

Garbniki i białka w nasionach roślin uprawnych

Tannins and proteins in the seeds of agricultural crops

M. MALICKA, A. WILIMOWSKA, W. MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN

W tej pracy do oznaczania garbników zastosowano kolorymetryczną mikrometodę opracowaną przez Mejbaum-Katzenellenbogen i Kudrewicz-Hubicką (1966). Do oznaczania garbników i polihydroksyfenoli zastosowano odczynnik zawierający alun amonowo-żelazowy, stężony roztwór mocznika i 0,1 M moderator octanowy o pH 4,7. Ważną cechą nowej metody jest jej swoistość, ograniczona do fenoli wielofunkcyjnych. Ponadto odczynnik żelazowo-amonowy pozwala odróżnić pochodne galusowe od katechinowych, ponieważ z pochodnymi galusowymi daje on zabarwienie fioletowe, a z katechinowymi zielone. Autorki wprowadziły do identyfikacji garbników kazeinę, zamiast trudno dostępnego, dotychczas stosowanego proszku skórniego. Ważną cechą nowej metody jest zastosowanie do ekstrakcji garbników stężonego roztworu mocznika. Mocznik powoduje dysocjację nierozpuszczalnych kompleksów białkowo-garbnikowych, umożliwiając równocześnie ekstrakcję garbników i białek z materiału roślinnego.

Celem naszej pracy było scharakteryzowanie nasion niektórych gatunków roślin uprawnych, poprzez oznaczenie zawartości garbników i białek, w wyciągach wodnych i mocznikowych. Założono, że wyciągi mocznikowe powinny stwarzać najkorzystniejsze warunki do badań białek i garbników w materiale roślinnym tak bogatym w białko, jak nasiona większości roślin uprawnych.

MATERIAŁ I METODY

Nasiona przechowywano w magazynie Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin we Wrocławiu, w wilgotności 40–60%, przez okres ośmiu miesięcy od daty zbioru. Tabela 1 podaje zawartość wody i żywotność badanych nasion. Nieodtłuszczone nasiona rozdrabniano w młynku nożowym. Ze sproszkowanego materiału sporządzono wyciągi do wody i 50% roztworu mocznika w stosunku 1 : 25 i 1 : 50. Próby przygodnie mieszano i po godzinnej ekstrakcji w temperaturze pokojowej wirowano, supernatant zlewano. Okrywy nasienne i poszczególne części młodej siewki rozdrabniano przez ucieranie w moździerz, wyciągi z tych części sporządzano podobnie jak z całych nasion.

Tabela 1 — Table 1

Zawartość wody i żywotność nasion
Water content and germination of seeds

Rodzina Family	Gatunek Species	Woda Water %	Kielkowanie Germination %
<i>Papilionaceae</i> Motylkowe	<i>Trifolium repens</i> Koniczyna biała	10,4	84,2
	<i>Phaseolus vulgaris</i> Fasola zwykła varietas:		
	'Saxa'	12,4	96,2
	'Bronowicka'	11,8	95,2
	'Voorluk'	12,0	50,3
	'Księżniczka Holenderska'	12,8	97,2
<i>Cruciferae</i> Krzyżowe	<i>Crambe abyssinica</i> Katrzan	6,3	82,0
	<i>Brassica napus</i> Rzepak	6,3	97,2
<i>Polygonaceae</i> Rdestowate	<i>Polygonum fagopyrum</i> Gryka Puławska	13,2	99,0
<i>Cannabinaceae</i> Konopiowate	<i>Cannabis sativa</i> Konopie siewne	8,4	73,2
<i>Solanaceae</i> Psiankowate	<i>Lycopersicum esculentum</i> Pomidor uprawny	9,6	89,7
<i>Liliaceae</i> Liliowate	<i>Allium porrum</i> Por	11,3	90,2

Polihydroksyfenole i garbniki oznaczano kolorymetrycznie odczynnikami żelazowo-amonowym wg Mejbaum-Katzenellenbogen i Kudrewicz-Hubickiej (1966). Garbniki strącano kazeiną w pH 4,7.

Białka oznaczano turbidymetryczną mikrometodą taninową wg Mejbaum-Katzenellenbogen (1955). Wyciągi rozcieńczano 0,9% NaCl lub 0,1 N NaOH, tak aby stężenie mocznika w próbce nie przekraczało 1%, a zawartość białka 100 µg/ml.

