Zmiany nisko- i wysokocząsteczkowych związków azotowych w dojrzewających ziarnach kukurydzy wyrosłej z nasion o pełnej i niepełnej dojrzałości

*Changes in low- and high-molecular-weight nitrogen compounds in ripening
maize grains of plants grown from seeds fully and not fully ripe*

P. MASŁOWSKI, H. MASŁOWSKA, J. NOWAK

WSTĘP

W pracy poprzedniej donieśliśmy, że skład ilościowy aminokwasów α i β -zeiny ziarn kukurydzy o dojrzałości mlecznej, po 12 miesięcznym przechowywaniu, różni się znacznie od składu aminokwasowego tychże frakcji białkowych ziarn o dojrzałości pełnej (Masłowski, Smoczyńska, Masłowska 1968). Zmiany te dotyczyły głównie tioaminokwasów, aminokwasów kwaśnych i proliny, tj. tych związków, które wg Yemmy i Folkesa (1958) oraz Pawłowa (1962) są niezbędne do syntezy białek rozwijającego się zarodka. Można by więc przypuszczać, że zmiany te będą rzutować na metabolizm azotowy roślin wyrosłych z nasion o niepełnej dojrzałości, szczególnie że szereg autorów zaobserwowało wyraźny wpływ na morfologię i fizjologię tych roślin (Crocker, Barton 1955; Kuzminczew, Kuleszow 1955).

Dlatego też wydawało się celowe przeprowadzenie badań nad przemianami różnych form azotu niebiałkowego i białkowego oraz związanym z nim genetycznie i funkcjonalnie kwasem rybonukleinowym w dojrzewających ziarnach kukurydzy, wyrosłej z ziarn o pełnej i niepełnej dojrzałości.

MATERIAŁ I METODY

1. *Materiał.* Do badań użyto ziarn kukurydzy odmiany 'Wigor' zebranych w roku 1965 w fazie dojrzałości mlecznej i pełnej. Po 12-miesięcznym przechowywaniu w temp. 20°C ziarna były wysiane i pobierane do analiz w czterech różnych fazach dojrzałości.

- a) początek formowania bielma — 19 dni po zapyleniu
- b) dojrzałość mleczna — 27 „ „

c) dojrzałość woskowa	— 63 dni po zapyleniu
d) dojrzałość pełna	— 75 „ „

2. *Przygotowanie materiału do analiz.* Dojrzewanie ziarna w kolbie przebiegało nierównomiernie, dlatego też w celu uniknięcia błędów pobierano do badań ziarna z jednej trzeciej dolnej części kolby kukurydzy, w różnych fazach dojrzałości. Pobrany materiał liofilizowano i dodatkowo dosuszano drogą ekstrakcji bezwodnym acetonem. W ten sposób pozabawiano się dodatkowo większości tłuszczów, które utrudniają ekstrakcję wodną. Tak przygotowany materiał jest stosunkowo trwały i może być przechowywany nad KOH w eksykatorze z ciemnego szkła w ciągu 4—6 miesięcy.

3. *Otrzymywanie i hydroliza zeiny.* 50 g odtłuszczonej mąki zadawano 4-krotną objętością 70% etanolu i mieszano 2 godziny. Proces ekstrakcji przeprowadzano dwukrotnie. Roztwór wirowano. Supernatant zagęszczano na wyparce próżniowej w temperaturze 50°C do 1/3 objętości, przenoszono do worka celofanowego i dializowano 48 godzin wobec 70% etanolu oraz 24 godz. wobec wody podwójnie destylowanej. Uzyskany osad przeemywano trzykrotnie eterem i acetonem, następnie suszono do stałej wagi nad H₂SO₄ w eksykatorze próżniowym, pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze pokojowej. Próbkę przechowywano w ciemnych zaparafinowanych słoikach w temp. 4°C.

