskane w doświadczeniu z wynikami Agrena (4) widać znaczne różnice w składzie aminokwasowym. Z wyjątkiem lizyny, alaniny i tyrozyny dla wszystkich pozostałych aminokwasów uzyskano wartości niższe. Szczególnie duże różnice występują w zawartości kwasu glutamiowego, histydyny, seryny, metioniny, leucyny i izoleucyny. Ilość oznaczonej lizyny wynosi 4,39 g, Agren podaje 3,5 g, a Holmes (4) aż 10 g.



Rys. 6. Elektrochromatogram aminokwasów obojętnych w hydrolizacie kwaśnym śruty rzepakowej

Zawartość aminokwasów w śrucie rzepakowej podaje tabela 4. W porównaniu z danymi z literatury (4) na uwagę zasługuje znacznie wyższa zawartość lizyny. Ilość lizyny oznaczona w badanej śrucie wynosi 8,14 g, Ågren podaje 3,5 g, a Nehring (14) tylko 2,62 g. Również wyższe wyniki uzyskano dla argininy i alaniny. Ågren i Nehring podają wyższe wartości dla histydyny, tryptofanu i metioniny, oraz Ågren dla seryny i proliny.

Tabela 5 podaje skład aminokwasowy śruty sojowej. Uzyskane wyniki są zbliżone do wartości podanych przez Dracketta (4), wyższe natomiast od wartości Ågrena. Szczególnie wyraźne różnice występują w ilości histydyny (3,55 g, Drackett — 2,6 g, Ågren — 5,3 g), lizyny, glicyny, leucyny i izoleucyny.

Skład aminokwasowy otrąb pszennych podany jest w tabeli 6. Wyniki analiz są zbliżone do danych z literatury (9). Niższe wartości uzyskano dla waliny, leucyny i izoleucyny.

Zawartość aminokwasów w pięciu badanych paszach, obliczona w stosunku do 100 g paszy, podana jest w tabeli 7.

Na podstawie omówionych wyników widać różnice w zawartości niektórych aminokwasów w badanych paszach w porównaniu z cytowa-

Skład aminokwasowy śruty lnianej
(zawartość aminokwasów w gramach przy 16 g N)

Tabela 3

Lp.	Nazwa aminokwasu	Badania własne	Ägren (wg R. J. Block 4)	Holmes (wg R. J. Block 4)
1	Kwas asparaginowy	9,78	11,8	9,6
2	Kwas glutaminowy	16,29	21,6	26,2
3	Histydyna	1,97	2,7	4,2
4	Arginina	8,56	9,9	12,1
5	Lizyna	4,39	3,5	10,0
6	Glicyna	4,02	6,7	3,9
7	Alanina	3,68	2,8	6,4
8	Seryna	3,81	6,3	—
9	Treonina	3,59	3,9	5,3
10	Tryptofan	0,97	1,4	—
11	Tyrozyna	3,29	2,2	4,3
12	Cystyna	0,89	0,9	—
13	Metionina	0,60	1,5	2,4
14	Leucyna + izoleucyna	9,38	6,3+5,6	7,5+3,9
15	Walina	3,43	5,9	6,6
16	Fenyloalanina	3,98	3,9	5,3
17	Prolina	4,54	4,8	—
Suma aminokwasów		81,99	101,7	

Tabela 4

Skład aminokwasowy śruty rzepakowej
(zawartość aminokwasów w gramach przy 16 g N)

Lp.	Nazwa aminokwasu	Badania własne	Ägren (wg R. J. Block 4)	Nehring (14)
1	Kwas asparaginowy	10,15	9,7	—
2	Kwas glutaminowy	17,09	17,1	—
3	Histydyna	1,48	2,6	3,00
4	Arginina	8,64	5,6	5,02
5	Lizyna	8,14	3,5	2,62
6	Glicyna	5,01	6,3	—
7	Seryna	4,40	8,6	—
8	Alanina	4,64	1,9	—
9	Treonina	3,10	3,8	4,02
10	Tryptofan	1,10	2,0	1,62
11	Tyrozyna	2,54	2,3	2,98
12	Cystyna	1,27	1,7	0,65
13	Metionina	0,74	1,1	1,48
14	Leucyna + izoleucyna	11,17	5,7+3,7	12,87
15	Walina	5,57	5,7	4,65
16	Fenyloalanina	5,43	4,0	5,06
17	Prolina	3,03	8,0	—
Suma aminokwasów		93,50	93,3	

