

TEOFIL DĄBROWSKI

## WPLYW ILOŚCI AZOTU BIAŁKOWEGO I AMINOKWASOWEGO NA GATUNEK HERBAT

Dział Higieny Żywności i Żywności WSSE w Gdańsku

W skład herbaty wchodzi wiele składników. Są to: woda, białka, aminokwasy, kofeina, teofilina, teobromina, olejki eteryczne, cukry, związki mineralne, adenina, aminopuryny, chlorofil, ksantofil, karoten, woski, kwercetyna oraz nieznaczna ilość witamin i enzymów (1). Ta różnorodność składu zmienia się ilościowo w zależności od klimatu, nasłonecznienia, gatunku krzewu, pory roku, położenia plantacji nad poziomem morza oraz od warunków agrotechnicznych. W rezultacie otrzymując herbatę z tej samej plantacji, lecz z różnych okresów, mamy do czynienia prawie zawsze z odmiennym artykułem. Ilości poszczególnych składników herbaty w takich przypadkach są zmienne. Obecnie wyraża się pogląd, że niedaleki jest już czas, kiedy wartość herbaty oceniać się będzie wyłącznie przez badania chemiczne i dlatego chcąc stworzyć pewne obiektywne kryteria oceny chemicznej herbaty przeprowadziłem szereg analiz poszczególnych herbat różniących się między sobą rodzajem, miejscem pochodzenia i ogólną kiperską oceną organoleptyczną.

Badania herbat przeprowadzałem pod względem zawartości w nich białek, aminokwasów, garbników, kofeiny, wyciągu wodnego, łądzynek i zawartości popiołów, podając przy tym ocenę organoleptyczną (2), (3). Jednym z głównych czynników wpływających na ilościowy i jakościowy skład komórki liścia herbaty są białka i produkty ich rozpadu — aminokwasy (4, 5). Stanowią one podstawę funkcjonalności komórki roślinnej.

Odnosnie do zawartości białek i aminokwasów w herbacie oraz ich wpływu na kształtowanie się jakości czarnej i zielonej herbaty wielu badaczy wyraziło różny pogląd.

Pierwsze dość szczegółowe badania nad białkami assamskich herbat rozpoczął *Harler* (3) w roku 1933. Według jego badań ogólna zawartość azotu w herbacie wynosi 4,59%, w tym azot rozpuszczalny w wodzie stanowi 2,22%, azot kofeiny 1,15%, azot wytrącony kwasem fosforowolframowym 0,47% i azot wytrącony octanem ołowiu 0,44%. Odmienne stanowisko w sprawie białek herbacianych zajął *Shaw* (6), który twierdzi, że w herbacie mamy do czynienia w przeważającej mierze z rozpuszczalnym azotem kofeiny i teofiliny oraz z nierozpuszczalnym azotem glutelin i kompleksem białkowo-taninowym.

