JOANNA OSTRZYCKA

PRODUKTY PRZEMIAN CHLORKU CHLOROCHOLINY (CCC) W OWOCACH POMIDORÓW, PO ZAGĘSZCZENIU I PO WYSUSZENIU

Z Zakładu Biologii Roślin Warzywnych Instytutu Warzywnictwa
w Skierniewicach
Kierownik: dr *R. Górecki*

Zbadano produkty przemian CCC w owocach pomidora po zagęszczeniu i po wysuszeniu. W czasie procesu zagęszczania stwierdzono bardzo niewielką przemianę CCC do choliny (1,9 do 4,7%). Proces suszenia również nie spowodował większych przemian chlormekwatu; CCC metabolizował do choliny w ilości od 5,4—10,4% i do wolnych aminokwasów średnio 1,7%.

Praca jest kontynuacją badań dotyczących produktów metabolizmu CCC po potraktowaniu rozsady pomidorów radioaktywnym CCC. Badania te podjęto dla wykazania czy procesy przetwórcze, którym często są poddawane owoce pomidorów, takie jak zagęszczanie pulpy pomidorowej (produkcja koncentratu) czy suszenie (produkcja suszu), które są związane z działaniem temperatury, enzymów, drobnoustrojów, zmianą wilgotności materiału itp. mogą mieć wpływ na przemiany ^{14}C-CCC. Badania stanowią uzupełnienie poprzedniego doświadczenia, które wykazało, że CCC zastosowany w bardzo wczesnej fazie wzrostu był przemieszczany do rosnących części wegetatywnych oraz owoców i tylko w małym procencie ulegał przemianom.

Badania opisane w tej części pracy wykonano dodając znakowany ^{14}C-CCC do homogenatu owoców pomidorów przed ich termicznym traktowaniem.

MATERIAŁ I METODY

Badania produktów przemiany ^{14}C-CCC powstających w czasie zagęszczania homogenatu owoców pomidorów

Ze względu na zastosowanie w tych badaniach radioaktywnego CCC nie można było dokładnie powtórzyć procesów produkcji koncentratu w przemyśle. Proces ten w naszych badaniach przypominał przygotowywanie koncentratu pomidorowego w warunkach domowych i prowadzony był pod normalnym ciśnieniem i w temperaturze 100°C.

Do próbek zawierających 0,5 kg zhomogenizowanych owoców pomidorów umieszczonych w zlewce (poj. 1 l, ⌀ 15 cm) dodano 0,8 μCi oraz 2,0 μCi ^{14}C-CCC i po zagotowaniu odparowano na łaźni wodnej do objętości około 300 ml. Przed zastosowaniem preparatu ^{14}C-CCC w badaniach, określano w nim zawartość zanieczyszczeń radioaktywnych. Preparat był zanieczyszczony dwoma radioaktywnymi związkami, betainą glicynową w ilości 2,6% i choliną w ilości 8,6%.

W czasie odparowywania temperatura łaźni wodnej wynosiła 100°C, a temperatura homogenatu 80—90°C.

Czas odparowywania wynosił 4 godziny.

W celu przeprowadzenia ekstrakcji zagęszczony homogenat w ilości 30 g zalewano metanolem (150 ml) i pozostawiono na 16 godzin (od czasu do czasu wstrząsając zawartość).

Następnie homogenat ten poddawano kilkugodzinnej ekstrakcji na wytrząsarce mechanicznej. Po przesączeniu jeszcze raz ekstrahowano przy zastosowaniu mechanicznego wytrząsania używając tej samej co poprzednio ilości metanolu.

Zbadano radioaktywność ekstraktu oraz materiału roślinnego po ekstrakcji oraz przemiany CCC do: lipidów, związków niejonowych, wolnych aminokwasów, białek, 4-rzędowych związków amoniowych (cholina i betaina glicynowa).