4. *Metody analityczne.* Azot ogólny oznaczano metodą Kjeldahla w skali półmikro (Belcher, Goobert 1945). Ekstrakcje i frakcjonowanie azotu ogólnego przeprowadzano zmodyfikowaną przez nas metodą Schneidera, Earli i Türka (1952) opisaną w pracy poprzedniej (Masłowski i wsp. 1968).

Azot α -aminowy oznaczano metodą Yemma i Cockinga (1955) w ten sposób, że do probówek z zawartością 1 ml badanego roztworu zawierającego 0,1—1 mg azotu aminowego wprowadzano 0,5 ml 0,2 M buforu cytrynianowego o pH 5 oraz 0,2 ml 5% roztworu ninhydryny w eterze metyloglikolowym i 1 ml 0,01 M roztworu KCN w eterze metyloglikolowym. Po dokładnym wymieszaniu ogrzewano probówki, przez 15 min. na wrzącej łaźni wodnej, chłodzono bieżącą wodą i po dodaniu 10 ml 60% etanolu barwny roztwór przenoszono do 1 cm kuwety i mierzono ekstynkcję przy $\lambda = 570$ m μ na spektrokolorymetrze „Specol”.

Zawartość azotu α -aminowego odczytywano z uprzednio sporządzonej krzywej wzorcowej.

W ten sam sposób oznaczano azot peptydowy, po uprzedniej hydrolizie alkoholowego ekstraktu 6 N HCl w zatopionej probówce w temp. 100°C przez 12 godzin. Azot peptydowy obliczano z różnicy azotu aminowego przed i po hydrolizie.

Azot amidowy określano metodą Racke (1957). W tym celu próbkę zawierającą 2—5 mg azotu amidowego rozpuszczano w 10 ml 6 N HCl

i hydrolizowano 60 min. pod chłodnicą zwrotną na łaźni wodnej o temp. 95°C. Następnie całość próbki przenoszono ilościowo do aparatu Kjeldahla i amoniak destylowano z parą wodną przez 15 min. do 25 ml 40% roztworu kwasu borowego.

Aminokwasy kwaśne i zasadowe hydrolizatów zeiny rozdzielano metodą elektroforezy bibułowej, na bibule Whatmana nr 3 w buforze pirydynowym o pH 6,5, przy spadku potencjałów 50 V/cm, w ciągu 60 minut (Masłowski 1960).

Aminokwasy obojętne rozwijano początkowo elektroforetycznie na bibule Whatmana nr 1, w buforze octanowo-mrówczanowym o pH 2, przy zastosowaniu różnicy potencjałów 80 V/cm w czasie 60 min., a następnie chromatograficznie, prostopadle do rozdzielu elektroforetycznego, w układzie: n-butanol — kwas octowy — woda (4 : 1 : 1) (Masłowski 1959). Po wysuszeniu elektroforegramów i elektrochromatogramów, plamy aminokwasów wywoływano w roztworze o składzie: 100 mg octanu kadmu, 10 ml H₂O i 5 ml kwasu octowego lodowatego, 100 ml acetonu i 1 g ninhydryny (Bieleski i Turner 1966). Wywołane elektroforegramy suszono w suszarce w temp. 80°C przez 15 min., a następnie 10 godzin w termostacie w temp. 40°C nad H₂SO₄ i NaOH.

W celu oznaczania ilościowego, plamki wywołanych aminokwasów wycinano wraz z bibułą, cięto na drobne pasemka i ekstrahowano barwnik 2 ml roztworu o składzie: metanol + octan etylu + woda — 1 : 1 : 1 — zawierającym 1% kwasu octowego i 1% octanu kadmu. Gęstość optyczną mierzono po 20 min. w 1 cm kuwetach przy $\lambda = 495 \text{ m}\mu$ na spektrokolorymetrze „Specol”. Ilość poszczególnych aminokwasów odczytywano z uprzednio sporządzonych krzywych standardowych. Analizę przeprowadzano w trzech seriach doświadczeń w 10 powtórzeniach.

