

METODY OZNACZANIA BIAŁEK WŁAŚCIWYCH W MATERIALE ROŚLINNYM

Edmund Nowacki, Andrzej Anioł, Wiesław Prus-Głowacki

• Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa, Puławy

WSTĘP

Analiza laboratoryjna jest ostatnim, lecz nie mniej ważnym etapem doświadczenia. Wraz ze wzrostem mechanizacji w polu wzrasta ilość prowadzonych doświadczeń, powinna również wzrosnąć porównywalność wyników między powtórzeniami.

Hodowla roślin prowadzona w kierunku poprawy jakości produktu wymaga przesunięcia analiz w procesie tworzenia odmiany. Zamiast analizować rody prawie gotowe do przekazania praktyce, należy wykonywać tysiące analiz na wczesnych etapach procesu hodowlanego jak np. F₂ krzyżówki. Tylko w ten bowiem sposób można wykryć interesujące segreganty, formy o zmienionym białku, np. kukurydza z genem opaque 2. Badania należy przeprowadzać więc na bardzo małym materiale — 1/10 plonu pojedynczej rośliny.

Zarówno doświadczenia nawożeniowe, jak i prace hodowlane, stawiają przed pracownikami fitochemicznymi nowe trudne zadanie. Aby temu podołać proces analizy musi być w miarę zmechanizowany, jak również musi dać wyniki dobrze charakteryzujące dany materiał roślinny.

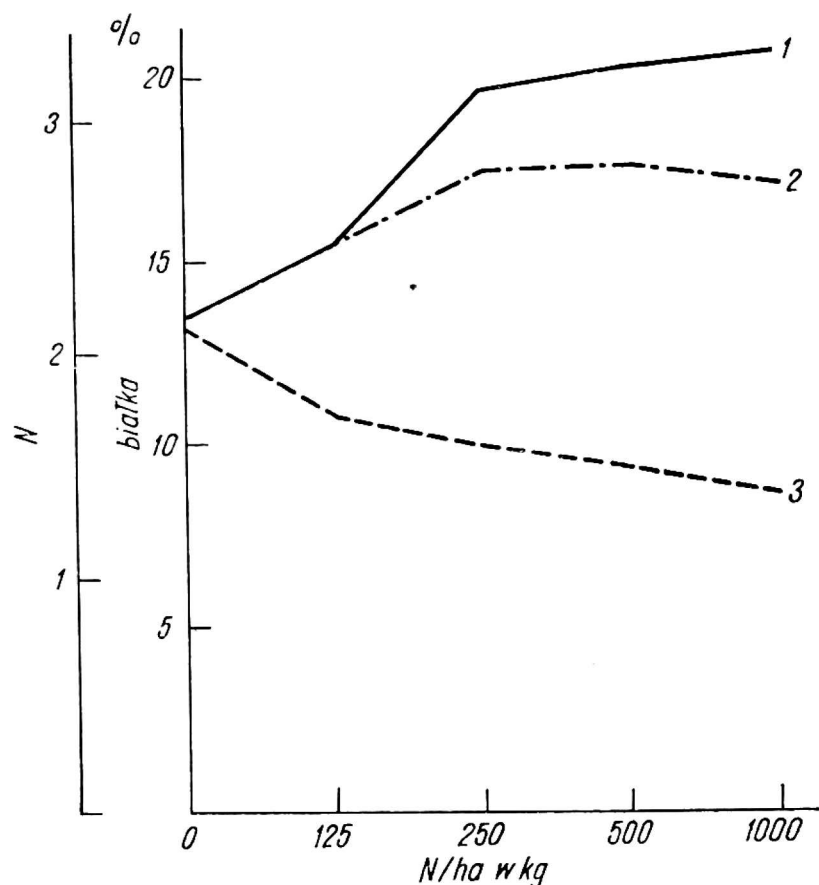
I. KRYTYCZNA OCENA DOTYCHCZASOWYCH METOD

Powszechnie dotychczas stosowana w rolnictwie metoda oznaczania białka wg Kjeldahla liczy już ok. 100 lat. Metoda ta oparta na analizie amoniaku, powstałego w wyniku mokrego spalania organicznych połączeń azotowych, nie daje nam rzeczywistego wyniku, lecz dane, które tylko w określonych warunkach odpowiadają mniej więcej zawartości białka w badanym materiale (rys. 1).

Jeżeli przegląda się literaturę przedmiotu za okres do 1950 r. to wyniki są w miarę porównywalne, po tym terminie dane są coraz wyższe. Głównym czynnikiem, który się zmienił, to poziom nawożenia azotowego. Wyniki dla roślin znanych z niskiej zawartości białka w suchej masie zaczęły gwałtownie rosnać, i tak średnio dla kupkówki wahały się ok. 7,5%, życicy 8, innych traw podobnie przeciętnie poniżej 10%. Po 1950 r. anali-

zy tychże samych odmian i gatunków zaczęły wykazywać 10 do 15% białka, a w skrajnych wypadkach do 30% (tab. 1).

Dodatkowym czynnikiem wprowadzającym zamieszanie było nie uwzględnianie przez hodowców właśnie nawożenia azotowego, co prowadziło do olbrzymiej zmienności wyników (rys. 2).



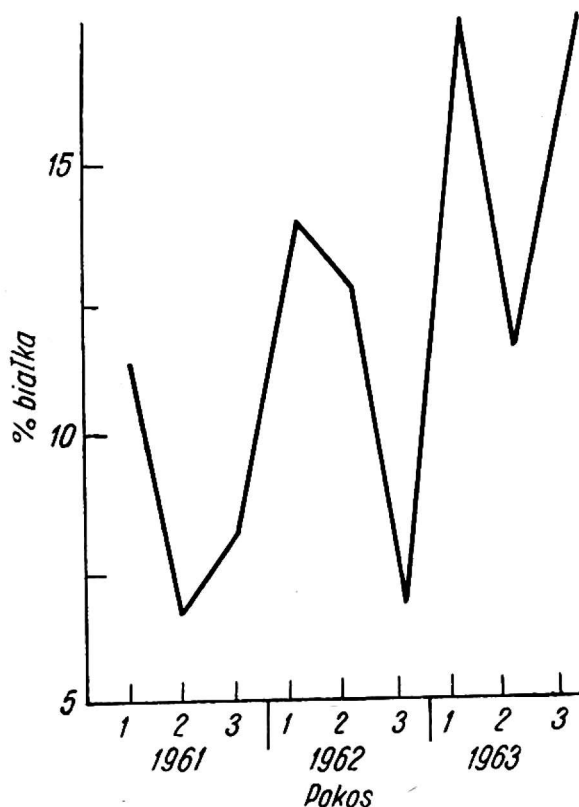
Rys. 1. Zmiany frakcji azotowych surowego białka pod wpływem nawożenia azotowego: 1 — białko, 2 — amoniak, 3 — wolne aminokwasy

Tabela 1

Rozbieżności w oznaczeniu białka metodą Kjeldahla w %

Gatunki i odmiany	Laboratorium I (pokos I)	Laboratorium II (pokos I)
Inkarnatka	16,0	15,0
Koniczyna czerwona	20,1	21,6
Koniczyna szwedzka	15,9	16,9
Wyczyniec łąkowy	16,7	22,5
Stokłosa bezostna	7,4	12,4
Owsiak wyniosły	6,6	16,9
Tymotka — Brudzyńska	4,7	10,2
Kupkówka — Grębałowska	7,4	19,2
Kostrzewa łąkowa	7,1	17,9
Życica włoska	7,4	12,1
Rzepak	9,3	27,1

Oczywiste było, że białko tak nie może się zmieniać, zmianie może ulegać zawartość wolnych aminokwasów, wśród których ok. 90% to substancje bez istotnego znaczenia w żywieniu, jak np. betaalanina, kwas



Rys. 2. Zmiany zawartości białka w kupkowiec w ciągu trzech lat wegetacji, wg 8 (w doświadczeniu nie uwzględniono nawożenia azotowego)

γ -aminomasłowy, asparagina i kilkadziesiąt innych wolnych aminokwasów niebiałkowych. Niektóre z nich są w dodatku antymetabolitami, często silnie toksycznymi dla zwierząt [3, 4, 5].