Badania te wykonano zgodnie z wcześniej opisaną metodą [7]

Badania produktów przemian ^{14}C-CCC powstałych w czasie suszenia owoców pomidorów

Do oznaczania produktów przemian ^{14}C-CCC powstałych w tym procesie używano homogenat owoców pomidorów (100 g), do którego dodawano określone ilości radioaktywnego chlorku chlorocholiny (0,7 i 1,4 μCi ^{14}C-CCC). Po dokładnym zmieszaniu umieszczono na szalkach Petriego i suszono do stałej wagi w temperaturze 60°C. Następnie drobno zmielony radioaktywny susz naważano w ilości 3 g i poddawano ekstrakcji metanolem (2 × 150 ml).

Ekstrakcja ^{14}C-CCC w danym przypadku trwała 2-krotnie dłużej niż ekstrakcja CCC ze świeżych pomidorów. Polegała ona na dwudniowej samoczynnej ekstrakcji, następnie 3 godzinnej ekstrakcji na wytrząsarce mechanicznej. Proces ten powtarzano jeszcze raz, używając świeżego rozpuszczalnika. Oznaczano radioaktywność: roztworu po ekstrakcji etanolem, materiału roślinnego po ekstrakcji oraz frakcji: lipidowej, związków niejonowych, wolnych aminokwasów, białkowej, 4-rzędowych związków amoniowych.

Określono przemianę ^{14}C-CCC do radioaktywnej choliny i betainy glicynowej. Badania te wykonywano wg metodyki stosowanej przy badaniach metabolitów po potraktowaniu roślin ^{14}C-CCC.

WYNIKI

Produkty przemiany ^{14}C-CCC po zagęszczeniu homogenatu owoców pomidorów

Zagęszczanie homogenatu owoców pomidorów z dodatkiem ^{14}C-CCC, które przeprowadzono pod normalnym ciśnieniem w temperaturze około 80°C — 90°C w ciągu 4 godzin nie wpłynęło wyraźnie na przemiany związku.

Ponieważ frakcje związków niejonowych, lipidów i białek nie wykazywały radioaktywności wyższej niż tło próby kontrolnej (tabela I) mozna wnioskować, że w czasie zagęszczania homogenatu chlorek chlorocholiny nie ulegał przemianom: do związków niejonowych, lipidów, do aminokwasów wchodzących w skład białek.

Stwierdzono bardzo małą aktywność ^{14}C-CCC we frakcji wolnych aminokwasów. Obliczono, że wynosiła ona maksymalnie 1% (tabela I). Wykazano natomiast wysoką aktywność frakcji 4-rzędowych związków amoniowych (tabela I).

Tabela I. Aktywność ^{14}C w poszczególnych frakcjach wydzielonych po koncentracji owoców pomidorów.

Radioaktywność ekstraktu wyjściowego impulsy/min/	CCC niewyekstrahowane %	Frakcja lipidowa impulsy/min/ml	Frakcja związków niejonowych impulsy/min/ml	Frakcja wolnych aminokwasów impulsy/min/ml	Frakcja białek impulsy/min/ml	Frakcja 4-rzędowych związków impulsy/min
70267	3,7	t*	t	36,7	t	68002
67162	3,0	t	t	34,8	t	66503
145530	2,3	t	t	39,1	t	140530
142722	2,9	t	t	40,1	t	140423

* — wyniki są na granicy tła obiektu kontroli ≤30 impulsy/min/ml.

a — wartości % obliczane w stosunku do radioaktywności suchego materiału przed ekstrakcją.

Badając frakcje 4-rzędowych związków amoniowych, po oczyszczeniu metodą chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym, stwierdzono na podstawie pomiarów radioaktywności odpowiednich zakresów absorbenta, że CCC w granicach od 95,3 do 98,1% nie ulegał przemianie, zaś przemiana do choliny wynosiła od 1,9 do 4,7% (tabela II).