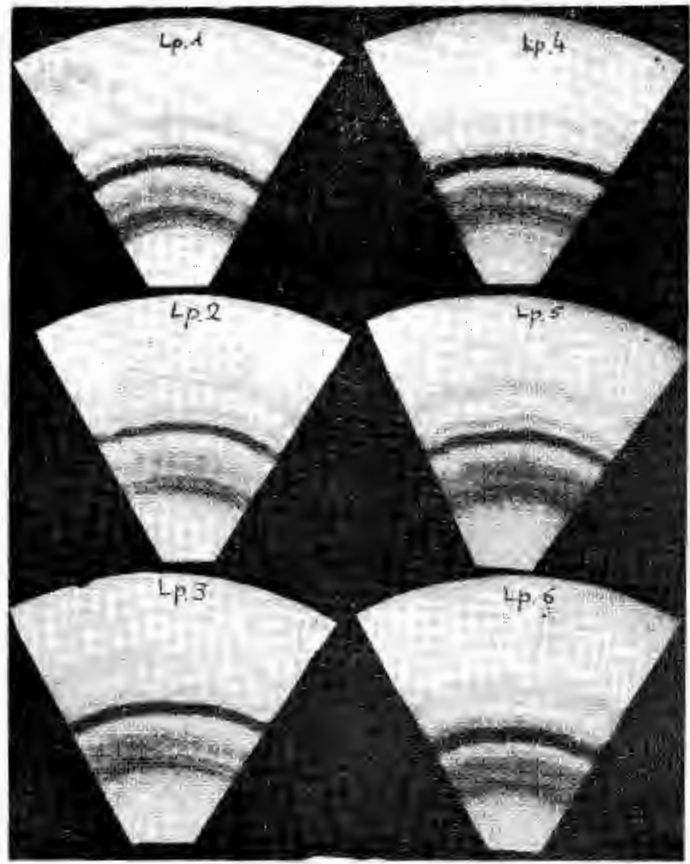
Nad zawartością azotu prowadził badania *Woroncow* (7) i *Serenkow* (8). Pierwszy oznaczał zawartość w poszczególnych gatunkach herbat i według jego opinii herbata cejlońska zawiera ogólnego azotu 4,10%, chińska — 4,19%, czakwińska — 4,30% i azargelska — 4,72%. *Serenkow* oprócz ogólnego azotu oznaczał w herbatach niektóre aminokwasy. Wszyscy badacze zajmujący się zawartością azotu w liściach zielonej

i czarnej herbaty stwierdzają, że herbaty z krzewów rosnących w południowych rejonach, bardziej nasłonecznionych posiadają w swym składzie mniej ogólnego azotu, aniżeli krzewy rosnące bardziej na północy. Stwierdzili oni również, że na zawartość azotu dodatkowo wpływa jakość gleby. Gleby Gruzji i Chin bogate w związki humusowe odznaczają się dużą zawartością azotu, podczas gdy gleby Jawy, Cejlonu, Sumatry są typowymi glebami laterytowymi, ubogimi w azot, bogate natomiast w związki alkaliczne. Oprócz wpływu nasłonecznienia i stanu gleby (9) na zawartość azotu w liściach dużą rolę odgrywają sztuczne nawozy azotowe. Japończycy na swych plantacjach, chcąc zwiększyć zawartość ogólnego azotu w zielonej herbacie, nawożą plantacje dużą ilością sztucznych nawozów azotowych zacierając jednocześnie krzewy przed nadmiernym nasłonecznieniem. Taki rodzaj uprawy prowadzi do intensywnego wzrostu azotu w liściach herbaty i jak podaje *Harler* zielona herbata japońska zawiera około 5,69% azotu, co w przeliczeniu na białko wynosi około 35,58%. W liściach tych herbat istnieje odwrotna zależność między ilością białek i garbnikami. Dlatego też herbaty japońskie zawierają zmniejszone ilości garbników w porównaniu z herbatami czarnymi.

W technologii herbaty, która zasadniczo dzieli się na pięć faz, jak wędnięcie, skręcanie, fermentacja, suszenie i sortowanie liścia, największą uwagę kładzie się na skręcanie i fermentację, gdyż w tych dwóch fazach zachodzą przemiany białkowe, polegające na hydrolizie i syntezie (10). W technologii część nierozpuszczalnych białek na skutek procesów enzymatycznych przechodzi w białka rozpuszczalne. Ilość ta wg *Van Romburgha*, *Lehmana* (11) i *Woroncowa* wynosi średnio 6% ogólnej ilości białek nierozpuszczalnych. Ilość białek, ich przemiany i produkty rozpadu, kształtują charakter i gatunek liścia. *Oparin* (12) i *Bokuczawa* (11) na podstawie swych badań udowodnili, że są one decydującym czynnikiem, obok garbników, które kształtują charakter herbaty. One to bowiem stanowią ochronę fermentów przed inaktywującym działaniem garbników, pozwalają działać tannazie, która z kolei rozszczepiając garbniki powoduje nadanie smaku i barwy wyciągowi wodnemu herbaty. Produkty rozpadu białek — aminokwasy wg *Kretowicza*, *Tokarewa*, *Pertowa*, *Drczdowa* (11) i *Bokuczawy* przyczyniają się do tworzenia aromatu herbacianego. Podstawą powstawania aromatów jest dezaminacja aminokwasów w obecności kwasu chlorogenowego na skutek działania chinonów.