Kwas rybonukleinowy oznaczano zmodyfikowaną metodą Ogura i Rosena (1950). 200 mg mąki kukurydzianej homogenizowano w szklanym homogenizatorze z 5 ml 80% etanolu w temp. 70°C. Roztwór odwirowywano, proces ekstrakcji etanolem powtarzano 3-krotnie. Pozostałość po odwirowaniu przemywano 10 ml 96% etanolu, następnie dwukrotnie 10 ml mieszaniny alkoholu — eter w stos. 3 : 1 w temperaturze wrzenia, wrzącym eterem i wreszcie trzykrotnie 0,2 N HClO₄ o temp. 0°C. W oczyszczonym osadzie hydrolizowano RNA 1 N kwasem nadchlorowym w temp. 4°C przez 20 godzin. Hydrolizat kwasu rybonukleinowego wirowano, osad przemywano 3-krotnie 1 N kwasem nadchlorowym, ciecz po odwirowaniu i przemyciu przenoszono do kolbki miarowej na 25 ml. Przy tego rodzaju postępowaniu hydrolizaty RNA były prawie całkowicie pozbawione produktów degradacji białek, co zostało sprawdzone na podstawie max. i min. absorpcji UV i metodą Lowry'ego (1951). Umożliwiło to ilościowe oznaczenie RNA spektrofotometrycznie przy zastosowaniu jednej długości fali (260 m μ) i odczytaniu zawartości kwasu rybonukleinowego z krzywej standardowej sporządzonej z RNA drożdży.

WYNIKI

Wyniki badań przedstawione na wykresach (ryc. 1 i 2) obrazują zmiany różnych form azotu w dojrzewającym ziarnie kukurydzy wyrosłej z nasion o pełnej i niepełnej (mlecznej) dojrzałości.

Jak z powyższych danych wynika, w miarę dojrzewania ziarna ilość azotu ogólnego, amidowego, aminowego i peptydowego, wyraźnie maleje. Azot aminowy i peptydowy przy tym przejawiają najintensywniejszy spadek do fazy dojrzałości mlecznej, do początkowego okresu intensywnej

Ryc. 1. Zmiany azotu ogólnego, białkowego, rozpuszczalnego, aminowego i nierozpuszczalnego w dojrzewającym ziarnie kukurydzy wyrosłej z nasion o różnej dojrzałości

1 — N-ogólny; 2 — N-białkowy; 3 — N-rozpuszczalny; 4 — N-aminowy; 5 — N-nierozpuszczalny
Change of the Total-N, Protein-N, Soluble-N, Amino-N, in maturing maize grain growing out from seeds at full and milk ripenes

1 — Total-N; 2 — Protein-N; 3 — Soluble-N; 4 — Amino-N; 5 — Nonsoluble-N

syntezy białek zapasowych (zeiny i glutelin). Prawie proporcjonalnie do spadku ilości azotu ogólnego, rośnie zawartość azotu białkowego i nierozpuszczalnego. W tym pierwszym, zdecydowanie przeważają w początkowym okresie rozwoju ziarna albuminy i globuliny, w miarę dojrzewania ilość ich jednak maleje, wzrasta natomiast intensywnie synteza zeiny i glutelin.

Kwas rybonukleinowy osiąga najwyższy poziom w okresie formowania bielma, następnie maleje, przy czym spadek ten jest najszybszy do dojrzałości woskowej (tabela 1 i 2). Również stosunek RNA/białko zmniejsza

Ryc. 2. Zmiany azotu albuminowego, glutelinowego, globulinowego, zeinowego, peptydowego i amidowego w dojrzewającym ziarnie kukurydzy wyrosłej z nasion o różnej dojrzałości

1 — N-albuminowy; 2 — N-globulinowy; 3 — N-glutelinowy; 4 — N-zeinowy; 5 — N-peptydowy; 6 — N-amidowy