Świeżo sporządzone wyciągi wodne lub mocznikowe poddawano elektroforezie na bibule Schleicher-Schüll 2043a, w 0,1 M moderatorze octanowym o pH 4,7. Elektroforogramy wywoływano przez spryskiwanie odczynnikami żelazowo-amonowym, używanym w oznaczeniach ilościowych. Za wzorce służyły: pentadwulogloglukoza (tanina chińska), oczyszczana wg Armitage (1961) z preparatów handlowych w pH 6,8, pirokatechina i pirogallol, oczyszczane przez sublimację oraz kwas galusowy cz.d.a. Wzorce przechowywane były w eksykatorze nad H₂SO₄.

WYNIKI

Nasiona przedstawicieli kilku rodzin systematycznych, a mianowicie: motylkowych, rdestowatych, krzyżowych, liliowatych, konopiowatych i psiankowatych przebadano na zawartość białka i garbników, w wyciągach wodnych i mocznikowych. Wyniki zebrano w tabeli 2.

We wszystkich przypadkach do wody ekstrahowano mniej białek i polihydroksyfenoli niż do mocznika. Są to przypuszczalnie polihydroksyfenole pozbawione własności garbujących, lub garbniki, które nie tworzą z daną frakcją białkową nierozpuszczalnych kompleksów białkowo-garbnikowych. Wyciągi mocznikowe zawierają całość materiału białkowego. Białka ekstrahujące się do wody odpowiadają frakcji albuminowej. Zależnie od ilości białka całkowitego możemy podzielić przebadane rośliny na trzy grupy: nisko, średnio i wysokobiałkową. W grupie niskobiałkowej znalazły się nasiona koniczyny białej oraz gryki 'Puławskiej'. Tuszczowe nasiona karanu, rzepaku, konopi, nasiona pomidora i trzech odmian fasoli należą do nasion bogatych w białko. Nasiona pora i fasoli odmiany 'Księżniczka Holenderska', okazały się materiałem średniobiałkowym.

Innym kryterium odróżniającym przebadane nasiona od siebie jest zawartość albumin. Nasiona z rodziny motylkowych cechuje wysoki poziom albumin. Frakcja albuminowa stanowi tu około 40–60% białek. Rzepak i pomidor mają nasiona o średniej zawartości albumin. W nasionach pozostałych przebadanych gatunków frakcja albuminowa stanowi stosunkowo mały procent.

Garbników nie oznaczono, nawet po odtłuszczeniu i zwiększaniu naważki, w nasionach roślin oleistych: karanu i rzepaku z rodziny krzyżowych oraz konopi z konopiowatych. Do grupy tej należą również nasiona pomidora i dwóch odmian fasoli — 'Voorluk' i 'Księżniczki Holenderskiej'. Odmiany garbnikowe fasoli mają okrywy nasienne barwne, odmiany bezgarbnikowe mają okrywy białe.

W grupie nasion garbnikowych znalazły się nasiona koniczyny białej i fasoli — odmiany 'Saxa' i 'Bronowicka' z rodziny motylkowych oraz nasiona gryki z rodziny rdestowatych. Por zawiera śladowe ilości garbników. Z nasion, u których stwierdzono garbniki, wodą ekstrahuje się przeciętnie 55–65% materiału ekstrahującego się mocznikiem. Na pierwszym miejscu w tabeli 2 znalazły się nasiona koniczyny białej zawierające 1,85% materiału oznaczającego się odczynnikami żelazowo-amonowym. Kazeina dodana do wyciągów wodnych z nasion koniczyny w stosunku 1 : 5 (garbnik : kazeiny), wytrąca 90% materiału oznaczającego się odczynnikami żelazowo-amonowym.