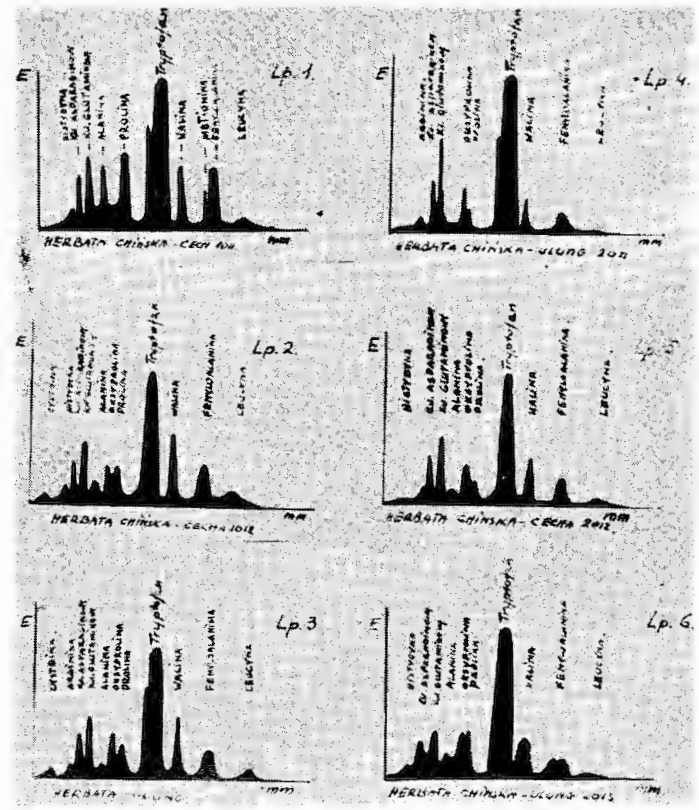
*Bokuczawa* ogrzewając szereg aminokwasów z taniną wykazał powstawanie różnych zapachów kwiatowych. Obok tanin w tworzeniu zapachów aromatów kwiatowych biorą udział również monosacharydy, które łącząc się z aminokwasami dają szczególnie w podwyższonej temperaturze (suszenie herbaty) związki zapachowe. Jak wykazuje *Bokuczawa* i *Popow* (13) aminokwasy z garbnikami i aldehydami tworzą brązowo-czerwone barwniki spełniając tym samym ważną rolę w nadaniu barwy naparowi.

Przystępując do ilościowego oznaczenia białek i produktów ich rozkładu aminokwasów w poszczególnych herbatkach musiałem się liczyć z obecnością innych związków azotowych takimi jak hypoksantyna (6-hydroksypuryna), ksantyna (2,6-dwuhydroksypuryna), adeina (6-aminopuryna), teofilina, teobromina (1,3 i 3,7 — dwumetyloksantyna) oraz kofeina (1, 3, 7 — trójmetyloksantyna). Wszystkie te związki razem wzięte