Dalszymi związkami azotowymi, występującymi w roślinie to alkaloidy, związki cyjanogenne, a wreszcie jony amonowe. Oczywiście jest, że wliczanie tych wszystkich substancji do białka jest niczym nie usprawiedliwione.

Celem zorientowania się w przyczynach dużej rozbieżności wyników między różnymi laboratoriami, wysłano do sześciu pracowni próbki nie zawierające ani śladu białka, lecz wyłącznie nieprzyswajalne dla zwierząt substancje: kwas hippurowy, kwas moczowy, rozcieńczoną skrobię. Pięć pracowni przysłało wyniki oznaczeń metodą Kjeldahla i przeliczone na białko (tab. 2). Rezultaty wskazują, że analizy były wykonane poprawnie i otrzymany wynik dla „białka” jest prawdziwy mimo, że białka w pro-

Tabela 2

Wynik analiz na zawartość azotu w próbkach mieszaniny kwasu moczowego, skrobi i kwasu hippurowego rozesłanych do 6 laboratoriów

Laboratorium	Nr próby					
	I (2%)	II (0,1%)	III (10%)	IV (10%)	V (2%)	VI (0,1%)
I	2,10	0,12	10,30	10,40	2,08	0,08
II	2,01	0,10	10,10	10,08	2,01	0,09
III	2,05	0,11	10,02	10,08	2,03	0,11
IV	1,98	0,09	9,85	9,98	1,95	0,10
V	1,98	0,10	10,01	9,97	2,01	0,09

bówce nie było, gdyż metoda Kjeldahla jest metodą oznaczania azotu, a nie białka i jakkolwiek przyjęlibyśmy współczynnik przeliczeniowy, wynik zawsze będzie najwyżej przybliżony. Przy zmieniającym się poziomie nawożenia przyjęcie stałego współczynnika jest zupełnie nie usprawiedliwione.

Próby rozwiązania tego problemu były różnorodne. Jedną z nich miało być oznaczanie zawartości egzogennych aminokwasów. Jak wykazały badania Duckwortha, rozbieżność w analizach dochodzi do 200% (tab. 3).

Tabela 3

Różnice w oznaczaniu zawartości aminokwasów w próbkach białek rozesłanych do analizy w różnych laboratoriach (mg aminokwasu/100 mg N)*

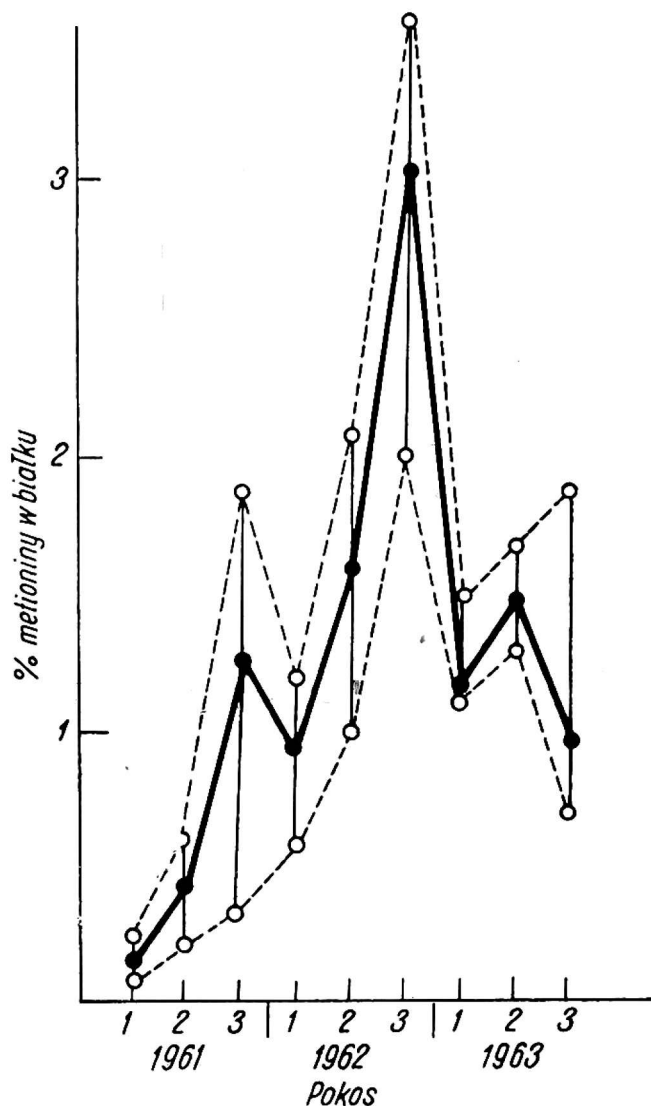
Aminokwasy	Liczba laboratoriów wykonujących oznaczenia	Mąka z orzeszków ziemnych		Gluten pszeniczny	
		wynik najniższy	wynik najwyższy	wynik najniższy	wynik najwyższy
Cystyna	5	5,2	20,6	10,5	16,6
Metionina	12	2,6	6,6	8,3	12,5
Lizyna	10	15,4	30,6	9,2	21,1
Arginina	10	53,2	83,1	19,3	25,3
Kwas asparginowy	3	70,4	89,1	21,2	24,3
Histydyna	10	12,2	17,3	10,5	14,0
Izoleucyna	10	21,3	31,2	24,1	37,0
Leucyna	10	35,0	43,1	34,0	47,2
Fenylalanina	11	21,8	34,2	28,7	35,7
Treonina	10	14,6	18,7	15,8	19,4
Tryptofan	11	3,8	9,2	2,3	8,2
Tyrozyna	5	14,1	25,8	11,1	20,4
Walina	10	22,8	30,2	22,2	29,1

* Wg J. Duckworth — *Methods of Determining the Nutritive Value of Protéins.*

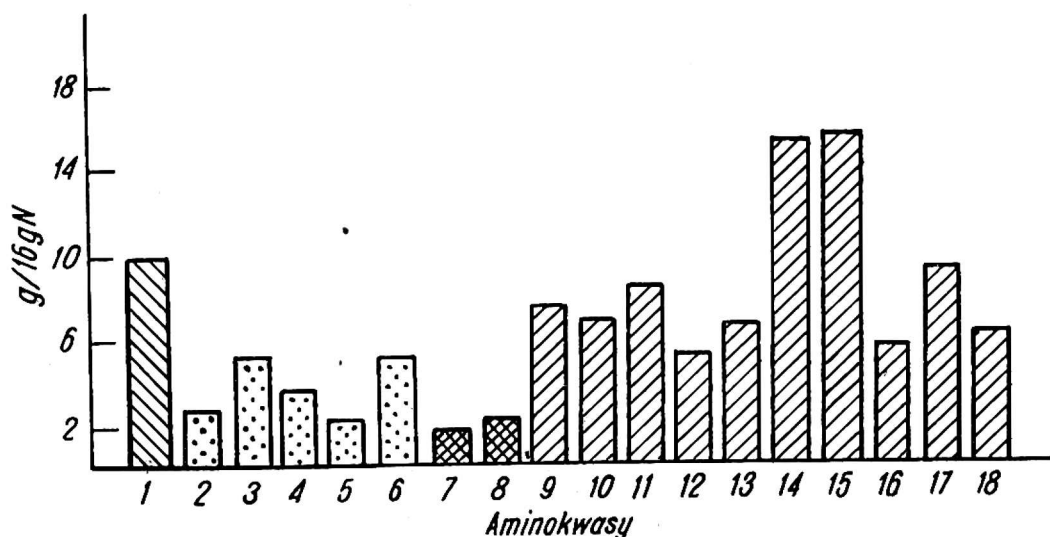
Aby wyrobić sobie pewne pojęcie o wartości białka w danej paszy, należałoby zanalizować przynajmniej 10 aminokwasów. Przy bardzo dużej pracochłonności tego typu analiz i olbrzymiej zmienności wyników rozwiązanie to nie może wchodzić w rachubę (rys. 3).