W celu określenia rozmieszczenia garbników w nasieniu, wykonano badania na obu odmianach garbnikowych fasoli. Wykazano, że zarodek zawiera w liścieniach śladowe ilości garbników. Całość materiału oznaczającego się odczynnikami żelazowo-amonowym zlokalizowana jest w okrywie nasiennej. Są to garbniki katechinowe i galusowe gdyż z odczynnikami żelazowo-amonowym dają barwę mieszaną niebiesko-zieloną. Z danych przedstawionych w tabeli 3 wynika, że okrywy obu odmian nie różnią się zawartością garbników i białek ekstrahujących się do mocznika i wody. Mocznik ekstrahuje 3,7g garbników ze 100g okryw. Ekstrakcja wodą daje

Tabela 2 — Table 2

Białka i polihydroksyfenole w nasionach roślin uprawnych
 Proteins and polyhydroxyphenols in the seeds of agricultural plants

Gatunek Species	Białka ekstrahujące się do: Proteins extracted with:			Polihydroksyfenole ekstrahujące się do: Polyhydroxyphenols extracted with:		
	mocznika urea	wody water	%	mocznika urea	wody water	%
	suchej masy of dry weight g/100 g			suchej masy of dry weight g/100 g		
<i>Trifolium repens</i>	9,65 ± 1,12	6,35 ± 0,92	65,8	1,85 ± 0,02	1,17 ± 0,09	63,2
<i>Polygonum fagopyrum</i>	9,15 ± 0,53	3,8 ± 0,35	41,5	0,4 ± 0,02	0,25 ± 0,01	62,5
<i>Phaseolus vulgaris</i> var. 'Bronowicka'	20,2 ± 1,55	8,9 ± 0,83	44,0	0,28 ± 0,04	0,18 ± 0,07	64,3
<i>Phaseolus vulgaris</i> var. 'Saxa'	22,4 ± 0,98	10,6 ± 0,56	47,3	0,29 ± 0,04	0,16 ± 0,02	56,2
<i>Phaseolus vulgaris</i> var. 'Voorluk'	20,2 ± 0,7	9,3 ± 0,82	46,0	0	0	—
<i>Phaseolus vulgaris</i> var. 'Księżniczka Holenderska'	17,6 ± 0,64	8,03 ± 1,09	45,7	0	0	—
<i>Allium porrum</i>	16,7 ± 1,27	2,9 ± 0,23	17,4	0,02	0	—
<i>Crambe abyssinica</i>	20,9 ± 3,3	2,7 ± 0,2	12,9	0	0	—
<i>Brassica napus</i>	20,2 ± 2,12	6,5 ± 0,65	32,2	0	0	—
<i>Lycopersicum esculentum</i>	23,7 ± 2,64	8,2 ± 0,33	35,0	0	0	—
<i>Cannabis sativa</i>	25,2 ± 0,83	3,5 ± 0,33	13,9	0	0	—

Podane wyniki są średnią z dziesięciu oznaczeń

The mean values of ten determinations were taken

50% ilości ekstrahującej się do mocznika. W okrywach stężenia białek i garbników są prawie równe, podczas gdy w całym nasieniu garbniki stanowią 1,3% w stosunku do białka. Frakcja albuminowa stanowi w okrywach fasoli odmiany Saxa 14,6%, w okrywach odmiany 'Bronowickiej' 18% białka całkowitego. W całych nasionach frakcje te stanowiły odpowiednio 53 i 44% białka całkowitego.

Rys. 1. Elektroforeza bibułowa garbników okryw nasiennych fasoli

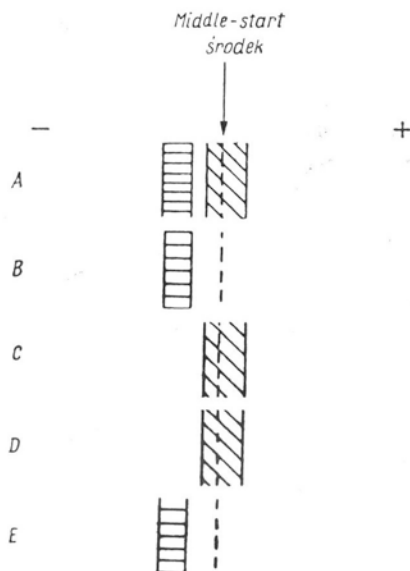
Paper electrophoresis of tannins from the seed coats of beans

A — wyciąg, *B* — supernatant po wytrąceniu garbników kazeiną, *C* — osad kazeinowo-garbnikowy po rozpuszczeniu w moczniku, *D* — tanina chińska, *E* — pirokatechina

Elektroforezę przeprowadzono na bibule Schleicher — Schüll 2043a, w 0,1 M moderatorze octanowym o pH 4,7, przy napięciu 200V, w czasie 4 godzin. Elektroforogramy wywoływano odczynnikiem żelazowo-amonowym

A — extract, *B* — supernatant after precipitation of the tannins by caseine, *C* — caseine-tannins precipitate dissolved in urea, *D* — chinese tannin, *E* — pyrocatechin.