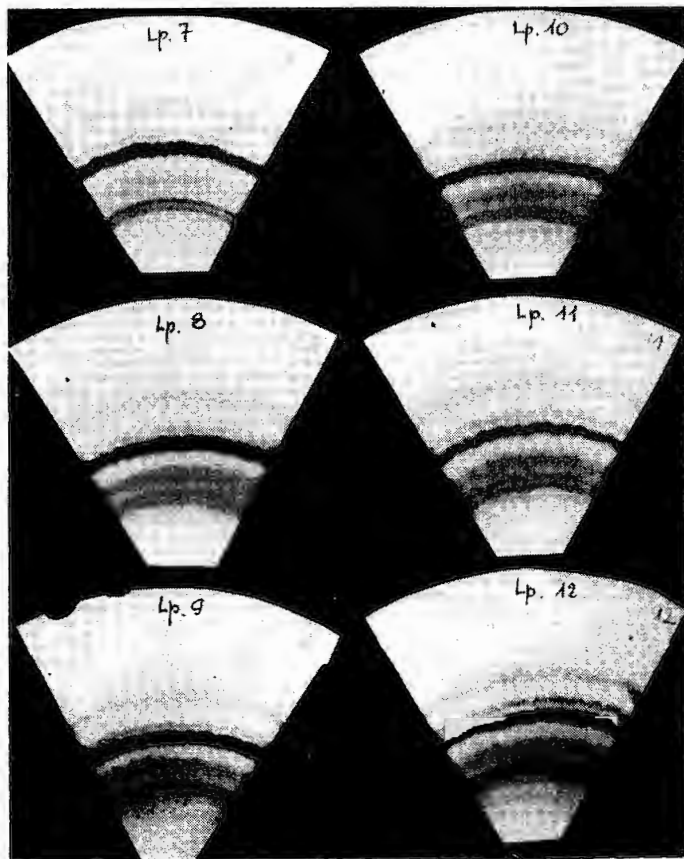
Ryc. 1.

Fotografie rozwiniętych chromatogramów poszczególnych herbat wybarwionych ninhydryną. (Umieszczone numery Lp. na chromatogramach odpowiadają numerom herbat w tab. I.



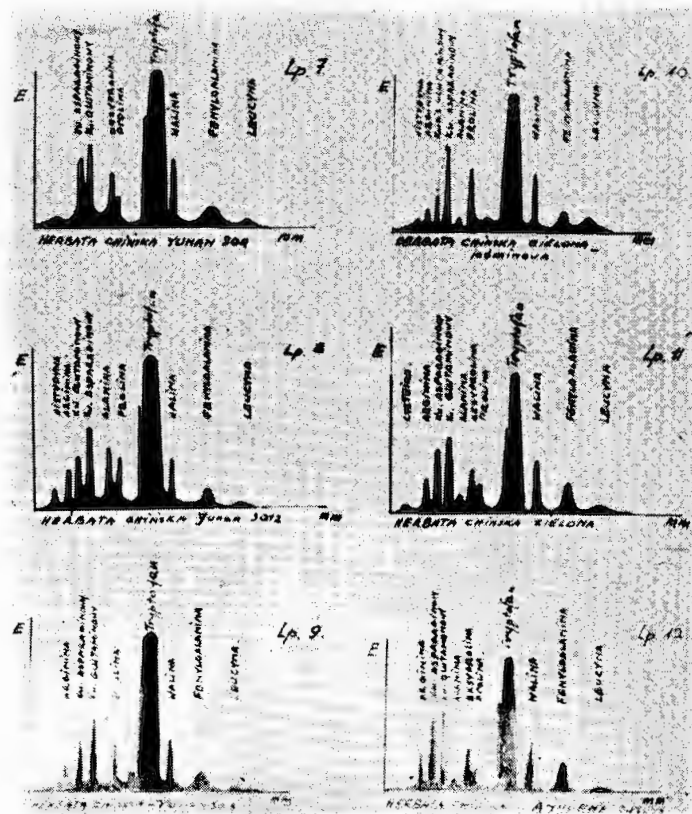
Ryc. 1a.

Wykresy, rozdziu mieszanki aminokwasów poszczególnych gatunków herbat. (Numery Lp. wykresów odpowiadają numerom fotografii umieszczonych obok).



Ryc. 2.