Opierając się na znanym fakcie, że białka części wegetatywnych wszystkich roślin mają zbliżony skład aminokwasowy, opracowano adaptację metod umożliwiających analizę właściwego białka, wolną od błędów charakteryzujących metodę Kjeldahla. Są to w kolejności: kolometryczna metoda oznaczania białka ogólnego wg Lowry'ego oraz immunokolorymetryczna metoda oznaczania określonego białka nawet w obecności innych białek. Ponieważ jednak oznaczenie białka jest niewystarczającym kryterium jakości, opracowano mikrobiologiczną metodę oceny wartości biologicznej. Zestaw tych metod pozwala w sposób niezawodny ocenić wartość paszy.

Rys. 3. Zmiany zawartości egzogenego aminokwasu metioniny w trzy-letnim doświadczeniu, wg 8 (duże różnice spowodowane są prawdopodobnie błędem laboratoryjnym)



Dla białek nasion opracowano metodę frakcjonowanej analizy, otrzymując w kolejnych ekstraktach: albuminy, globuliny, gliadyny i pozostałe. Dla białek tych przyjęto średnie współczynniki wartości żywieniowej i w ten sposób na podstawie czterech prostych analiz można wyrobić sobie pewne pojęcie o jakości białka w badanym materiale (rys. 4).



Rys. 4. Typowy skład aminokwasowy białek części wegetarywnych: 1 — arginina, 2 — histydyna, 3 — lizyna, 4 — tyrozyna, 5 — tryptofan, 6 — feonina, 7 — cystyna, 8 — metionina, 9 — seryna, 10 — treonina, 11 — leucyna, 12 — izoleucyna, 13 — walina, 14 — glutamina, 15 — asparagina, 16 — glicyna, 17 — alanina, 18 — prolina

II. METODY

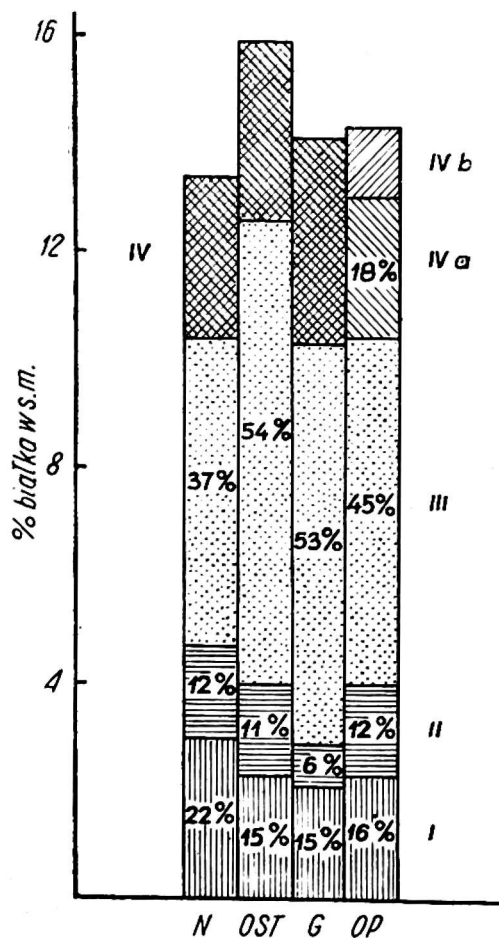
ZASTOSOWANIE METODY LOWRY'EGO DO OZNACZANIA ZAWARTOŚCI BIAŁKA
W POSZCZEGÓLNYCH FRAKCJACH

Metoda polega na oznaczaniu zawartości białka w poszczególnych frakcjach ekstrakcyjnych, odpowiadających z grubsza głównym typom białek występujących w ziarnie zbóż. I tak ekstrakt wodny zawiera albuminy, solny (NaCl) globuliny oraz zasadowo-alkoholowe — gliadyny i gluteniny.

Wyniki oznaczanego białka w powyższych frakcjach odniesiono do ogólnej zawartości azotu oznaczanego metodą Kjeldahla dla danej próbki, dają pewien obraz jakości białka w badanym materiale.

Metoda

Naważkę 200 mg drobno zmielonej śruty rozciera się z piaskiem kwarcowym w młynku, po czym przenosi ilościowo do probówek wirówkowych na 25 ml. Naważkę zalewa się 10 ml acetonu, wytrząsa przez 2 godziny, następnie wiruje przez 10—15 minut przy 2500—3000 obr./min. Po odwirowaniu zlewa się supernatant i odrzuca. Z frakcją acetonową eliminuje się barwniki, tłuszcze, wolne aminokwasy itp. Osad w probówkach zalewa się z kolei 10 ml wodą destylowaną, powtarzając powyższą procedurę z tym, że supernatant zlewa się do probówek i analizuje metodą Lowry'ego na zawartość białka. Wynik z tej frakcji reprezentuje zawartość albumin. Następnie zalewa się osad 2% roztworem NaCl, wytrząsa, wiruje — frakcja globulinowa.



Rys. 5. Zawartość poszczególnych frakcji białkowych w białku czterech odmian pszenicy jarej: N — Nagradowicka, OST — Ostka Popularna, G — Gorzowska Sztynwna, OP — Opolska; I — albuminy (ekstrakt wodny), II — globuliny (ekstrakt solny), III — gliadyny (ekstrakt alkoholowo-zasadowy), IVa — gluteniny (ekstrakt zasadowy), IV i IVb — reszta poekstrakcyjna (w wypadku N, OST i G w skład reszty poekstrakcyjnej wchodzi gluteniny, w Opolskiej wyodrębniono frakcję glutelinową)

Ostatnią frakcję otrzymuje się, ekstrahując mieszaniną 0,3% NaOH i 66% metanolu w stosunku 1 : 2 — gliadyny i gluten. Pozostałość analizuje się metodą Kjeldahla na zawartość azotu.