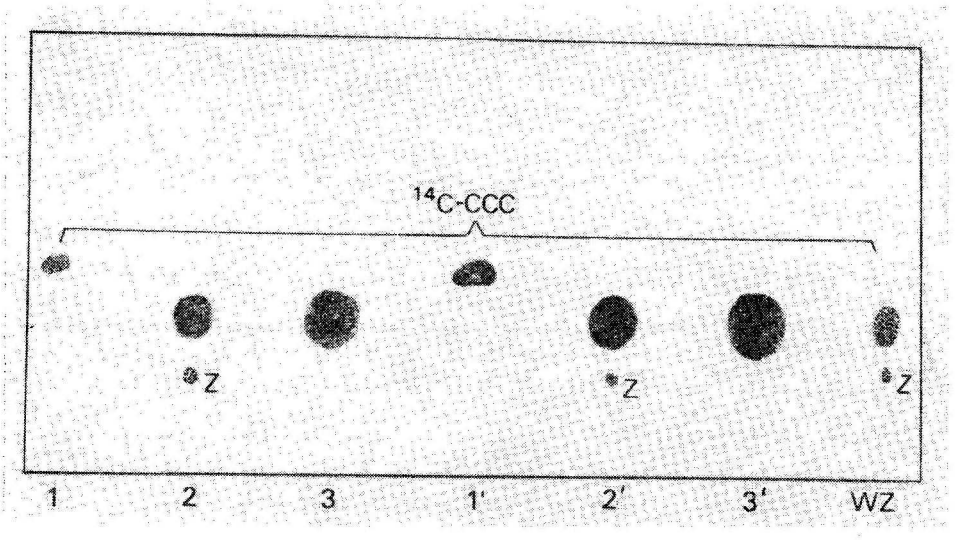
Tabela II. Zawartość radioaktywnej betainy glicynowej i choliny (%) powstałej po procesie koncentracji owoców pomidorów

Radioaktywność frakcji 4-rzędowych związków amoniowych		Betaina glicynowa	Cholina %		Niezmetabolizowane CCC %	
impulsy/min	%		od—do	średnio	od—do	średnio
68002	96,8	BG*	3,2—4,0	3,6	96,8—96,0	96,4
66503	99,0	BG	2,5—3,3	2,9	97,5—96,7	97,1
140530	96,7	BG	1,0—2,8	1,9	99,0—97,2	98,1
140423	98,7	BG	3,7—5,8	4,7	96,3—94,2	95,3

*) — BG wyniki na granicy zawartości radioaktywnej betainy glicynowej w preparacie ^{14}C-CCC (2,6 %).

Zawartość radioaktywnej betainy glicynowej była na poziomie betainy glicynowej w radioaktywnym preparacie. Użyty do doświadczeń preparat był zanieczyszczony dwoma związkami: jeden z nich o Rf = = 0,27 w ilości średnio 8,6%, drugi o Rf = 0,45 (odpowiadający betainie glicynowej) w ilości średnio 2,6%.

Zdjęcia autoradiogramów frakcji 4-rzędowych związków amoniowych potwierdzają bardzo mały metabolizm CCC (ryc. 1). Jedynymi radio-



Ryc. 1. Autoradiogram frakcji 4-rzędowych związków amoniowych po koncentracji owoców pomidora. 1, 2, 3 — kolejne frakcje z kolumny wypełnionej Dowexem 50 W × 4200/400 mesh H+, 1', 2', 3' — frakcje wzmocnione ^{14}C-CCC, wz — radioaktywny preparat, z — radioaktywny związek, którym był zanieczyszczony preparat ^{14}C-CCC.

aktywnymi związkami widocznymi na autoradiogramach wśród badanych 4-rzędowych związków amoniowych był znakowany chlorek chlorocholiny (plama ^{14}C-CCC na ryc. 1) oraz radioaktywny związek, który stanowił zanieczyszczenie preparatu (plama Z na ryc. 1). Radioaktywna cholina była niewidoczna, ze względu na niskie stężenie tego związku.

Produkty przemian ^{14}C-CCC powstałe w czasie suszenia owoców pomidorów

Badania produktów przemian chlorku chlorocholiny po wysuszeniu owoców pomidora wykazały podobnie jak po zagęszczeniu homogenatu brak aktywności we frakcji związków niejonowych, lipidowej oraz aminokwasów wchodzących w skład białek, gdyż radioaktywność tych frakcji była w granicach tła kontroli (tab. III). W związku z tym należy wnioskować, że CCC nie ulega przemianom do związków niejonowych, lipidów i białek.

Stwierdzono bardzo małą radioaktywność frakcji wolnych aminokwasów i obliczono, że ^{14}C-CCC w ilości 1,6—1,9% ulegał przemianie do wolnych aminokwasów.