Change of the Albumin-N, Glutelin-N, Globulin-N, Zein-N, Peptide-N and Amide-N in maturing maize grain growing out from seeds of full and milk ripeness

1 — Albumin-N; 2 — Globulin-N; 3 — Glutelin-N; 4 — Zein-N; 5 — Peptide-N; 6 — Amide-N

Tabela 1 — Table 1

Zawartość RNA w dojrzewającym ziarnie kukurydzy wyrosłej z nasion o pełnej i niepełnej dojrzałości wyrażona w mg b.s.m. 100 ziarn (a) oraz z g/100 g s.m. (b)

RNA content in maturing maize grain growing out from seeds at full — and milk ripeness expressed in mg of abs. d.m. of 100 grains (a) and g/100 g of d.m. (b)

Ziarna wyrosłe z nasion: Maize grains growing out from seeds:	Pocz. form. bielma increase of endosperm	Dojrzałość — Ripeness		
		mleczna milk	woskowa wax	pełna full
a.				
z niepełnej dojrzałości from milk ripeness	5,57	23,30	53,76	48,5
z pełnej dojrzałości from full ripeness	3,25	14,90	51,20	43,8
b.				
z niepełnej dojrzałości from milk ripeness	0,4219	0,3779	0,2238	0,2092
z pełnej dojrzałości from full ripeness	0,4058	0,3066	0,2167	0,2039

Tabela 2 — Table 2

Stosunek RNA/białko w dojrzewającym ziarnie kukurydzy wyrosłej z nasion o pełnej i niepełnej dojrzałości

RNA/protein ratio in maturing maize grain growing out from seeds at full and milk ripeness

RNA/białko RNA/protein	pocz. form. bielma increase of ripeness	Dojrzałość — Ripeness		
		mleczna milk	woskowa wax	pełna full
z niepełnej dojrzałości from milk ripeness	0,348	0,238	0,139	0,120
z pełnej dojrzałości from full ripeness	0,380	0,257	0,146	0,136

szą się w miarę dojrzewania, co wskazywałoby na niezależność gromadzenia się białka w ziarnie od stężenia RNA. Analizując jednak wyniki badań, przedstawione na ryc. 3, można by przypuszczać, że w okresie rozwoju ziarna związana z kwasem rybonukleinowym jest jedynie synteza białek typu albumin i globulin, natomiast przyrost ilości białek zapasowych (zeiny i glutelin) jest od niego niezależny.

Porównując przemiany różnych form azotu w ziarnach wyrosłych

Ryc. 3. Zależności między zmianami RNA a albuminami i globulinami oraz glutelinami i zeiną w dojrzewających ziarnach kukurydzy wyrosłej z nasion o różnej dojrzałości

Relationship between change of albumin and globulin, glutelin and zein in maturing maize grain growing out from seeds at full and milk ripeness

1 — RNA; 2 — Alb. + Glob.; 3 — Glut + Zein

z nasion o pełnej i niepełnej dojrzałości stwierdza się pewne różnice ilościowe, na korzyść tych drugich. Jak wykazują wykresy (ryc. 1 i 2) przewaga azotu ogólnego u ziarn wyrosłych z nasion o niepełnej dojrzałości kształtuje się w granicach od 9% w początkowym etapie formowania bielma do 4,5% w dojrzałości pełnej. Zawartość azotu nierozpuszczal-

Tabela 3 — Table 3

Procentowy udział frakcji białkowych w N-białkowym dojrzewającego ziarna kukurydzy wyrosłej z nasion o pełnej i niepełnej dojrzałości

Protein % of fractions in Protein-N of maturing maize grain growing out from seeds at full and milk ripeness