Interpretacja wyników

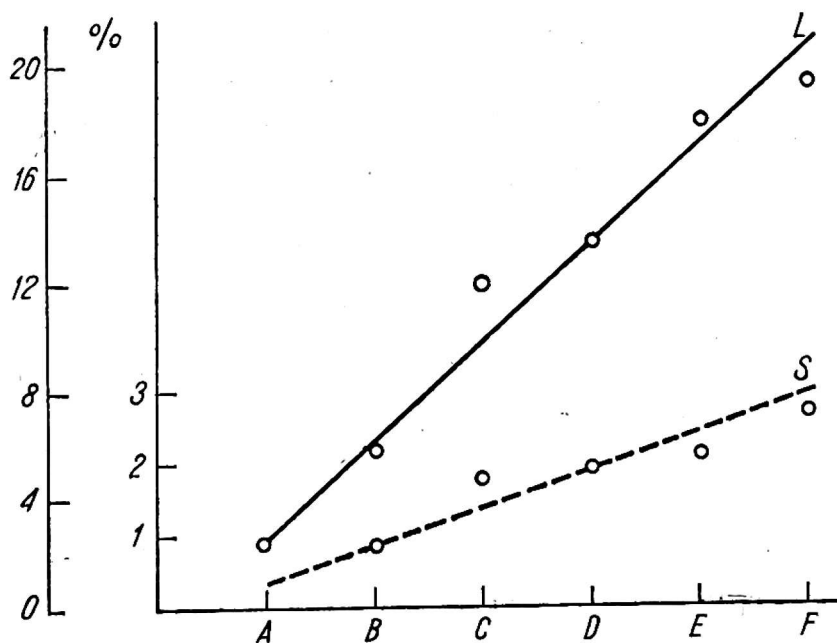
Ilość białka zawartą w poszczególnych frakcjach oblicza się na podstawie ekstynkcji na kolorymetrze odniesionych do krzywych wzorcowych. Krzywe wzorcowe sporządza się dla różnych białek, zależnie od badanej frakcji i tak, zawartość białka we frakcji wodnej (albuminy) oblicza się na podstawie krzywej, wykreślonej dla albuminy bydłowej, we frakcji solnej na podstawie krzywej dla kazeiny oraz dla frakcji zasadowo-alkoholowej na podstawie krzywej dla żelatyny.

Na podstawie obliczonych wyników można stwierdzić, że albumina bydłowa i kazeina są trafnie dobranymi standardami dla odpowiednich frakcji, natomiast wyniki otrzymane na podstawie krzywej dla żelatyny są zawyżone, co wskazuje na wyższą zawartość aromatycznych aminokwasów w zasadowo-alkoholowej frakcji białek zbóż niż w żelatynie.

Porównując zawartość azotu w próbach przed ekstrakcją i po jej zakończeniu okazuje się, że wydajność tej ekstrakcji waha się w granicach 70—80%.

METODA IMMUNOPRECYPITACYJNA OZNACZANIA BIAŁKA WŁAŚCIWEGO W EKSTRAKTACH Z MĄCZKI NASION LUB PROSZKÓW ACETONOWYCH

Metoda opiera się na zasadzie wiązania specyficznych przeciwciał z antygenem *in vitro* w punkcie ekwiwalentu. Reakcja precypitacyjna zachodzi w dwóch etapach, z których pierwszy polega na swoistym wiązaniu antygeny i przeciwciała i przebiega bez wyraźnie widocznych zmian. Siły



Rys. 6. Zawartość białka w procentach naważki w ekstrakcie solankowym (0,9% NaCl) mieszaniny śruty żytniej i proszku acetonowego zielonki rzodkwi oznaczana metodą Lowry'ego (L) oraz metodą precypitacji serologicznej z surowicą anti-żyto (S) (zawartość śruty żytniej w mieszaninie wzrasta od 0 (A) do 3 g (F), zawartość proszku acetonowego rzodkwi stała — 1 g)

Tabela 4

Skład aminokwasowy białek jęczmienia
g aminokwasów w 100 g białka

Aminokwas	Białko					
	Albumina	Globulina	Gliadyna	Gluteina	Leaf protein	Indeks FAO
Lizyna	7,9	6,3	0,7	4,8	6,5	4,2
Metionina	1,4	0,9	0,9	1,1	1,3	2,2
Cysteina	1,5	2,6	1,7	0,9	0,9	2,0
Suma siarkowych	2,9	3,5	2,6	2,0	2,2	4,2
Fenylalanina	3,0	2,1	3,1	2,7	3,2	2,8
Tyrozyna	2,5	1,4	1,4	1,9	2,2	2,8
Tryptofan	1,3	0,6	0,5	1,1	1,8	1,9
Suma aromatyczn.	6,8	4,1	5,0	5,7	7,2	7,5
Walina	5,8	4,1	1,8	4,9	5,0	4,2
Leucyna	5,7	4,5	4,6	5,8	5,8	4,8
Izoleucyna	4,1	2,2	3,6	3,5	4,7	4,2
Treonina	3,4	2,4	1,4	3,1	4,0	2,8
Amidy	5,9	5,1	25,4	10,3	4,8	
Aminokwas limitujący	Metionina 64%	Metionina 41%	Lizyna 16,7%	Siańkowe 47,6%	Siańkowe 45%	

tu działające są prawdopodobnie złożone i wchodzą tutaj w rachubę siły van der Waalsa, elektrostatyczne przyciąganie się cząsteczek, wiązania wodorowe oraz czynniki związane z kształtem i wymiarem drobin.

Etap drugi jest zjawiskiem fizykochemicznym i polega na łączeniu się kompleksów powstałych w pierwszym etapie w agregaty, w wyniku czego następuje wypadanie agregatów z roztworu. Ponieważ zjawiskiem tym rządzą prawa ilościowe, można ilość precypitatu powstałego w następstwie specyficznej reakcji immunologicznej odnieść do zmian ilościowych i jakościowych we frakcjach białkowych materiału roślinnego (rys. 6).

Metoda

Do probówek wirówkowych o pojemności 10 ml dajemy po 0,1—0,3 ml roztworu antygeny o wyrównanym stężeniu białka i odpowiednią ilość surowicy odpornościowej, a także po 1 ml 0,9% roztworu NaCl. Mieszaninę pozostawiamy w temperaturze pokojowej przez 2 godziny po czym przenosimy ją do lodówki o temperaturze ok. 4°C i pozostawiamy przez kilkanaście godzin (przez noc). Uzyskany osad wirujemy na wirówce laboratoryjnej przy 2500—4000 obr./min. w ciągu 5 minut. Supernatant ostrożnie odlewamy, a osad przepłukujemy dwukrotnie 0,9% roztworem NaCl, za każdym razem precypitat osadzając jak wyżej. Po ostatnim płukaniu precypitat analizujemy na zawartość białka metodą Lowry'ego.

Interpretacja wyników

Jak powiedziano powyżej, reakcja immunoprecypitacji jest reakcją specyficzną, tak więc w serii analiz reakcja ekstraktu z materiału, na który uzyskana była surowica, winna być brana jako wzorzec. Wszelkie odchylenia ilości białka otrzymanego w wyniku pomiaru metodą Lowry'ego mogą być interpretowane dwojako. Wyniki wyższe od wzorcowych świadczą o zmianie ilościowej (wyższa zawartość białka właściwego) dane niższe o zmianie ilościowej lub jakościowej, względnie obu jednocześnie. Zmiany te traktować można w sposób podany powyżej tylko przy założeniu, że stężenie antygeny w każdym przypadku jest równe.

PRYMITYWNA METODA OZNACZANIA WARTOŚCI BIOLOGICZNEJ PASZY

Analiza włókniaka i białka surowego nie daje stanu faktycznego wartości paszy. Wartość paszy dla zwierząt przeżuwających najlepiej oznaczać metodą biologiczną *in vitro*. Ponieważ jednak do tego potrzebna jest dość skomplikowana aparatura oraz specjalnie zoperowane zwierzęta, zastosowanie tej metody w chwili obecnej w szerokiej praktyce jest niemożliwe. W celu otrzymania orientacyjnych danych opracowano prostą, biologiczną metodę wyceny jakości.

Metoda

Wartość paszy oznacza się na podstawie przyrostu suchej masy grzybni *Aspergillus niger* szczep P 68, rozwijającego się na hydrolizie z nawózki paszy. Wynik analizy porównujemy z wynikiem analizy kontrolnej o znanej wartości odżywczej.