Electrophoresis was carried out on Schleicher-Schüll paper 2043a, in 0,1 M acetate buffer pH 4,7. Potential gradient 200V, 4 hours. The strips were stained with the ferric-ammonium reagent.



Ekstrakty wodne i mocznikowe z okryw nasiennych fasoli poddawano elektroforezie bibułowej w moderatorze octanowym o pH 4,7 przed i po wytrąceniu garbników kazeiną. Okrywy nasienne obu odmian wykazują obecność dwóch frakcji: frakcji o ruchliwości pentadwugaloiloglukozy, która stanowi 60% i frakcji o ruchli-

Tabela 3 — Table 3

Białka i garbniki okryw nasiennych garbnikowych odmian fasoli

Proteins and tannins in the seed coats of tannin cotaining beans

Odmiana Variety	Białka ekstrahujące się do: Proteins extracted with:			Polihydroksyfenole ekstrahujące się do: Polyhydroxyphenols extracted with:		
	mocznika urea	wody water	%	mocznika urea	wody water	%
	świeżej masy air dry weight g/100 g			świeżej masy air dry weight g/100 g		
'Saxa'	4,1	0,6	14,6	3,7	1,96	53
'Bronowicka'	4,7	0,85	18,0	3,7	1,5	42

wości pirokatechiny stanowiącej 40% — poddanego elektroforezie materiału (rysunek 1). Już przy pięciokrotnym nadmiarze kazeiny w stosunku do garbników, wytrąca się całkowicie z wyciągów wodnych frakcja o ruchliwości taniny chińskiej. W miarę zwiększania ilości kazeiny wytrąca się również frakcja o ruchliwości pirokatechiny.

W następnym etapie pracy badano zachowanie się fenoli wielofunkcyjnych w czasie kiełkowania nasion odmiany garbnikowej i bergarnikowej fasoli. Stwierdzono, że zawartość garbników w okrywach nasiennych odmiany Saxa nie ulega wyraźnym zmianom w czasie kiełkowania nasion. Wykazano natomiast, że substancje oznaczające się odczynnikami żelazowo-amonowym pojawiają się w czasie kiełkowania zarówno u bezgarbnikowych odmian fasoli (księżniczka Holenderska), jak i u garbnikowych (Saxa). Są to związki o charakterze katechin, gdyż zabarwienie, z odczynnikami żelazowo-amonowym jest zielone. Najwięcej polihydroksyfenoli gdyż około 0,1% świeżej masy zawierają listki młodej siewki. Korzonki i łodyga siewki nie zawierają polihydroksyfenoli, nie zjawiają się one również w okrywie nasiennej nasion kiełkujących odmiany bezgarbnikowej.

DYSKUSJA

W tej pracy zerwano z tradycyjną metodą, jaką jest ekstrakcja garbników acetonem i zastosowano roztwory mocznika. Ekstrakcja mocznikiem przebiega szybko i z bardzo dobrą wydajnością. Ma ona specjalne znaczenie analityczne, gdyż pozwala uzyskać materiał nadający się do mikroanalitycznych oznaczeń garbników, nawet w obecności białek. Roztwory mocznika w odróżnieniu od acetonu stanowią ponadto bardzo dobry rozpuszczalnik dla białek słabo rozpuszczalnych w wodzie i solach.

Dla lepszej charakterystyki badanych nasion zastosowano do ekstrakcji białek i garbników zarówno roztwory mocznika jak i wodę. Przekonano się, że nasiona różnią się między sobą zawartością białek całkowitych, albumin i garbników, zależnie od jednostki systematycznej lub grupy użytkowej, którą reprezentują. Wspólną cechą dla nasion roślin oleistych jest brak garbników, duże stężenie białek i mała procentowo zawartość albumin. Rodzina roślin motylkowych, za wyjątkiem odmian fasoli z bezbarwnymi okrywkami, posiada nasiona garbnikowe, o niższej zawartości białka w porównaniu do poprzedniej grupy. Białka nasion rodziny motylkowych charakteryzują się najwyższą zawartością albumin, które stanowią 40—60% białek całkowitych.