Skład aminokwasowy śruty sojowej
(zawartość aminokwasów w gramach przy 16 g N)

Tabela 5

Lp.	Nazwa aminokwasu	Badania własne	Drackett (wg R. J. Block 4)	Ägren (wg R. J. Block 4)
1	Kwas asparaginowy	8,97	6,2	6,7
2	Kwas glutaminowy	19,13	19,5	16,0
3	Histydyna	3,54	2,6	1,5
4	Arginina	9,11	8,3	5,7
5	Lizyna	7,21	6,8	5,3
6	Glicyna	4,89	4,1	1,7
7	Alanina	4,52	3,6	5,7
8	Seryna	5,54	6,9	5,2
9	Treonina	4,89	3,9	2,6
10	Tryptofan	0,94	1,0	1,0
11	Tyrozyna	2,73	3,4	2,6
12	Cystyna	0,97	0,6	0,7
13	Metionina	0,91	1,0	1,1
14	Leucyna + izoleucyna	10,30	7,5+6,5	7,2+4,3
15	Walina	3,30	5,5	4,8
16	Fenylalanina	3,03	5,0	3,8
17	Prolina	1,73	2,5	4,3
Suma aminokwasów		91,71	94,9	80,2

Tabela 6

Skład aminokwasowy otrąb pszennych
(zawartość aminokwasów w gramach przy 16 g N)

Lp.	Nazwa aminokwasu	Badania własne	Baumgarten (wg D. Harvey, 9)	Barton i wsp. (wg D. Harvey, 9)
1	Kwas asparaginowy	7,19	—	—
2	Kwas glutaminowy	19,63	—	—
3	Histydyna	2,62	2,7	1,7
4	Arginina	7,08	4,8	7,5
5	Lizyna	4,81	3,2	3,9
6	Glicyna	5,68	—	—
7	Alanina	3,39	—	—
8	Seryna	4,19	5,3	—
9	Treonina	3,30	2,1	2,8
10	Tryptofan	1,40	1,6	1,8
11	Tyrozyna	1,48	1,1	—
12	Cystyna	1,20	—	1,5
13	Metionina	1,02	1,1	1,1
14	Leucyna + izoleucyna	8,11	5,9+4,3	6,5+4,5
15	Walina	2,77	4,8	4,1
16	Fenylalanina	3,14	3,2	2,4
17	Prolina	5,03	—	—
Suma aminokwasów		83,28		

Tabela 7

Zawartość aminokwasów w badanych paszach
(gramów aminokwasu w 100 g paszy)

Lp.	Nazwa aminokwasu	Makuch lniany	Śruta lniana	Śruta rzepakowa	Śruta sojowa	otręby pszenne
1	Kwas asparaginowy	2,31	3,28	3,93	4,20	0,98
2	Kwas glutaminowy	5,25	5,46	6,39	8,95	2,67
3	Histydyna	0,41	0,60	0,55	1,66	0,36
4	Arginina	3,07	2,87	3,23	4,26	0,96
5	Lizyna	1,20	1,47	3,04	3,37	0,65
6	Glicyna	0,87	1,35	1,87	2,29	0,77
7	Alanina	1,32	1,23	1,73	2,11	0,46
8	Seryna	1,20	1,28	1,64	2,59	0,57
9	Treonina	0,93	1,20	1,16	2,26	0,45
10	Tryptofan	0,27	0,32	0,41	0,44	0,19
11	Tyrozyna	0,35	1,10	0,95	1,28	0,20
12	Cystyna	0,59	0,30	0,47	0,45	0,16
13	Metionina	0,32	0,20	0,28	0,42	0,14
14	Leucyna + izoleucyna	2,61	3,14	4,18	4,82	1,10
15	Walina	1,51	1,15	2,08	1,54	0,38
16	Fenylalanina	1,19	1,13	2,03	1,42	0,43
17	Prolina	1,01	1,52	1,13	0,81	0,68

nymi danymi z piśmiennictwa. Różnice te są trudne do interpretacji, wynikać bowiem mogą z faktycznych różnic w składzie aminokwasowym pasz wyprodukowanych w odmiennych warunkach, jak również z zastosowania różnych metod hydrolizy, rozdziału i ilościowego oznaczenia. Stosunkowo duże straty azotu spowodowane hydrolizą zwracają uwagę na potrzebę opracowania właściwszych metod hydrolizy białka pasz.

STRESZCZENIE I WNIOSKI

1. Zastosowano metodę elektroforezy wysokonapięciowej i elektrochromatografii do rozdziału aminokwasów w hydrolizatach makucha lnianego, śruty rzepakowej, śruty lnianej, śruty sojowej i otręb pszennych.