Kontrola

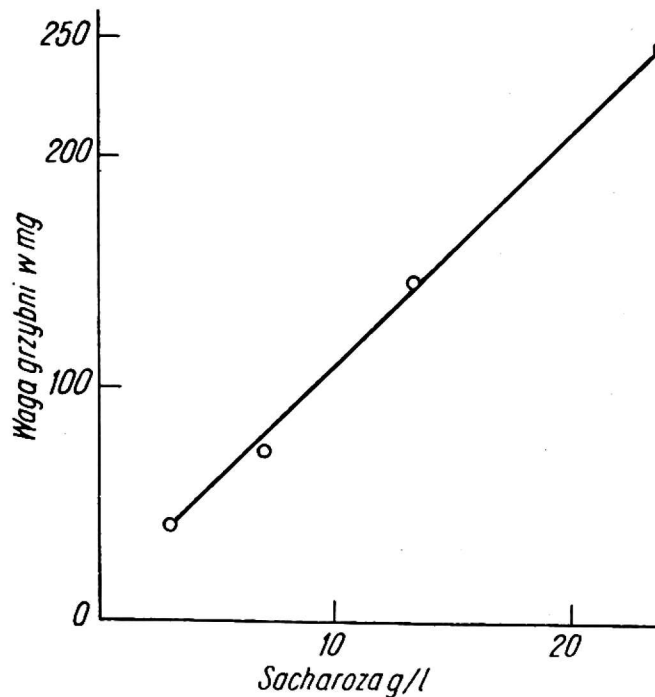
Kontrolę 700 mg cukru + 10 ml roztworu hydrolizatu kazeiny uzupełniamy do 90 ml wodą, dodajemy mieszaniny uzupełniającej* i dzielimy na 3 części. Dalsze postępowanie, tak jak z doświadczalnymi próbkami (rys. 1, 2, 3).

Wykonanie

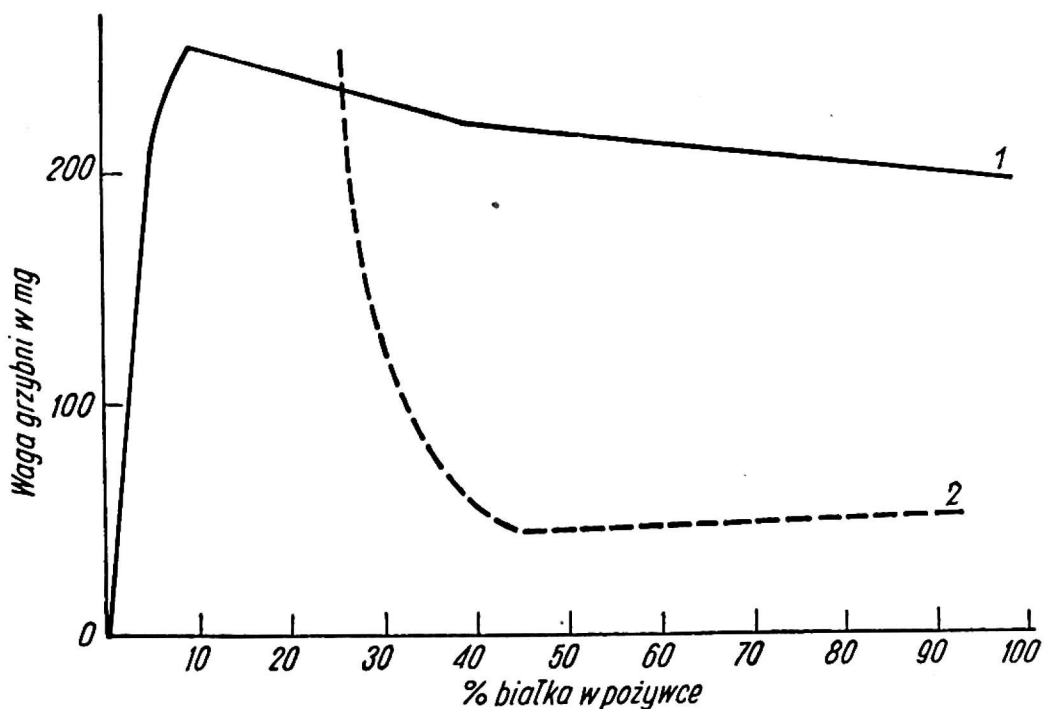
1 g nawózki zadaje się 50 ml 1,25% roztworu kwasu siarkowego w wodzie i umieszcza pod chłodnicą zwrotną, gotując 6 godz. Po 6 godzinach dodajemy węglanu wapnia CaCO_3 (strącony) ok. 3,5 g, następnie przesączamy pod pompą próżniową, popłukując małymi ilościami wody, po doprowadzeniu do 90 ml objętości, dodajemy 1 ml pożywki uzupełniającej

* Ponieważ węglan wapnia usuwa z hydrolizatu oprócz H_2SO_4 również jony kwasu fosforowego, wobec tego pożywkę należy wzbogacić przez dodatek fosforanów. Na 90 ml hydrolizatu, względnie pożywki kontrolnej dodajemy 1 ml roztworu pożywki uzupełniającej w składzie: 3,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 g KH_2PO_4 ; 1 g NaCl ; 5 ml mikro P; rozpuścić w 100 ml H_2O dest., dać po 1 ml na doświadczenie przed rozdzieleniem na 3 kolbki.

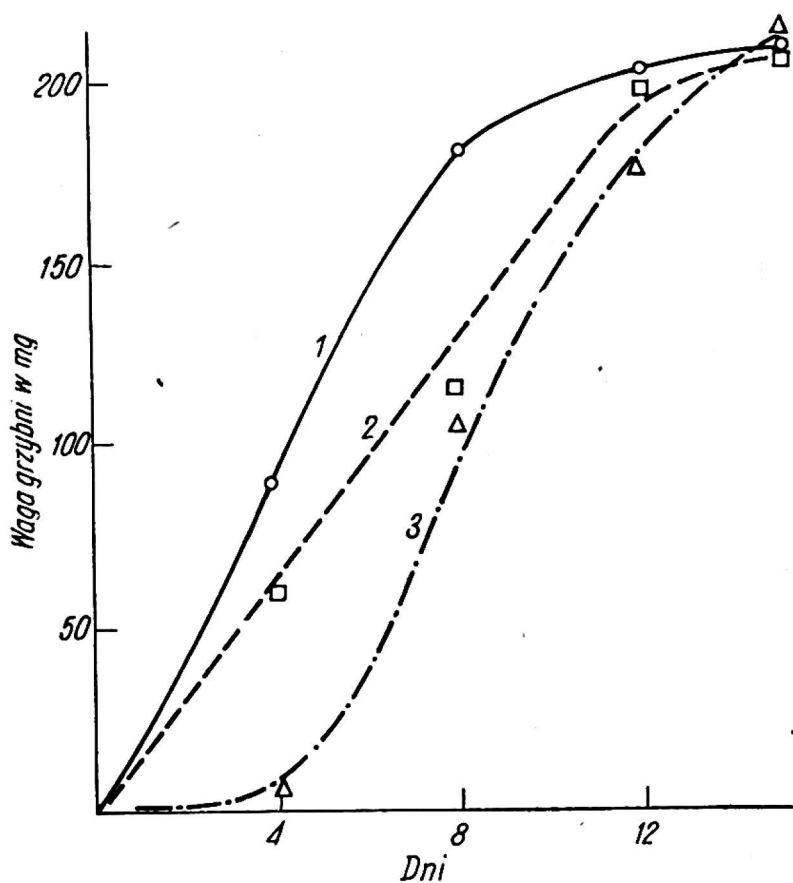
cej, następnie rozdzielamy na 3 erlenmayerki 100 ml i po wyjałowieniu szczepimy 1 ml zawiesiny zarodników *Aspergillus niger*. Po 10 dniach odsączamy grzybnię, suszymy i ważymy (rys. 7, 8, 9).