Garbniki w nasionach, jak to wykazano w przypadku nasion fasoli zlokalizowane są w okrywach nasiennych. Nierenstein (1934) podaje, że garbniki okryw nasiennych są uważane za wydzielnicze, gdyż nie biorą udziału w metabolizmie i towarzyszą pigmentom. Pomimo, że wykryto garbniki tylko w okrywkach fasoli o kolorowych łupinach, uważamy ten pogląd za dyskusyjny, gdyż stężenie garbników w okrywie nasiennej dorównuje stężeniu białka. Mejbaum-Katzenellenbogen (1959), twierdzi, że garbniki tworzą z białkami trwałe, nieodwracalne połączenia,

tylko wtedy, gdy występują w stosunku do białka w dużym nadmiarze, jak to ma miejsce np. w korze drzew. Białko wysyczone garbnikiem ulega nieodwracalnym zmianom i traci swoje własności biologiczne. Natomiast w przypadku, gdy stężenie garbnika jest równe lub mniejsze od ilości białka, jak to ma miejsce w nasionach, garbniki tworzą z białkiem odwracalne, nierozpuszczalne kompleksy, które łatwo dysocjują wraz ze zmianą pH środowiska. Białka w kompleksach tego typu z taniną zachowują własności biologiczne i fizykochemiczne.

Można więc przypuszczać, że garbniki pełnią określone funkcje w nasieniu, a ich rola jest uzasadniona biologicznie. Rola ta może polegać na ochronie białek biologicznie czynnych, przed szkodliwymi czynnikami otoczenia. Znane własności antyseptyczne garbników potwierdza fakt, że nasiona garbnikowych odmian fasoli nie wykazały nawet śladu zaatakowania przez szkodnika, oraz zachowały dobrą żywotność, nawet po długim okresie przechowywania w magazynie. W tym samym czasie nasiona odmian bergabnikowych fasoli zostały zaatakowane przez stronkowca *Bruhus obtectus* i straciły żywotność.

Nierenstein (1934) podaje, że wg. Sachsa garbniki w nasionach pojawiają się w czasie kiełkowania. W naszej pracy potwierdzono obserwacje Sachsa. Garbniki istotnie pojawiają się w czasie kiełkowania nasion fasoli, zarówno u odmiany garbnikowej jak i bezgarbnikowej. Najwięcej garbników zawierają pierwsze listki młodej siewki. Są to wyłącznie garbniki katechinowe, które z odczynnikiem żelazowo-amonowym dają zabarwienie zielone. W czasie kiełkowania ulegają zniszczeniu wraz z okrywą nasienną garbniki okryw, pojawiają się natomiast garbniki w poszczególnych częściach młodej siewki. Być może obecność odpowiedniej ilości garbników w okrywie nasiennej jest równoznaczna ze zdolnością nasion do kiełkowania, czyli ich dojrzałością.

Serdecznie dziękujemy Pani mgr Janinie Schneider i współpracownikom Zakładu Biologii i Przechowalnictwa Nasion, za udostępnienie nam materiału oraz wykonanie analiz zawartości wody i żywotności nasion.

Katedra Biochemii

Uniwersytet Wrocławski

Kierownik Katedry

Prof. dr Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen

SUMMARY

In this paper new colorimetric micromethod for determination of tannin was applied. This method is very useful for the estimation of even small amounts of tannin in a presence of protein.

The protein and tannin content in seeds of various agricultural crops was studied. Water and urea were used for the extraction of tannin and protein from plant material.

It has been shown that the protein and tannin content in the examined plants depends on their respective position in the systematic groups. Tannins in the seeds of beans were found to be present in their coats. It was found that tannins appeared during the germination period, in all of the investigated bean seeds.

Tannins from the seed coats of beans were isolated and identified by means of paper electrophoresis.

LITERATURA

- Armitage R., Bayliss G. S., Gramshaw J. W., Haslam E., Haworth R. D., Jones K., Rogers H. J. and Searle T., 1961, J. Chem. Soc. 1842.
- Mejbaum-Katzenellenbogen W., 1955, Acta Biochim. Polon. 2: 279.
- Mejbaum-Katzenellenbogen W., 1959, Acta Biochim. Polon. 6:385.
- Mejbaum-Katzenellenbogen W., Kudrewicz-Hubicka Z., 1966, Acta Biochim. Polon. 13: 57.
- Nierenstein M., 1934, The natural organic tannins, London.