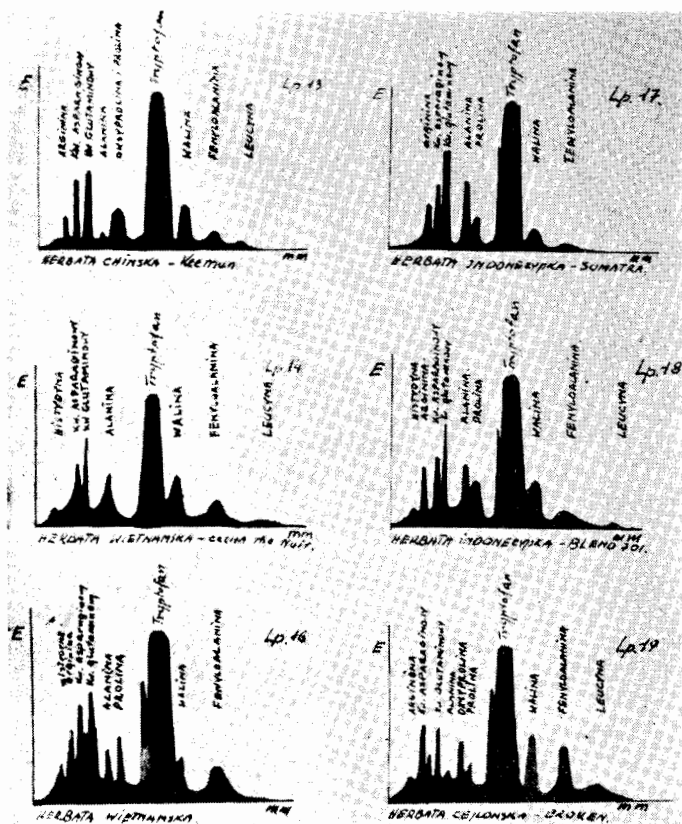
Fotografie rozwiniętych chromatogramów poszczególnych herbat wybarwionych ninhydriną. (Umieszczone numery na chromatogramach odpowiadają numerom herbat w tab. I.



Ryc. 2a.

Wykres rozdziału mieszaniny aminokwasów poszczególnych gatunków herbat. (Numery Lp. wykresów odpowiadają numerom fotografii umieszczonych obok).

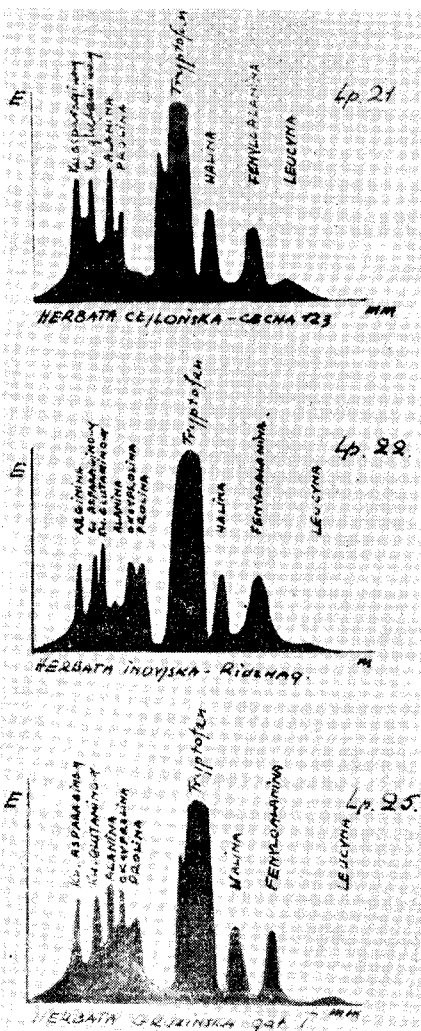
z wyjątkiem kofeiny występują wprawdzie w niewielkiej ilości, lecz mogą przy małej ilości aminokwasów stanowić poważny procent rozpuszczalnego azotu. Wiedząc o obecności powyższych związków azotowych w badanym materiale zastosowałem następującą metodę. Oznaczałem azot met. Kjeldahla, ekstrahowałem azot niebiałkowy (aminokwasy) jak również oznaczałem osobno pochodne ksantyny (kofeinę, teofilinę, i teobrominę). Sumaryczną ilość białek otrzymywałem odejmując od ogólnego azotu, azot aminokwasów i sumę pochodnych ksantyn, któ-