Rys. 7. Rozwój mikroorganizmu testowego na pożywce zawierającej różne stężenie cukru



Rys. 8. Rozwój mikroorganizmu testowego: 1 — na pożywce zawierającej różny procent białka, 2 — na pożywce, w której wraz ze wzrostem ilości białka wzrasta zawartość związku toksycznego



Rys. 9. Rozwój *Aspergillus niger* na pożywkach o różnej zawartości białka i węglowodanów, lecz białko ma różny skład aminokwasowy: 1 — hydrolizat białka, 2, 3 — niepełnowartościowe mieszaniny aminokwasów

SYSTEM ANALIZ MASOWYCH

Aby dobrze ocenić wartość wyprodukowanego materiału roślinnego należy przeprowadzić serie analiz, oddających najważniejsze parametry wartości. Ponieważ próbki szczególnie z materiałów hodowlanych są bardzo małe, lecz jest ich dużo, konieczne są metody testowe, czy też screeningowe.

Metody testowe pozwalają odróżnić roślinę wykazującą jakąś cechę biochemiczną od osobnika bez tej cechy. Zastosowanie tych metod ogranicza się do przypadków, w których analizujemy alternatywną sytuację. Przykłady: gorzki i niskoalkaloidowy łubin [6] kumarynowy i niskokumarynowy nostrzyk, roślina zawirusowana i zdrowa. Przy metodach testowych, zależnie od organizacji pracy i uproszczeniu toku analizy, wydajność może dochodzić do 1000 analiz na roboczo-godzinę.

Bardziej złożone są metody screeningowe. Wydajność analiz przy niskiej mechanizacji może wynosić najwyżej kilkanaście do kilkudziesięciu na godzinę. Otrzymywany wynik pozwala nam na podzielenie materiału na kilka klas, różniących się zawartością analizowanej substancji.

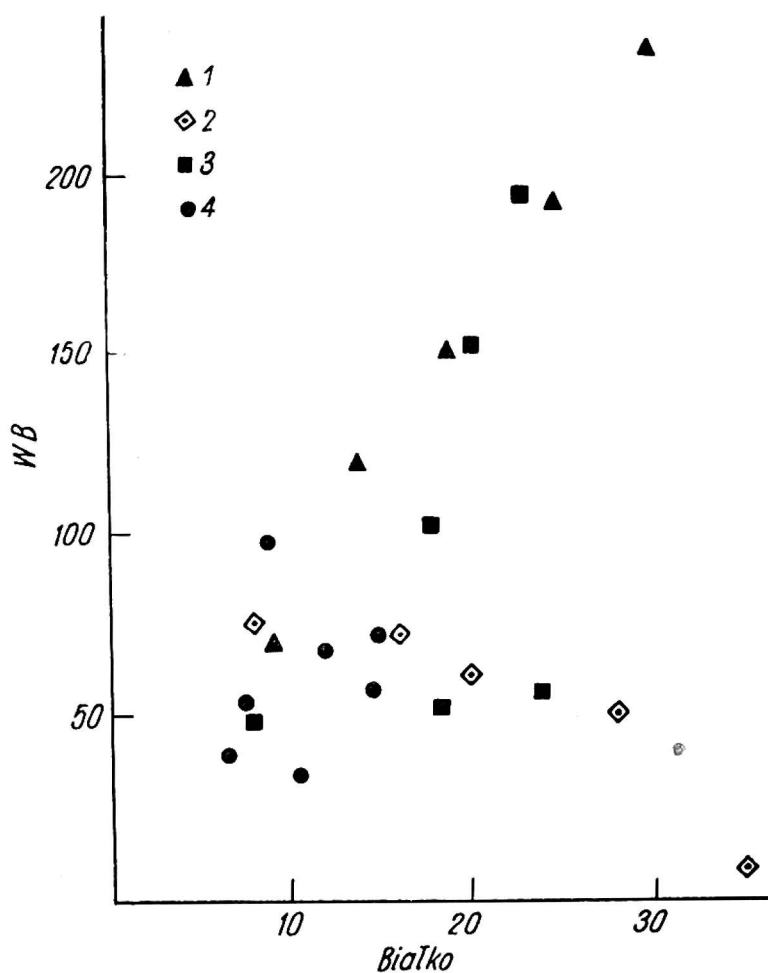
W metodach screeningowych istnieją duże możliwości automatyzacji. Niestety brak u nas odpowiedniej aparatury do tych celów. Pewne urządzenia można jednak zaadaptować z techniki badań laboratoryjnych, stosowanych w medycynie [1]. Aby analizować próbki w automatach stosowanych do analiz medycznych, próbki muszą być poprzednio jednak tak przetworzone, aby mogły być analizowane w tych urządzeniach. Analizy roślinne z konieczności więc muszą być przeprowadzone metodami nie-

automatycznymi, zabiera to nawet przy dobrej organizacji toku analizy dość dużo czasu.

Do większości metod screeningowych koniecznym sprzętem jest kolorymetr. Spośród dostępnych w kraju, najuniwersalniejszy jest Zeiss Specol. Dobre usługi oddaje również prosty w obsłudze kolorymetr chiński K 531.

Metody screeningowe pozwalają nam przeprowadzić selekcję materiału, pozostawiając do analiz dokładnych tylko materiały wybitnie różniące się od przeciętnych. Metody te są bardzo istotne w pierwszych fazach hodowli roślin, pozwalają bowiem zarówno na usunięcie z populacji segregantów zdecydowanie negatywnych, jak również wyizolowanie fenotypów o pozytywnych cechach. Np. aby zanalizować zawartość wybranego aminokwasu egzogenego potrzeba zazwyczaj 10 g naważki, analiza trwa kilkanaście godzin, wynik jest obarczony dużym błędem. Analiza frakcji białek umożliwia znalezienie osobnika o innym stosunku wartościowych biologicznie albumin do nisko wartościowych białek zapasowych, przy zużyciu tylko ok. 200 mg materiału, średni czas trwania analizy wynosi kilkanaście minut. Wstępna analiza zawęży nam badany materiał z kilkuset do kilku prób. Te wysegregowane osobniki mogą już dalej być analizowane metodami dokładnymi.

