

## Zastosowanie taniny i mocznika do badań nad białkami nasion *Gramineae*

*The application of tannin and urea to investigation of Gramineae seeds proteins*

W. MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN, I. LORENC-KUBIS

W tej pracy zastosowano do ekstrakcji białek z nasion stężone roztwory mocznika zakładając, że będą one dobrym rozpuszczalnikiem dla białek typu prolamin i glutelin. Do ekstrakcji białek funkcjonalnych typu albumin zastosowano wodę. Do oznaczania stężenia białek w wyciągach mocznikowych i wodnych postanowiono zastosować turbidymetryczną mikrometodę taninową. Turbidymetryczna mikrometoda taninowa jest metodą zbliżoną do metod wagowych, gdyż intensywność zmętnienia jakie dają kompleksy białkowo-taninowe powstające w warunkach metody jest proporcjonalna do stężenia białka i nie zależy od składu aminokwasowego, obecności komponenty niebiałkowej, struktury i wielkości cząsteczki białkowej.

Materiał białkowy reagujący z taniną charakteryzowano dodatkowo poprzez oznaczanie zawartości azotu w nierozpuszczalnych kompleksach białkowo-taninowych. Kompleksy białkowo-taninowe łatwo można wydzielić i uwolnić od substancji azotowych niebiałkowych, tak, że oznaczany azot pochodzi wyłącznie od komponenty białkowej kompleksu.

Badania przeprowadzono na nasionach kilku gatunków traw należących do trzech podrodzin. Charakterystykę poszczególnych gatunków oparto na oznaczaniu procentowej zawartości azotu w białkach całkowitych i frakcji albuminowej.

### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na nasionach 7 gatunków traw ze zbioru 1962 i 1963 roku pochodzących z Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin oraz z Wyższej Szkoły Rolniczej we Wrocławiu.

Nasiona przechowywano w higrostatach o zakresie wilgotności powietrza od 45 do 55% nie dłużej niż przez okres 2 lat. Tabela 1 podaje charakterystykę badanego materiału.

Do doświadczeń używano preparatów taniny produkcji Politechniki Śląskiej — Gliwice no. kontrolny 3-TO/60 kontrolowanej na brak azotu.

Ekstrahowanie białek do mocznika i wody. 5 do 10 g nasion mielono w młynku elektrycznym, po czym 1 g zmielonego ziarna ekstrahowano 20 ml 50%

Tabela 1 — Table 1

Wykaz badanych nasion

The list of seeds

Podrodzina Subfamily	Gatunek Species	Kiełkowanie Germination		Zawartość wody Content of water %
		Energia Energy %	Siła Rate %	
<i>Festuceae</i> Kostrzewowate	<i>Festuca pratensis</i> Kostrzewa łąkowa	88,2	96,7	8,63
	<i>Poa pratensis</i> Wiechlina łąkowa	81,5	85,8	7,93
<i>Agrostideae</i> Mietlicowate	<i>Phleum pratense</i> Tymotka łąkowa	94,8	98,0	9,91
	<i>Alopecurus pratensis</i> Wyczyniec łąkowy	82,0	89,7	9,57
<i>Hordeae</i> Jęczmieniwate	<i>Lolium multiflorum</i> Rajgras włoski	96,7	97,3	9,89
	<i>Secale cereale</i> Żyto zwyczajne	95,6	98,2	9,35
	<i>Hordeum sativum</i> Jęczmień	96,1	97,6	9,75

mocznika lub 10 ml wody. Po godzinnym mieszanu na wytrząsarce w temperaturze pokojowej zawieszinę wirowano przy 12 tys. obrot./min. przez 20 minut. Płyn nad osadu zlewano i w tym samym dniu przeprowadzano analizy.