Ryc. 3. Wykresy rozdzieleń mieszaniny aminokwasów poszczególnych gatunków herbat. (Numery Lp. wykresów odpowiadają numerom herbat umieszczonych w tabeli I).

ra ogólnie oznaczyłem jako kofeinę ze względu na minimalną ilość teofiliny i teobrominy. Oprócz powyższych badań przeprowadzałem ilościowe zróżnicowanie metodą chromatograficzną wolnych aminokwasów zawartych w poszczególnych gatunkach herbat. Wyniki tych badań przedstawiam na fotografiach i wykresach Ryc. 1, 2, 3, 4.\*

Oznaczanie azotu ogólnego met. Kjeldahla wykonywałem następująco: 1 g sproszkowanej herbaty w łódeczce szklanej przenosiłem do kolby Kjeldahla dodawałem 25 ml stężonego kwasu siarkowego, 8 g siarczanu potasowego i 0,5 g siarczanu miedzi. Kolbę umieszczałem pochyło na siatce azbestowej, ogrzewałem na niewielkim płomieniu do chwili usta-



Ryc. 4.

Wykresy rozdzielu mieszaniny aminokwasów poszczególnych gatunków herbat. (Numery Lp. wykresów odpowiadają numerom herbat umieszczonych w tabeli I).

ryc. 5. Rozpuszczalnikiem był n-butanol + kwas octowy + woda w stosunku objętościowym 4:1:5 (4). Rozpuszczalnik przez chromatogram przepuszczałem trzykrotnie celem dokładnego uszeregowania aminokwasów.

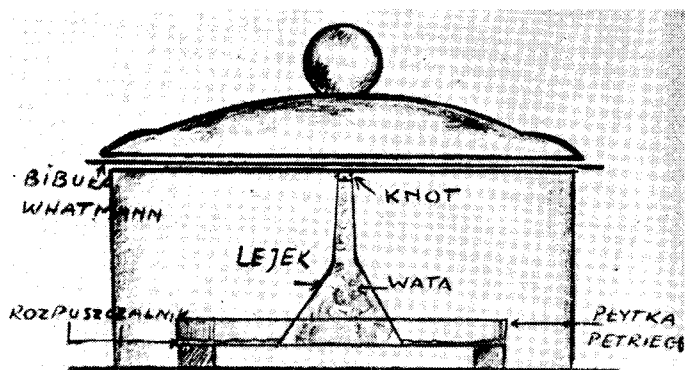
Temperatura komory w czasie rozwijania chromatogramów wynosiła średnio 18°. Do celów porównawczych wykrytych aminokwasów użyłem wzorca mieszaniny 18 aminokwasów w ilościach podanych przez *Niewiarowicza* (15). Wywołanie wszystkich chromatogramów przeprowadza-

nia pienienia się zawartości. Po ustaniu pienienia kolbę przenosiłem na specjalny piec szeregowy, gdzie spalanie odbywało się bezpośrednio na płomieniu gazowym. Po 8 godzinach spalania kiedy roztwór całkowicie odparował się, przenosiłem go do aparatu Kjeldahla. Dalsze oznaczenie jak alkalizowanie roztworu i odpędzanie z parą wodną amoniaku robiłem według wskazań podanych przez *Krauzego* (17).