W przypadku materiału z doświadczeń nawozowych, gdzie wielkość próby nie jest rzeczą istotną, wyniki analiz winny być poparte doświad-

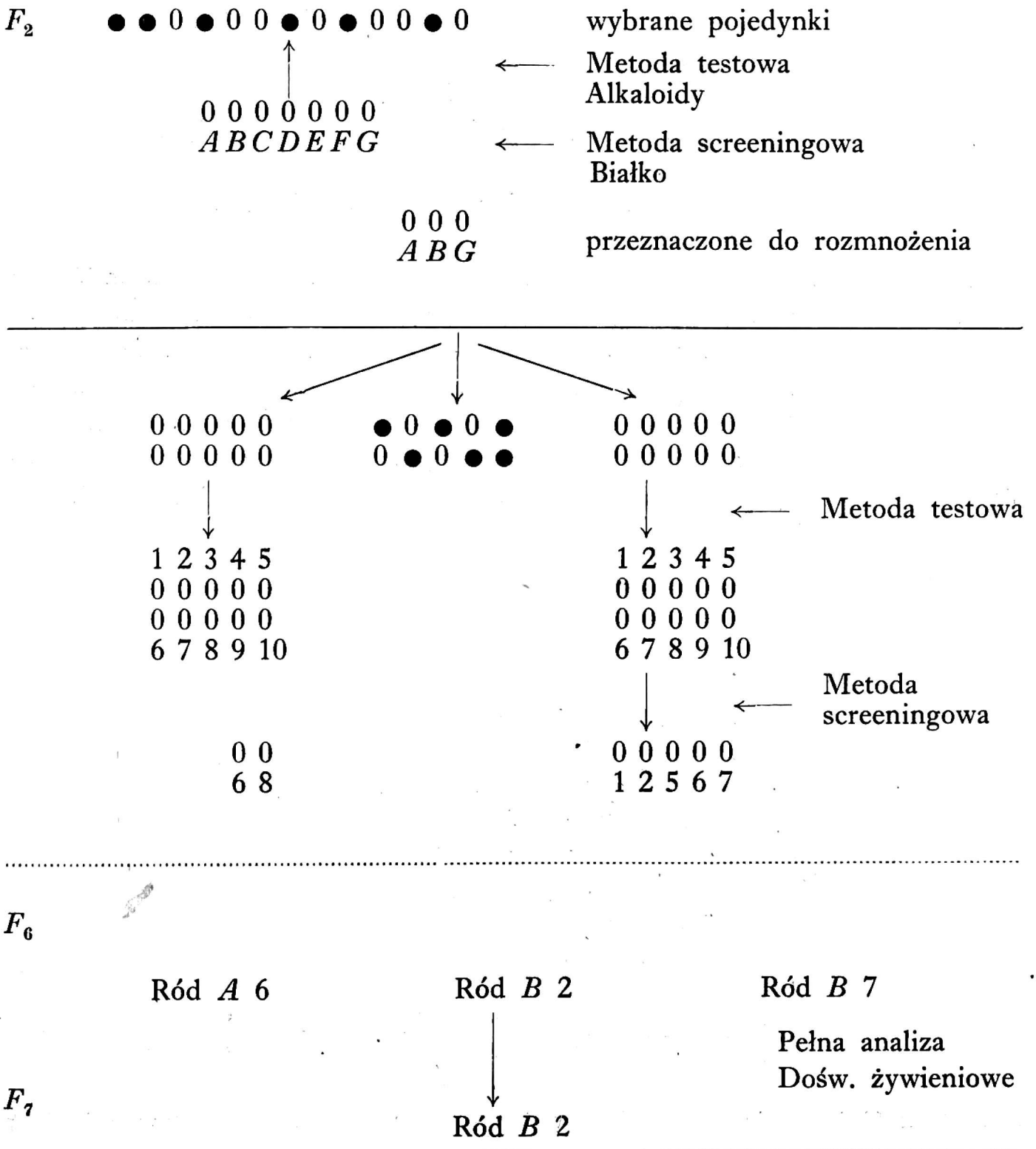


Rys. 10. Rozwój *Aspergillus niger* na różnych próbkach: 1 -- próbki o zwiększającej się wartości odżywczej (sztuczna mieszanina słomy żytniej i mączki z grochu), 2 -- mieszanina jak wyżej wraz z zawartością mączki z grochu (wzrastała zawartość anymetabolitu), 3 -- analiza różnych populacji koniczyny, 4 -- analiza różnych odmian traw

czeniu biologicznym, gdyż jest to istotniejsze od najdokładniejszej nawet analizy chemicznej.

Analiza chemiczna umożliwia nam zbadanie zawartości tylko tych substancji, które analizujemy, a więc analizując zawartość np. egzogenego aminokwasu lizyny, przy okazji nie otrzymamy żadnych danych o obecności szkodliwego związku — jakiegoś np. inhibitora wzrostu (rys. 10). Doświadczenie biologiczne daje nam odpowiedź może mniej pełną jeżeli chodzi o skład chemiczny, lecz istotniejszą, gdy nas interesuje biologiczna wartość otrzymanego produktu roślinnego.

Tok analiz materiału hodowlanego na przykładzie tubinu



Przykład analiz w doświadczeniu nawozowym

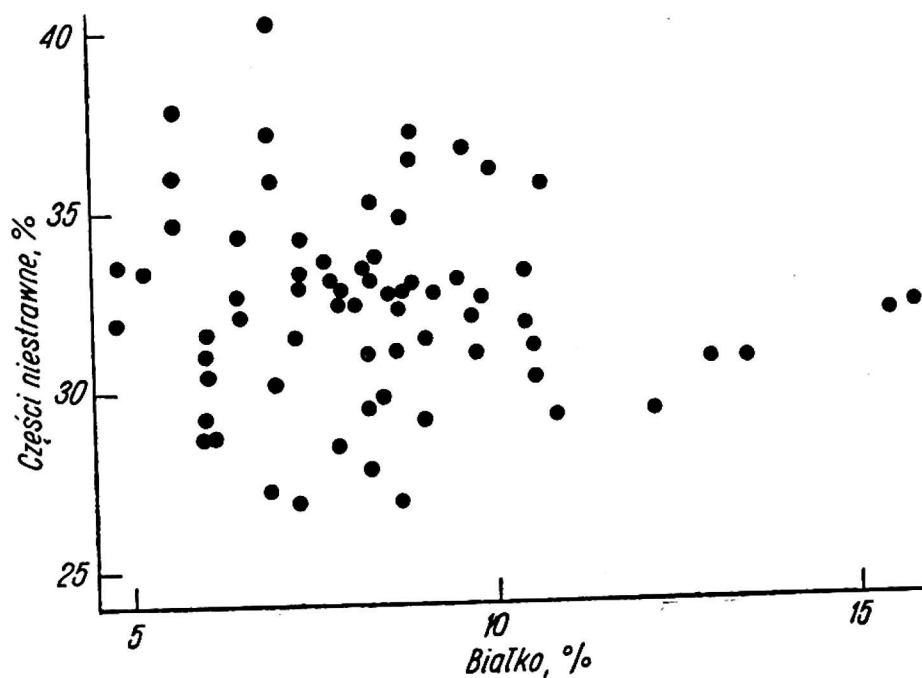
A B C D E F G H
 1 2 3 4 5 6 7 8
 I II III IV V

odmiany lub gatunki
 poziomy nawożenia
 powtórzenia

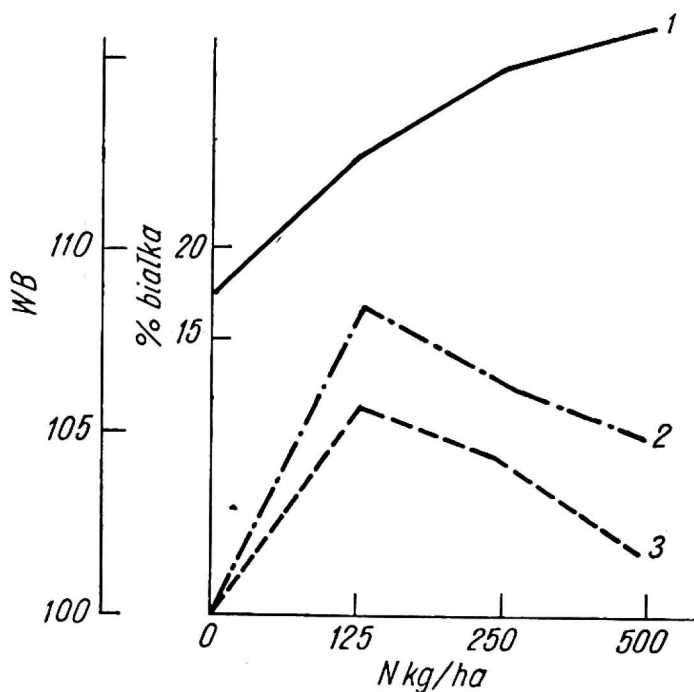
← Analiza screeningowa

- ↓ Połączenie powtórzeń jeżeli brak rozbieżności
- ↓ Analiza chemiczna, biologiczna (mikrobiolog.)
- ↓ Wybór kombinacji do doświadczenia żywieniowego
 odmiany A C G
 poziom nawożenia 1, 3, 5, 8
- ↓ Wybór odmian A C G
 Wybór poziomów nawożenia 1, 3, 5, 8
- ↓ Wynik doświadczenia żywieniowego