Białko oznaczano turbidymetryczną mikrometodą Mejbaum-Katzenellenbogen (1955) oraz poprzez azot kompleksów białkowo-taninowych metodą Kjeldahla używając jako katalizatora mieszkanki selenowej Chibnall'a (1943). Do oznaczania azotu w kompleksach białkowo-taninowych pobierano po 0,5 ml wyciągu moczniowego. Wyciąg rozcieńczano 50-cio krotnie wodą i następnie białko strącano równą objętością odczynnika taninowego używanego w metodzie ilościowej, wirowano przy 4 tys. obrotów/min. przez 10 minut. Osady białkowo-taninowe przemywano trzykrotnie 50 ml wody, wirowano i przemyty osad wolny od azotu niebiałkowego rozpuszczano w 0,1 N NaOH i oznaczano azot białkowy. Ilość przemyć potrzebnych do całkowitego usunięcia mocznika jak i materiału niebiałkowego ustalono na podstawie oznaczania azotu całkowitego w roztworach żelatyny rozpuszczonej w 50% moczniku. 70 mg żelatyny Grübler wysuszonej do stałej wagi rozpuszczano w 20 ml 50% mocznika, następnie pobierano po 0,5 ml, rozcieńczano 50-krotnie wodą i strącano równą objętością odczynnika taninowego. Osady białkowo-taninowe przemywano oddzielnie 1, 2, 3, i 4-krotnie 50 ml wody, rozpuszczano w 0,1 N NaOH, spalano i oznaczano azot metodą Kjeldahla. Wyniki podano w tabeli 2.

Tabela 2 — Table 2

Zawartość N — białkowego w żelatynie strąconej z roztworu 50% mocznika taniną po 1, 2, 3 i 4-krotnym przemyciu wodą

The N — protein determination in gelatin-tannin complexes precipitated from a 50% urea solution after several washings

No próby No. of sample	Przemycia 50 ml wody Washings with water	Zawartość azotu Content of nitrogen mg	% azotu % of nitrogen
1	1 raz	0,264	18,57
2	2-krotne	0,256	18,28
3	3-krotne	0,253	18,05
4	4-krotne	0,252	18,00

Do oznaczania suchej masy odważano 3 do 5 g zmielonego ziarna i suszono w naczynku wagowym w temperaturze 110—130° w ciągu 5 do 6-ciu godzin. Po 3 godzinach naczynko chłodzono, ważono, po czym ponownie suszono przez 1/2 godziny i ważono. Czynność tę powtarzano kilkakrotnie aż do uzyskania stałej wagi.

## WYNIKI

Ziarniaki przebadanych gatunków traw pochodzące z podrodziny kostrzewowatych (*Festuceae*), mietlicowatych (*Agrostideae*) i jęczmieniowatych (*Hordeae*) należą do nasion niskobiałkowych. Fakt ten został potwierdzony w naszych doświadczeniach, w których ze 100 g nasion ekstrahowano do roztworu mocznika w zależności od gatunku średnio 6,0 do 9,6 g białka oznaczonego mikrometodą taninową, lub 6,3 do 11,5 g metodą Kjeldahla.

Materiał białkowy wyciągów mocznikowych i wodnych oznaczający się turbidymetrycznie charakteryzowano poprzez oznaczenie azotu w nierozpuszczalnych kompleksach białkowo-taninowych. Azot kompleksów białkowo-taninowych stanowi odpowiednik azotu białkowego. Statystyczne opracowanie wyników oznaczania białek obu metodami dla 7 gatunków traw przedstawiono w tabeli 3. Poszczególne gatunki uporządkowano według wzrastającego stężenia białka oznaczonego metodą taninową. Przebadane ziarniaki dzielą się na 4 grupy różniące się statystycznie. Grupę pierwszą charakteryzującą się najniższą zawartością białka 6,04% stanowią nasiona kostrzewy łąkowej, dwie grupy następne reprezentują ziarniaki tymotki łąkowej, rajgrasu włoskiego oraz wiechliny łąkowej. Do grupy czwartej należą ziarniaki wyczyńca łąkowego, jęczmienia browarnego i żyta zwyczajnego odznaczające się najwyższym stężeniem białka (9,3 do 9,6%). W trzeciej

Tabela 3 — Tabele 3

Stężenie białek ekstrahujących się roztworem 50% mocznika u różnych gatunków ziarniaków traw *Gramineae*