Azot aminokwasowy (rozpuszczalny) oznaczałem w następujący sposób. Sproszkowaną próbkę badanej herbaty w ilości 20 g poddawałem ekstrakcji chloroformowej celem usunięcia kofeiny i innych pochodnych ksantyny. Uwolnioną od pochodnych ksantyny próbkę poddawałem czterokrotnej elucji każdorazowo 200 ml 75% alkoholu etylowego. Zebrane ekstrakty dzieliłem na dwie równe części, po oddestylowaniu rozpuszczalnika, oznaczałem zawartość azotu metodą analogiczną jak przy azocie ogólnym w drugiej zaś części, po zagęszczeniu roztworu do objętości 10 ml, oznaczałem w nim chromatograficznie obecność poszczególnych aminokwasów. Roztwór ten był uprzednio odwirowany w celu usunięcia nierozpuszczalnych związków humusowych. Otrzymane w ten sposób aminokwasy nanosiłem trzykrotnie w ilości 0,002 ml pipetą hematologiczną na bibułę Whatman Nr 1 pociętą w sektory.

Schemat komory do chromatografii choryzontalnej przedstawiłem w

\* Ze względu na brak miejsca w tekście załączam jedynie tylko część fotografii chromatogramów.



Ryc. 5. Schemat komory chromatograficznej do rozwijania chromatogramów wg Givt

Tabela I

Zestawienie zawartości azotu ogólnego i aminokwasowego w herbatach chińskich, wietnamskich, indonezyjskich, cejlońskich, indyjskich i gruzińskich

L.p.	Pochodzenie i cecha herbaty	Zawartość ogólnego azotu w %	Zawartość aminokwasowego azotu w %
1	chińska — cecha 1011 . . . . .	4,48	0,80
2	chińska — cecha 1012 . . . . .	4,50	0,63
3	chińska — Ulung . . . . .	4,49	0,67
4	chińska — Ulung 2011 . . . . .	4,52	0,59
5	chińska — Ulung 2012 . . . . .	4,47	0,64
6	chińska — Ulung 2013 . . . . .	4,40	0,78
7	chińska — Yunan 3011 . . . . .	4,71	0,78
8	chińska — Yunan 3012 . . . . .	4,94	0,80
9	chińska — Yunan 3013 . . . . .	4,62	0,68
10	chińska zielona jasmিনowa . . . . .	4,94	0,76
11	chińska zielona . . . . .	4,90	0,74
12	chińska zielona-Anhüene . . . . .	4,83	0,60
13	chińska — cecha Keenum . . . . .	4,41	0,79
14	wietnamska — cecha the Noir . . . . .	4,12	0,78
15	wietnamska — cecha the Noir 3p . . . . .	4,29	—
16	wietnamska . . . . .	4,37	1,12
17	indonezyjska — cecha Sumatra . . . . .	4,10	0,79
18	indonezyjska — cecha Blend 701 . . . . .	4,20	0,88
19	cejlońska — Broken . . . . .	4,46	0,91
20	cejlońska — cecha 114 . . . . .	4,38	—
21	cejlońska — cecha 123 . . . . .	4,41	1,02
22	indyjska — cecha Ridzwag . . . . .	4,38	0,98
23	indyjska — cecha Assam . . . . .	4,42	—
24	indyjska — cecha Madras . . . . .	4,40	—
25	gruzińska I gat. . . . .	4,58	0,99
26	gruzińska II gat. . . . .	4,60	—

łem metodą zanurzeniową, używając izatyny (0,2 g izatyny w 4 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$  96% i 96 ml acetonu) (16) oraz ninhydryny (0,2 g ninhydryny, 1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  96%, w czystym acetonie) (17).

Izatynę dającą większą różnorodność barw używałem jako dodatkowe uzupełnienie przy identyfikacji poszczególnych aminokwasów. Do oznaczeń ilościowych wybarwiałem chromatogramy ninhydryną. Zabarwione chromatogramy ciąłem na łukowate 1 mm paski i eluowałem każdy paseczek w 4 ml 75% alkoholu etylowego zawierającego 0,2 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (18). Intensywność koloru mierzyłem w fotokolorymetrze Pulfricha przy użyciu filtr S53.