Wykazano wysoką radioaktywność frakcji 4-rzędowych związków amoniowych.

Tabela III. Aktywność ^{14}C w poszczególnych frakcjach, wydzielonych po procesie suszenia owoców.

Radioaktywność ekstraktu metanolowego impulsy/ /min.	CCC niewyekstrahowanego % a	Frakcja lipidowa impulsy/ /min/ml	Frakcja związków niejonowych impulsy/ /min/ml	Frakcja wolnych aminokwasów		Frakcja białek impulsy/ /min/ml	Frakcja 4-rzędowych związków amoniowych impulsy/ /min
				impulsy/ /min/ml	%		
54022	8,5	t*	t	68	1,8	t	53000
54027	7,8	t	t	75	1,9	t	52900
96210	10,8	t	t	53	1,6	t	95200
97910	9,4	t	t	56	1,7	t	96800

* — wyniki są w granicach tła kontroli, <30 impulsów/min/ml.
a — wartości % obliczane w stosunku do radioaktywności suchego materiału przed ekstrakcją.

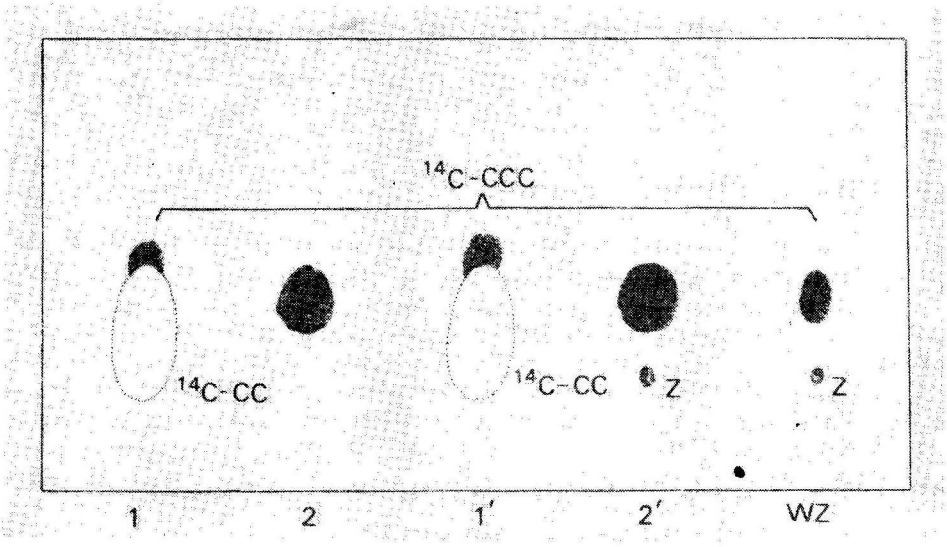
Tabela IV. Zawartość radioaktywnej betainy glicynowej i choliny (%) powstałej po procesie suszenia owoców pomidorów

Radioaktywność frakcji 4-rzędowych związków amoniowych		Betaina glicynowa %	Cholina %		Niezmetabolizowane CCC %	
impulsy/ /min	%		od—do	średnio	od—do	średnio
53000	98,1	BG*	10,3—10,6	10,4	89,7—89,4	89,6
52900	97,9	BG	5,3—5,6	5,4	94,4—94,4	94,5
95200	98,9	BG	8,7—9,3	9,0	91,3—90,7	91,0
96800	98,9	BG	5,5—10,4	7,9	94,5—89,6	92,1

BG — wyniki w granicy zawartości radioaktywnej betainy glicynowej, która stanowi zanieczyszczenie preparatu ^{14}C-CC ($\leqslant$2,6%).

Badania przemian CCC do 4-rzędowych związków amoniowych wykonywane przez określenie radioaktywności odpowiednich stref żelu krzemionkowego, wykazały, że ilość nierozłożonego ^{14}C-CCC wynosiła średnio od 89,6 do 94,5% ,tabela IV), zaś zawartość radioaktywnej choliny wahała się od 5,4—10,4%. Ilość radioaktywnej betainy była w zakresie zawartości radioaktywnej betainy preparatu użytego do doświadczenia.