The content of urea extractable-proteins in some species of *Gramineae* seeds

Podrodzina Subfamily	Gatunek Species	Metoda taninowa Tannin method % s.m.	Met. Kjeldahla Kjeldahl met.		% zawartość azotu białk. content of protein nitrogen %	Współ- czyn- nik Protein coeffi- cient
			azot nitro- gen % s.m.	N × 6,25 % s.m.		
<i>Festuceae</i> Kostrzewowate	<i>Festuca pratensis</i> Kostrzewa łąkowa	6,04 ± 0,26	1,25	7,81	20,76 ± 0,20	4,81
<i>Agrostideae</i> Mietlicowate	<i>Phleum pratense</i> Tymotka łąkowa	7,20 ± 0,46	1,44	9,01	20,03 ± 0,18	4,99
<i>Hordeae</i> Jęczmieniwate	<i>Lolium multiflorum</i> Rajgras włoski	7,34 ± 0,73	1,26	7,88	17,21 ± 0,16	5,81
<i>Festuceae</i> Kostrzewowate	<i>Poa pratensis</i> Wiechlina łąkowa	8,48 ± 0,32	1,84	11,50	21,78 ± 0,22	4,59
<i>Agrostideae</i> Mietlicowate	<i>Alopecurus pratensis</i> Wyczyniec łąkowy	9,35 ± 0,69	1,55	9,70	16,62 ± 0,15	6,01
<i>Hordeae</i> Jęczmieniwate	<i>Secale cereale</i> Żyto zwyczajne	9,57 ± 0,31	1,01	6,31	10,60 ± 0,23	9,43
<i>Hordeae</i> Jęczmieniwate	<i>Hordeum sativum</i> Jęczmień	9,66 ± 0,55	1,52	9,50	15,81 ± 0,14	6,32

Białko ekstrahowano do 50% roztworu mocznika, rozcieńczano 50-krotnie wodą i strącano odczynnikiem taninowym. Azot w kompleksach białkowo-taninowych oznaczano metodą Kjeldahla. Białko oznaczano metodą taninową.

Protein was extracted with 50% urea solution and after diluting with water precipitated by the tannin reagent. Nitrogen in protein-tannin complexes was determined by the Kjeldahl method. For protein determination the tannin micromethod was used.

Dane w tabeli są średnimi z 10 oddzielnie pobieranych losowych prób nasion.

The mean values were taken of 10 determinations.

s.m. — sucha masa (dry weight)

Grupy statystyczne oddzielono liniami poziomymi.

Statistic groups were separated by means of horizontal lines.

rubryce tabeli podano stężenie białka oznaczonego jako azot kompleksów białkowo-taninowych mnożony przez współczynnik 6,25. Zbliżone wyniki w oznaczaniu białka obu metodami otrzymano tylko dla rajgrasu włoskiego, jęczmienia browarnego i wyczynia łąkowego. W ziarniakach kostrzewy łąkowej, tymotki łąkowej i wiechliny łąkowej metoda Kjeldahla daje istotnie wyższe stężenia białka aniżeli metoda turbidymetryczna. W przypadku ziarniaków żyta zwyczajnego sytuacja jest odwrotna — w metodzie Kjeldahla uzyskuje się wyniki znacznie niższe. Niezgodność wyników uzyskanych w obu metodach znajduje wyjaśnienie w różnej

Tabela 4 — Table 4

Stężenie białka w wyciągach wodnych różnych gatunków ziarniaków traw *Gramineae*  
 Content of water extractable proteins in some species of *Gramineae* seeds