Fazy dojrzałości Ripeness of grain	Albuminy Albumin		Globuliny Globulin		Gluteliny Glutelin		Zeina Zein	
	n	p	n	p	n	p	n	p
Pocz. f. bielma Increase of endosperm	28,6	31,1	47,9	47,2	20,1	18,5	3,4	3,2
Mleczna Milk	21,7	23,7	29,9	31,2	31,7	32,1	16,7	13,0
Woskowa Wax	9,9	9,2	11,2	11,4	32,9	33,7	46,0	45,7
Pełna Full	8,7	9,3	9,7	11,0	29,4	30,4	52,2	49,0

n — % białka w ziarnie wyrosłym z nasion o dojrzałości niepełnej.

n — Protein % in a grain growing out from seeds at milk ripeness.

p — % białka w ziarnie wyrosłym z nasion o dojrzałości pełnej.

p — Protein % in a grain growing out from seeds at full ripeness.

nego odpowiednio od 3,2 do 1,2⁰%, azotu amidowego, aminowego i peptydowego od 7 do 1,2⁰% oraz azotu białkowego od 15 do 13⁰%. W odniesieniu do suchej masy przewaga azotu albuminowego wynosi od 3 do 7⁰%, azotu globulinowego od 14—2,5⁰%, glutelinowego 26—13⁰%, oraz azotu zeinowego od 25—23⁰%. W przypadku RNA różnice te wahają się w granicach od 4⁰% na początku formowania bielma do 2⁰% w okresie dojrzałości pełnej.

Jak z powyższego wynika, stopień dojrzałości ziarna użytego do siewu rzutuje nie tylko na fizjologię i morfologię, lecz i na metabolizm niektórych form azotu roślin wyrosłych z tych nasion. Dane te jednak nie upoważniają do wyciągnięcia wniosku, że wynikiem tych zmian może być odmienna zawartość aminokwasów w α i β zeinie ziarn o dojrzałości mlecznej, użytych do siewu po 12 miesięcznym przechowywaniu, jak sugerowaliśmy na wstępie (Masłowski i inni 1968). Szczególnie, że już w drugim pokoleniu, jak wykazują wyniki zestawione w tabeli 4, skład aminokwasów zeiny ziarn wyrosłych z nasion o pełnej i mlecznej dojrzałości nie wykazuje większych różnic ilościowych.

Rozpatrując uzyskane wyniki z punktu widzenia przydatności do praktyki, można by przypuszczać, że byłoby wskazane używać do siewu ziarn nie w pełni dojrzałych.

Analizując jednak procentowy udział poszczególnych frakcji białkowych w azocie białkowym (tabela 3) widzimy, że wzrost azotu białkowego

Tabela 4 — Table 4

Skład aminokwasowy zeiny ziarn kukurydzy wyrosłej z nasion o pełnej i niepełnej dojrzałości

Amino acids of maize grains growing out from seeds at full — and at milk ripeness

Aminokwasy Amino acid	Ziarna kukurydzy wyrosłej z nasion The maize grains growing out from seeds			
	o pełnej dojrzałości at full ripeness		o niepełnej dojrzałości at milk ripeness	
	a	b	a	b
Gli	1,47	24,1	1,53	25,0
Ala	9,71	136,2	9,62	135,0
Wal	4,11	43,8	3,77	40,2
Leu + Ile	23,59	223,6	23,32	220,9
Ser	5,43	64,7	5,38	64,0
Tre	2,93	30,2	2,81	29,0
Tyr	5,06	34,1	5,19	35,0
Fen	6,72	51,2	5,56	50,0
Pro	9,41	102,0	9,59	104,0
Met	1,51	12,5	1,82	15,0
Cyst	0,79	9,0	0,88	10,0
Hist	1,29	10,0	1,27	9,9
Arg	1,58	11,2	1,48	10,5
Asp	5,17	48,8	5,08	48,0
Glu	24,03	204,0	24,26	206,0
	102,80		102,36	

a. Ilość aminokwasów wyrażona w gramach na 16 g N frakcji.

Amino acids in g/16 g of fraction-N.

b. Ilość aminokwasów wyrażona w molach na 1000 ogólnie znalezionych moli.