Autoradiogram 4-rzędowych związków amoniowych (ryc. 2) wykazuje obecność 2 radioaktywnych związków (ciemne plamy na dwóch różnych wysokościach na ryc. 2), jeden z nich na wysokości Rf = 0,36 odpowiadający ^{14}C-CCC należy do CCC, drugi niżej odpowiada związkowi Z, który był zanieczyszczeniem preparatu użytego do doświadczeń. Frakcja 1 ryc. 2 zawierająca radioaktywną cholinę była słabo widoczna, ze względu na stosunkowo małą koncentrację radioaktywnej choliny.



Ryc. 2. Autoradiogram frakcji 4-rzędowych związków amoniowych z owoców po procesie suszenia. 1, 2 — kolejne frakcje z kolumny wypełnionej Dowexem 40 W × 4, 200/400 mesh H+, 1', 2' — kolejne frakcje wzmocnione preparatem ^{14}C-CCC, ... — bardzo słabo widoczna plama ^{14}C-CCC.

Proces suszenia spowodował silniejszą absorpcję CCC na materiale roślinnym po ekstrakcji, mimo, że ekstrakcja materiału suszonego w temperaturze 60°C prowadzona była dłużej niż w badaniach metabolitów w doświadczeniu in vivo. Ilość CCC znajdująca się w materiale pozostałym po ekstrakcji wynosiła od 7,8 do 10,8% (tabela III); a gdy materiał suszono w wyższej temperaturze niż 60°C (np. 80°C) — absorpcja była jeszcze większa i wynosiła aż 28—30%.

DYSKUSJA

Kilkugodzinny proces zagęszczania homogenatu owoców pomidorów nie wpływał w istotny sposób w naszych doświadczeniach na jakość produktów przemiany CCC. Występowały one w podobnych ilościach jak w doświadczeniu z traktowanymi ^{14}C-CCC roślinami. Po procesie suszenia zwiększyła się w pewnym stopniu tylko zawartość radioaktywnej choliny.

Przy suszeniu różnych części pszenicy (międzywęźla, pędy, liście ziarna) w temperaturze 80°C *Bohring* [2] stwierdził przemianę ^{14}C-CCC do radioaktywnej choliny w około 30%. Fakt, że CCC okazał się w tych badaniach związkiem trwałym, niewrażliwym na procesy przetwórcze, nie jest wynikiem, z którego byliby zadowoleni konsument i przetwórca. Wyniki te pozostają w zgodzie z doniesieniami podawanymi przez polskich badaczy, którzy wykrywali CCC w chlebie wypiekanym z mąki z pszenicy traktowanej CCC. Również procesy fermentacji alkoholowej zachodzące przy produkcji wina z winogron nie wpływały na rozkład tego związku [8]. Jednak, jak pisze *Dekhuijzen* i *Bodleander* [3] przy produkcji mąki ziemniaczanej z kłębów ziemniaczanych zawierających CCC wykazano, że było go znacznie mniej w mące ziemniaczanej.

Odrębną sprawą jest wpływ CCC na metabolizm innych substancji biologicznie czynnych oraz mechanizm działania CCC w roślinach pomidora. Szeroko utrzymujący się pogląd, że CCC działa poprzez blokowanie enzymów syntetyzujących giberelinę, nie został potwierdzony w doświadczeniach z pomidorami. Badania metabolizmu 2^{14}C kwasu mewalonowego (MVA) w roślinach traktowanych doprowadziły do stwierdzenia obecności kwasów, których biosynteza w większości wypadków była stymulowana przez CCC. Kwasy te jednak nie były giberelinami [6]. Wyższe dawki CCC wywoływały natomiast zwiększoną biosyntezę skwalenu, co z kolei stymulowało syntezę steroli. Wyniki te nie były dostatecznym dowodem, aby wytłumaczyć zjawisko retardacji wywołane przez chlorek chlorocholiny na roślinie pomidora [6].