Podrodzina Subfamily	Gatunek Species	Met. taninowa Tannin method % s.m.	Met. Kjeldahla Kjeldahl met.		% zawartość azotu białkowego Content of nitrogen %	Współ- czyn- nik biał- kowy Protein coeffi- cient
			azot % s.m. nitro- gen %	N × 6,25 % s.m.		
<i>Agrostideae</i>	<i>Alopecurus pratensis</i>	0,30 ± 0,04	0,057	0,36	18,90 ± 0,14	5,29
Mietlicowate	Wyczyniec łąkowy					
<i>Festuceae</i>	<i>Poa pratensis</i>	0,31 ± 0,01	0,078	0,49	25,25 ± 0,07	3,96
Kostrzewowate	Wiechlina łąkowa					
<i>Festuceae</i>	<i>Festuca pratensis</i>	0,42 ± 0,02	0,100	0,62	23,70 ± 0,17	4,22
Kostrzewowate	Kostrzewa łąkowa					
<i>Hordeae</i>	<i>Lolium multiflorum</i>	0,65 ± 0,03	0,170	1,06	25,69 ± 0,19	3,72
Jęczmieniowate	Rajgras włoski					
<i>Agrostideae</i>	<i>Phleum pratense</i>	1,12 ± 0,09	0,190	1,21	17,36 ± 0,08	5,75
Mietlicowate	Tymotka łąkowa					
	<i>Secale cereale</i>	1,83 ± 0,09	0,350	2,22	19,37 ± 0,06	5,19
	Żyto zwyczajne					
<i>Hordeae</i>	<i>Hordeum sativum</i>	1,93 ± 0,17	0,220	1,37	11,44 ± 0,08	8,74
Jęczmieniowate	Jęczmień					

Białko ekstrahowano wodą i strącano odczynnikiem taninowym. Oznaczanie białka podano w tabeli 3.

Protein was extracted with water and precipitated with tannin reagent. Determination of protein as described in table 3.

Grupy statystyczne oddzielono liniami poziomymi.

Statistic groups were separated by means of horizontal lines.

s.m. sucha masa  
dry weight

procentowej zawartości azotu w białkach poszczególnych gatunków traw. W kolumnie 4 przedstawiono średnią procentową zawartość azotu w białkach reagujących z taniną. Dane te obliczono na podstawie oznaczonej zawartości azotu w kompleksach białkowo-taninowych i stężeń białka podanych w kolumnie pierwszej. Wysoką zawartością azotu sięgającą aż 21 % charakteryzują się białka ziarniaków kostrzewy łąkowej, tymotki łąkowej i wiechliny łąkowej. Bardzo niski procent azotu jest charakterystyczny dla białek ziarniaków żyta zwyczajnego zawierających zaledwie 10,6%. Białka rajgrasu włoskiego, jęczmienia browarnego i wyczynca łąkowego zawierają odpowiednio 17,2%, 15,8% i 16,6% azotu. Ostatnia rubryka tabeli podaje proponowane współczynniki odpowiednie dla przeliczania azotu na

białko, charakterystyczne dla białek poszczególnych gatunków traw. Współczynniki te wahają w szerokich granicach od 4,59 dla wiechliny łąkowej do 9,43 dla żyta zwyczajnego.

Zachowanie się białek ekstrahujących się do wody określonych jako frakcja albuminowa przedstawiono w tabeli 4. Stężenie albumin różnicuje przebadane gatunki na pięć statystycznych grup. Pierwszą grupę o najmniejszym stężeniu albumin stanowią nasiona wyczyńca łąkowego i wiechliny łąkowej. Do trzech następnych należą ziarniaki kostrzewy łąkowej, tymotki łąkowej i rajgrasu włoskiego. Ostatnią grupę o najwyższej zawartości albumin reprezentują nasiona żyta zwyczajnego i jęczmienia browarnego. Stężenie albumin wzrasta w poszczególnych grupach od 0,3 do 1,9% suchej masy nasion. Analogicznie do poprzednio przedstawionych badań oznaczano azot kompleksów białkowo-taninowych i tym razem nie uzyskano zgodności w oznaczaniu białek obu metodami. U wszystkich gatunków za wyjątkiem jęczmienia browarnego oznacza się wyższe stężenie albumin metodą Kjeldahla aniżeli metodą taninową. Jedynie dla jęczmienia uzyskano wyższe wartości w metodzie taninowej.

Albuminy wszystkich przebadanych gatunków charakteryzują się statystycznie różną zawartością azotu, która waha od 11,4% dla jęczmienia do 25,7% dla rajgrasu. Wysoka zawartość azotu, około 25% charakteryzuje frakcje białek ekstrahowanych wodą z ziarniaków kostrzewy łąkowej, rajgrasu włoskiego i wiechliny łąkowej. Zbliżoną do normy zawartość azotu wykazują albuminy tymotki łąkowej, żyta zwyczajnego i wyczyńca łąkowego. Bardzo niska zawartość azotu jest charakterystyczna dla albumin jęczmienia.