Amino acids in moles/1000 generally founding moles.

jest głównie wynikiem zwiększonej zawartości zeiny — białka o niepełnej wartości biologicznej — na niekorzyść bardziej wartościowych frakcji (albumin i globulin), co z żywieniowego punktu widzenia nie jest zjawiskiem pożądanym.

STRESZCZENIE

W dojrzewających ziarnach kukurydzy wyrosłej z nasion o pełnej i niepełnej dojrzałości (mlecznej) badano zmiany różnych form azotu niebiałkowego (amidowy, α -aminowy i peptydowy) oraz białkowego (albuminowy, globulinowy, glutelinowy i zeinowy), jak też zmiany RNA oraz skład aminokwasowy zeiny.

Nie stwierdzono różnic jakościowych. Natomiast wyraźne różnice występowały w składzie ilościowym na korzyść ziarn wyrosłych z nasion o niepełnej dojrzałości. Przewaga ta w przypadku azotu ogólnego kształtowała się w granicach od 9% w początkowym etapie formowania bielma do 4,5% w dojrzałości pełnej, w przypadku azotu amidowego, α -aminowego i peptydowego odpowiednio od 7—1,2%, białkowego

od 15—13%, albuminowego 3—7%, globulinowego od 14—2,5%, glutelinowego od 26—13%, zeinowego od 25—23% a RNA od 4 do 2%.

Nie stwierdzono natomiast różnicy w składzie ilościowym aminokwasów zeiny ziarn wyrosłych z nasion o pełnej i niepełnej dojrzałości.

*Katedra Biochemii Żywności
Wyższej Szkoły Rolniczej
w Olsztynie*

(Wpłynęło dn. 8.3.1969 r.)

SUMMARY

In ripening grains of maize grown from fully and not fully ripe (milk ripe) seeds, changes in the content of various nonproteinic nitrogen compounds were investigated: α -amine, amide, peptide, and protein nitrogen: albumin, globulin, glutelin and zein. Changes in RNA and the amino acid composition of zein were also investigated. No qualitative changes were found. As regards quantity, the differences were distinctly in favour of the grains originating from seeds not fully ripe. This superiority in reference to total nitrogen varied in the limits of 9 percent in the initial stage of endosperm formation to 4.5 percent at full maturity; in reference to amide, α -amine and peptide nitrogen the respective values were 7—12 percent, for protein nitrogen 15—13 percent, albumin 3—7 percent, globulin 14—2.5 percent, glutelin 26—13 percent, zein 25—23 percent and for RNA nitrogen 4—25 percent.

No differences were found in the quantitative composition of the amino acids of zein in the grains from plants originating from fully and not fully mature seeds.

*Department of Food Biochemistry,
College of Agriculture, Olsztyn*

LITERATURA

- Belcher R., Goobert A. L., 1945, *Semimicro Quantitative Analysis*, London.
Bieleski R. L., Turner A. A., 1966, *Anal. Biochem.* 17: 278.
Crocker W., Barton L., 1955, *Physiology of seeds*.
Kuzminczew W., Kuleszow N., 1955, *Ziemliediele* 7: 36.
Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., 1951, *J. Biol. Chem.* 193: 265.
Masłowski P., 1959, *Chem. Anal.* 4: 611.
Masłowski P., 1960, *Roczn. Nauk Roln.* 81 A — 3: 562.
Masłowski P., Smoczyńska K., Masłowska H., 1968, *Acta Soc. Bot. Poloniae* 37 (3): 493.
Ogur M., Rosen G., 1950, *Arch. Biochem.* 25: 262.
Pawłow A. N., 1962, *DAN SSSR* 143: 235.
Raacke J. D., 1957, *Biochem. J.* 66: 103.
Schneider P., Earli E., Türk E., 1952, *Journ. Agr.* 44: 4.
Yemm E. W., Cocking A. C., 1955, *Analyst* 80: 109.
Yemm E. W., Folkes B. F., 1958, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 9: 245.