2. Aminokwasy rozdzielano elektroforetycznie na bibule Whatman 3 przy napięciu 28,5 oraz 34,3 V/cm długości paska, a następnie chromatograficznie w rozpuszczalniku n butanol — kwas octowy — woda (4 : 1 : 1) przez 32 godziny.

3. Ilościowe oznaczanie aminokwasów przeprowadzono metodą F i s h e r a.

4. Oznaczono 17 aminokwasów; azot oznaczonych aminokwasów stanowił 76,68—84,18% azotu ogólnego.

5. Metoda elektroforezy wysokonapięciowej i elektrochromatografii okazała się prosta i dokładna w zastosowaniu do rozdzielania i oznaczania aminokwasów w hydrolizatach pasz.

PIŚMIENNICTWO

1. Aleksander P., Block R. J., A laboratory manual of analytical methods of protein chemistry, vol. 2, Oxford, London, New York, Paris (1960).
2. Bier M., Electrophoresis. Theory, methods and applications, New York (1959).
3. Bigwood E. J., Dustin J. P., Czajkowska C., Arch. internat. physiol., 60, 197 (1952).
4. Block R. J., Amino Acid Handbook, Illinois, USA (1956).
5. Conway E. J., Microdiffusion analysis and volumetric error, London (1957).
6. Dunn M. S., Food Tech., 1, 269 (1947).
7. Dustin J. P., Czajkowska C., Moore S., Bigwood E. J., Analyt. chim. acta, 9, 156 (1953 b).
8. Fischer F. G., Dorfel H., Biochem. Z., 324544 (1953).
9. Harvey D., Tables of the amino acids in foods and feedingstuffs., Aberdeen (1956).
10. Masłowski P., Post. biochem. 3/4, 335 (1957).
11. Masłowski P., Chem. analit. 4, 611 (1959).
12. Masłowski P., Roczniki Nauk roln., 81-A-3, 561 (1960).
13. Mierzejewski T., Skulmowski J. Ann. UMCS Sect. DD, VIII, 22, 388 (1953).
14. Nehring K., Schwerdtfeger E., Z. Lebensmitt. Untersuch., 105, 12 (1957).
15. Vögeli H., Ein Beitrag zur papierchromatographischen Aminosäureabestimmung in Holzzuckerhefe., Zürich (1957).
16. Wieland T., Pfleiderer G., Angew. Chem., 67, 257 (1955).
17. Wieland T., Pfleiderer G., Angew. Chem., 69 199 (1957).
18. Wieland T., Pfleiderer G., Retting L., Angew. Chem., 70, 341 (1958).

Т. Жебровска

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА КОРМОВ ПРИ ПОМОЩИ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ВЫСОКОГО НАПРЯЖЕНИЯ

Резюме

Определен аминокислотный состав гидролизатов льняного и рапсового жмыха, а также льняного и рапсового шрота. Аминокислоты разделяли электрофоретически на бумаге Ватман № 3 при напря-

жении тока в 28,5 и 34, 3 V на 1 см длины бумажной полосы, а затем хроматографически с растворителем *n*-бутанол-уксусная кислота-вода (4 : 1 :) в течение 32 часов. Количественное определение аминокислот производилось методом Фишера. Определено 17 аминокислот, азот которых составлял 76,68—84,18% общего содержания азота.

Примененный метод электрофореза и электрохроматографии оказался простым и точным, вполне пригодным для разделения и определения аминокислот в концентрированных кормах.

T. Ż e b r o w s k a

DETERMINATION OF AMINO ACIDS COMPOSITION BY MEANS OF HIGH VOLTAGE ELECTROPHORESIS

S u m m a r y

The high voltage electrophoresis and electrochromatography methods were applied for separating amino acids in linseed cake, rape, linseed, soya bean meals and wheat bran hydrolizates.

Amino acids were separated electrophoretically on Whatman 3 blotting paper in 28.5 and 34.3 V/cm length of belt voltage and then chromatographically in a solvent butanol — acetic acid — water (4 : 1 : 1) during 32 hours. Quantitative determination of amino acids was carried out by Fischer's method. 17 amino acids were determined. Nitrogen of the amino acids determined comprises 76.68—84.18⁰/₀ of the total nitrogen.

The high voltage electrophoresis and electrochronatography methods appeared to be simple and exact in applying for separating and determining amino acids in fodder hydrolizates.