W tabeli 5 porównano zachowanie się białek całkowitych i albumin oraz procentową zawartość azotu obu frakcji. Podrodzina kostrzewowatych charakteryzuje się białkami o wysokiej zawartości azotu oraz niskim stężeniem albumin. Podrodzina mietlicowatych wykazuje duże różnice w zachowaniu się dwu gatunków — wyczyńca łąkowego i tymotki łąkowej. Tymotka zawiera ponad 15% albumin. Frakcja białek ekstrahujących się do mocznika jest bogatsza w azot aniżeli frakcja albuminowa. Najbardziej zróżnicowaną podrodzinę pod względem białkowym stanowią jęczmieniate. Ziarniaki żyta zawierają około 20% frakcji albuminowej bogatej w azot (19,4%). Frakcja białkowa ekstrahująca się mocznikiem zawiera bardzo niski procent azotu, są to przypuszczalnie frakcje glikoproteidowe nierozpuszczalne w wodzie o dużej zawartości komponenty cukrowej. W przypadku ziarniaków jęczmienia, który zawiera około 20% albumin sytuacja jest odmienna, gdyż frakcja albuminowa zawiera zaledwie 11,4% azotu. Niska zawartość azotu świadczy o obecności komponenty cukrowej. Białka nierozpuszczalne w wodzie i rozpuszczalne w moczniku charakteryzują się normalną zawartością azotu.

Rajgras włoski, który w systematyce jest zaliczany do jęczmieniatych w swoim charakterze białkowym zbliża się najbardziej do traw z podrodziny kostrzewowatych gdyż zawiera poniżej 10% albumin. Zawartość azotu w białkach ekstrahujących się do mocznika zbliża go do podrodziny mietlicowatych.

Tabela 5 — Table 5

Charakterystyka składu białkowego nasion poszczególnych gatunków z rodziny *Gramineae*  
 Characteristic of *Gramineae* seed proteins

Podrodzina Subfamily	Gatunek Species	Metoda taninowa Tannin method			Met. Kjeldahla Kjeldahl method	
		Białko całkowite Total protein.	Albuminy Albumin		Białko całkowite Total protein	Albuminy Albumin
				% Białka całkowite % of total protein	% azotu % of nitrogen	% azotu % of nitrogen
		g/100 g s.m.				
Festuceae Kostrzewowate	<i>Festuca pratensis</i>	6,04 ± 0,26	0,42 ± 0,02	6,98	20,76 ± 0,02	23,76 ± 0,17
	Kostrzewa łąkowa					
	<i>Poa pratensis</i> Wiechlina łąkowa	8,48 ± 0,32	0,31 ± 0,07	3,64	21,78 ± 0,22	25,25 ± 0,07
Agrostideae Mietlicowate	<i>Phleum pratense</i>	7,20 ± 0,46	1,12 ± 0,09	15,53	20,03 ± 0,18	17,36 ± 0,08
	Tymotka łąkowa					
	<i>Alopecurus pratensis</i> Wyczyniec łąkowy	9,35 ± 0,69	0,30 ± 0,04	3,20	16,62 ± 0,15	18,92 ± 0,14
Hordeae Jęczmienio- wate	<i>Lolium multiflorum</i>	7,34 ± 0,73	0,65 ± 0,03	8,90	17,21 ± 0,16	25,69 ± 0,19
	Rajgras włoski					
	<i>Secale cereale</i> Żyto zwyczajne	9,57 ± 0,31	1,83 ± 0,09	19,18	10,60 ± 0,23	19,37 ± 0,06
	<i>Hordeum sativum</i> Jęczmień	9,66 ± 0,55	1,92 ± 0,17	19,93	15,81 ± 0,14	11,44 ± 0,08

Białka całkowite ekstrahowano 50 % roztworem mocznika, albuminy — wodą.  
 Total protein was extracted with 50% urea solution and albumin with water.

Białko oznaczono metodą taninową, azot w kompleksach białkowo-taninowych metodą Kjeldahla.  
 Protein was determined by the tannin micromethod and nitrogen in protein-tannin complexes by the Kjeldahl method.