Chlorek chlorocholiny jak wykazują badania *Müllera* i *Shuphana* [6], stymulował biosyntezę fosfatydylocholiny w pomidorach a także rutyny [4] i choliny [1, 4]. To ostatnie stwierdzenie można było interpretować przemianą CCC do choliny, zwłaszcza jeśli w badaniach metabolitów nie stosowano znakowanego CCC [5]. *Birecka* [1] przypuszcza jednak, że CCC działał na enzymy syntetyzujące cholinę, sam zaś nie ulegał przemianie.

WNIOSKI

1. Proces koncentracji homogenatu owoców pomidorów nie wpływał na przemiany CCC (chlormekwatu). Ilość niezmetabolizowanego ^{14}C-CCC wynosiła średnio 96,7%; stwierdzono bardzo niewielką przemianę CCC do choliny, która była jedynym stwierdzonym produktem przemiany.
2. Proces suszenia również nie spowodował większych przemian chlormekwatu do choliny (od 5,4 do 10,4%) ani wolnych aminokwasów (średnio w 1,7%); pozostała radioaktywność należała do niezmetabolizowanego ^{14}C-CCC.

Й. Остжыцка

ПРОДУКТЫ ПЕРЕВРАЩЕНИЙ ХЛОРИСТОЙ ХЛОРОХОЛИНЫ (CCC) ВО ФРУКТАХ ТОМАТОВ ПОСЛЕ СГУЩЕНИЯ И ВЫСУШЕНИЯ

Резюме

Исследовано продукты перевращения CCC в процессе просушивания и сгущения томатной мякиши. Показано большую устойчивость хлормеквата во время течения этих процессов. После процесса сушки сгущения CCC пере-

вращался в холину в количестве средне 3,3%. Но процесс сушки вызывал перемену в холин в количестве 5,4—10,4% и в свободные аминокислоты — средне 1,7%.

J. Ostrzycka

PRODUCTS OF CHLOROCHOLINE CHLORIDE (CCC) METABOLISM IN TOMATOES AFTER CONCENTRATION AND AFTER DRYING

Summary

The products of CCC metabolism were determined after drying and concentration of tomato pulp. A considerable stability was demonstrated of chlormequate during these processes. After concentration CCC was metabolized to choline in an average proportion of 3.3%. The process of drying caused CCC metabolism to choline in 5.4—10.4% and to free amino acids in 1.7%.

PIŚMIENNICTWO

1. *Birecka H.:* Translocation and distribution of ^{14}C-labelled (2-chloroethyl) — Trimethylammonium (CCC) in wheat Bull. de Acad. Polonaise Sciences 1967, 15, 707. — 2. *Bohring J.:* Abbau Auswaschung von Chlorcholinchlorid bei Weizen. Z. f. Pflanzenernähr. u. Bodendk. 1972, 131, 179. — 3. *Dekhuijzen H. M., Bodleander K. B. A.:* Distribution and persistence of chlormequat in potato plants. Pestic. Sci. 1973, 4, 619. — 4. *Jabłonowski W.:* Ocena wpływu chlorku chlorocholiny (CCC) na poziom zawartości choliny oraz rutyny w owocach pomidora (*Lycopersicon esculentum* Mill.) poddanych działaniu tego retardanta. Bromat. Chem. Toksykol. 1972, 5, 27. — 5. *Jung J., El-Fouly:* Über den Abbau von Chlorcholinchlorid (CCC) in der Pflanze. Z. Pflanzern., Düngg. u. Bodenkde. 1966, 114, 128. — 6. *Müller H., Schuphan W.:* Biochemische Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus des Wachstumsregulators Chlorcholinchlorid (CCC) bei der Tomatenpflanze *(Lycopersicon esculentum)* Qual. Plant. Pl. Fds. Hum. Nutr. 1976 25, 3/4, 263. — 7. *Ostrzycka J., Śmierzchalska K.:* Produkty przemian chlorku chlorocholiny (CCC) w owocach pomidorów. Roczn. PZH. 1986, 37, 422. — 8. *Tafuri., Businelli M., Giusquiani P. L.:* Chlorocholine chloride residues in grapes and their fate in winemaking. J. Agr. Food Chem. 1970, (13): 5, 869.

Dnia 1986.04.20.
96-100 Skierniewice, ul. 22 Lipca 1/3.