Decydując się na wybór analiz musimy sobie również uświadomić, dla jakich zwierząt dana pasza będzie przeznaczona, gdyż wymagania żywieniowe przeżuwaczy i nieprzeżuwaczy są bardzo różne. Generalnie biorąc, pasza przeznaczona dla przeżuwaczy powinna charakteryzować się wysoką wartością biologiczną testem aspergillusowym, pozostałe parametry nie są zbyt istotne. Pasza dla nieprzeżuwaczy powinna zawierać wartościowe białko, a więc wysoki stosunek albumin do pozostałych frakcji białkowych (rys. 11, 12).



Rys. 11. Zróżnicowanie w populacji żywicy wielokwiatowej; punkt oznacza średnią z pięciu osobników klonu



Rys. 12. Porównanie analizy chemicznej na surowe białko z testami biologicznymi: 1 — białko, 2 — *Aspergillus niger*, 3 — mysz

STRESZCZENIE

Hodowla roślin prowadzona w kierunku poprawy jakości produktu wymaga przeprowadzenia tysięcy analiz na wczesnych etapach procesu hodowlanego. Aby temu podołać proces analizy musi być w miarę zmechanizowany. Przeprowadzona krytyczna ocena dotychczasowych metod prowadzi do wniosku, mówiącego że przeliczanie zawartości białka na podstawie oznaczenia azotu jest obecnie niewystarczające. Przy zmieniającym się poziomie nawożenia przyjęcie stałego współczynnika jest obecnie nie usprawiedliwione.

Dla oznaczania zawartości białka w nasionach opracowano metodę frakcjonowania analizy, przy której otrzymuje się w kolejnych ekstraktach: albuminy, globuliny, gliadyny i pozostałe. Dla białek tych przyjęto średnie współczynniki wartości żywieniowej i w ten sposób na podstawie czterech prostych analiz można wyrobić sobie pewne pojęcie o jakości białka w badanym materiale.

Omówiono szczegółowo metodę Lowry'ego oznaczania zawartości białka w poszczególnych frakcjach, metodę immunoprecypitacyjną oznaczania białka właściwego w ekstraktach z mączki nasion lub proszków acetonowych oraz prymitywną metodę oznaczania wartości biologicznej paszy.

Na tym tle wykazano zalety systemu analiz masowych i konkretne sposoby wykorzystania ich w hodowli roślin.

PIŚMIENNICTWO

1. Krawczyński J.: Automatyizacja badań w chemii klinicznej. Post. Bioch. 16, 559, 1979.
2. Mejbaum-Katzenelenbogen W., Mochnacka I.: Kurs praktyczny Biochemii, PWN, Warszawa, 1966.

3. Nowacki E., Przybylska J., Hurich J.: Dependence between content of guanidine derivatives and alkaloids in Leguminous Plants. Bull. Acad. Polon. Scien. ser. sc. biol. 8, 445, 1960.
4. Nowacki E., Wężyk S.: Substancje toksyczne w roślinach pastewnych. Med. wet. 19, 97, 1963.
5. Nowacki E., Wężyk S., Okulicz-Kazarynowa A.: Wstępne badania nad właściwościami fizjologicznymi tingitaniny. Roczn. Nauk rol. 89-A, 107, 1964.
6. Nowacki E., Weznikas Th., Nowacka D.: Metody ilościowego i jakościowego oznaczania alkaloidów łubinowych przystosowane do badań genetycznych. Hod. Rośl. Aklim. (w druku).
7. Prus-Głowacki W.: Możliwość zastosowania metod immunologicznych w hodowli roślin. Hod. Rośl. Aklim. 5, 1970.
8. Przybylska J. i inni: Badania nad wartością biologiczną białka roślin pastewnych. Cz. III, Roczn. Nauk rol. 93-A, 463, 1967.

Эдмунд Новацки, Анджей Анёл, Веслав Прус-Гловацки

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОДЛИННЫХ ПРОТЕИНОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

Резюме

Селекция растений направленная на улучшение качества продуктов требует проведения массы анализов в ранних стадиях селекционного процесса. В связи с этим возникает необходимость механизации по мере возможности процесса анализов. Проведенная критическая оценка применяемых до сих пор методов приводит к выводу, что исчисление содержания протеина на основании определения азота в настоящее время недостаточно. При изменчивом уровне удобрения принятие постоянного коэффициента теперь необосновано. Для определения содержания протеина в семенах разработан метод фракционированного анализа, при котором получают в очередных экстрактах: альбумин, глобулин, глиадин и остальные протеины. Для этих протеинов приняты средние коэффициенты питательной ценности и таким образом на основании четырех простых анализов можно получить известное понятие о качестве протеина в исследуемом материале.

Подробно рассматривается метод Лоури определения содержания протеина в отдельных фракциях иммунопреципитационным способом определения подлинного протеина в экстрактах из семенной муки или ацетонных порошков, а также примитивным способом определения биологической ценности корма.

На этом основании показаны преимущества системы массовых анализов и конкретные способы их использования в селекции растений.

Edmund Nowacki, Andrzej Anioł, Wiesław Prus-Głowacki

METHODEN ZUR BESTIMMUNG SPEZIFISCHEN EIWEISSES
IM PFLANZENMATERIAL

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Pflanzenzüchtung, die auf eine qualitative Verbesserung ihres Produktes abzielt, erfordert in den ersten Etappen des Züchtungsprozesses der Durchführung Tausender Analysen. Um diese Arbeiten zu bewältigen, muss der analytische Prozess massgeblich mechanisiert werden. Eine kritische Beurteilung der bisherigen Methoden führt zu der Erkenntnis, dass eine Umrechnung des Eiweissgehalts auf Grund der Stickstoffbestimmung gegenwärtig nicht genügt. Bei einer variablen Düngungshöhe ist die Annahme eines ständigen Koeffizienten gegenwärtig un gerechtfertigt. Zur Bestimmung des Eiweissgehalts in Samen wurde die Methode einer fraktionierten Analyse ausgearbeitet, bei deren Anwendung man in den sukzessiven Extrakten: Albumine, Globuline, Gliadine und andere Stoffe erhält. Für diese Eiweisse nahm man mittlere Koeffizienten des Nährwerts an, so dass man auf diese Weise auf Grund von vier einfachen Analysen einen gewissen Begriff von der Eiweissqualität im untersuchten Material bekommt.

Es wurde die Lowresche Methode zur Bestimmung des Eiweissgehalts in einzelnen Fraktionen durch die Immunopräzipitationsmethode zur Bestimmung spezifischen Eiweisses in Extrakten aus Samenmehl oder Azetonpulvern, ferner eine primitive Methode für die Bestimmung des biologischen Futterwerts besprochen.

Auf diesem Hintergrund wurden die Vorzüge des Systems der Massenanalysen und ihre konkreten Nutzungsweisen in der Pflanzenzüchtung nachgewiesen.