Liniami poziomymi odgraniczono w tabeli grupy systematyczne roślin.  
 Systematic plant groups in this table were separated by horizontal lines.

s.m. — sucha masa (dry weight).

## DYSKUSJA

Duże trudności w badaniu białek nasion wynikają z braku odpowiednich rozpuszczalników ekstrahujących w całości materiał białkowy.

W tej pracy zastosowano do ekstrakcji białek z nasion roztwory 50% mocznika licząc się z możliwością rozpuszczenia wszystkich białek w tym roztworze. Mocznik okazał się dobrym rozpuszczalnikiem do ekstrahowania białek zapasowych charakterystycznych dla rodziny *Gramineae*, a mianowicie glutelin, prolamin oraz białek funkcjonalnych o charakterze albumin i globulin. Wartości uzyskane z oznaczeń białka całkowitego w roztworze mocznikowym pokrywają się z danymi z piśmiennictwa dla białka surowego oznaczonego jako azot całkowity (Dorywalski, Goryński, Rożnowska 1956). I tak dla żyta i jęczmienia oznaczono metodą taninową około 10% białka, w piśmiennictwie podane są wartości od 9,3 do 12,6% dla jęczmienia i od 9,13 do 10,47% dla żyta.

Do strącania białek zarówno zapasowych jak i funkcjonalnych zastosowano odczynnik taninowy (Mejbaum-Katzenellenbogen 1955). Odczynnik taninowy w odróżnieniu od kwasu tróchlorooctowego często używanego do izolowania białek okazał się lepszym gdyż pozwala na strącanie polipeptydów i mukoproteidów oraz w przypadku nasion traw (*Gramineae*), białek typu glutelin, które rozpuszczają się w środowisku kwaśnym. Brak rozpuszczalności kompleksów białkowo-taninowych umożliwia zupełnie uwolnienie osadów od azotu niebiałkowego i mocznika oraz oznaczenie w nich azotu białkowego metodą Kjeldahla i wyznaczenie współczynników białkowych.

Okazało się, że poszczególne gatunki z rodziny *Gramineae* różnią się współczynnikiem białkowym, który dla białek niektórych nasion przyjmuje wartości wyższe lub niższe od 6,25. I tak np. w przypadku białek żyta należałoby stosować współczynnik 9,43, a wiechliny 4,6. Najniższy współczynnik azotowy wykazują białka gatunków z podrodziny kostrzewowatych. Zawierają one białka o wysokiej zawartości azotu, przypuszczalnie argininę i prolinę. Najwyższy współczynnik białkowy w podrodzinie jęczmieniowatych w przypadku żyta wskazuje na złożony charakter tych białek.

We frakcji albuminowej najniższy procent azotu zawierają białka jęczmienia, przypuszczalnie są to białka złożone zawierające komponentę cukrową. Stwierdzono, że w skład frakcji albuminowej jęczmienia wchodzi około 62% białek rozpuszczalnych w 0,15 M kwasie sulfosalicylowym, a więc białek o charakterze polipeptydowym i glikoproteidowym.

Duże zróżnicowanie morfologiczne ziarniaków traw *Gramineae* łączy się z wielką różnorodnością białek tak typu zapasowego jak i funkcjonalnego.



## SUMMARY

The tannin method was used for the determination of seed proteins. The proteins of some seeds of *Gramineae* species were extracted with 50% urea solution and with water respectively. The seeds contained from 6,0 to 10,0 g of urea-extractable protein per 100g of dry weight. The albumin fraction amounted from 3,0 to 20% of this protein. It was found that the water and urea soluble seed proteins are species specific in their nitrogen content.

## LITERATURA

- Chibnall A. C., Rees M. W., Williams E. F., 1943, *Biochem. J.* 37: 354.  
Dorywalski J., Goryński A., Różnowska L., 1956, *Nasionoznawstwo roślin uprawnych* str. 103 i 135 PWRiL Warszawa.  
Krietowicz W., 1955, *Biochemia roślin* str. 376 PWRiL Warszawa.  
McCalla A. G., 1949, *Ann. Rev. Biochem.* 18: 615.  
Mejbaum-Katzenellenbogen W., 1955, *Acta Biochim. Polon.* 2: 279.