Wybarwione aminokwasy ninhydryny i wykresy ich zawartości z poszczególnych herbat przedstawiłem na ryc. 1, 2, 2a, 3, 4, 5, 6.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Interpretując wyniki badań nad zawartością azotu ogólnego, aminokwasowego oraz badania chromatograficzne aminokwasów należy stwierdzić, że herbaty ze stref północnych (chińskie i gruzińskie) zawierają azotu ogólnego w granicach od 4,40% do 4,94%, średnio 4,63%; azotu aminokwasowego od 0,59% do 0,80%, średnio 0,71%.

Herbaty ze stref subtropikalnych i tropikalnych: indyjskie, cejlońskie, wietnamskie i indonezyjskie mają azotu ogólnego od 4,10% do 4,46%, średnio 4,32%; azotu aminokwasowego od 0,78% do 1,12%, średnio 0,93%.

Ta odwrotna zależność między azotem ogólnym a aminokwasowym (niezwiązanym) w herbatach ze stref północnych a subtropikalnych i tropikalnych jest wskaźnikiem, że w danej herbacie proces hydrolizy białka został bardzo daleko posunięty. Duża ilość wolnych aminokwasów świadczyć może o zwiększaniu jakości surowca procesami technologicznymi. Ilość wolnych aminokwasów w gotowej herbacie oscylująca w granicach 0,9 — 1% świadczyć może o dobrze sfermentowanej herbacie.

Stosunek azotu aminokwasowego do białkowego w danym gatunku i rodzaju rośliny jest prawie wielkością stałą, zależy jedynie, jak stwierdził *Neurath* i *Keuneth* (19), od warunków klimatycznych, rodzaju gleby i wzrostu komórek.

Według moich badań stosunek ten w herbatach chińskich wynosi 0,46, w herbatach gruzińskich 0,55, a w pozostałych badanych, które obejmują jako jedną grupę cejlońskie, indyjskie i indonezyjskie stosunek ten wynosi 0,62.

W czasie identyfikacji wolnych aminokwasów w badanych herbatach stwierdziłem obecność następujących aminokwasów: cysteinę, histynę, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, alaninę, oksyprolinę, prolinę, tryptofan, metioninę, fenyloalaninę i leucynę.

Według moich badań w chromatogramach najobficiej występuje tryptofan oznaczony przez niektórych badaczy jako teatanina.

Dzięki zastosowaniu wybarwiania chromatogramów izatyną udało mi się wykryć oksyprolinę, o której brak wzmianek w fachowym piśmiennictwie o herbacie.



T. Домбровский

## ВЛИЯНИЕ КОЛИЧЕСТВА БЕЛКОВОГО И АМИНОКИСЛОТНОГО БЕЛКА НА КАЧЕСТВО ЧАЯ

### Содержание

Автор констатировал, что чай северных полос: китайский, грузинский содержат общего азота в количестве от 4,40% до 4,96%, азота бинокислотного от 0,59% до 0,80%.

Чай полос субтропических и тропических: индийский, вьетнамский и индонезийский — общего азота от 0,78% до 1,12%.

В чае автор обозначил следующие аминокислоты: цистеин, гистидин, аспарагиновая кислота, глютаминовая кислота, аланин, пролин, оксипролин, триптофан, метионин, фенилаланин и леуцин.

T. Dąbrowski

## PROTEIN AND AMINO ACID NITROGEN VERSUS GRADE OF TEA

### Summary

Author found that the teas from northern areas (China, Gruzja) shows higher contents of total nitrogen (4.40 — 4.96%) and lower contents of amino acid nitrogen (0.59 — 0.80%) than the teas from subtropical and tropical areas (India, Indonesia, Vietnam) which showed 4.10 — 4.46% of total and 0.78 — 1.12% of amino acid nitrogen.

In all samples of tea author has determined following amino acids: cysteine, histidine, aspartic acid, glutamic acid, alanine, proline, oxyproline, tryptophane, methionine, phenylalanine and leucine.

### PIŚMIENICTWO

1. Böhmer A., Juckenack A., Tillmans J.: Handbuch der Lebensmittelchemie, J. Springer, Berlin 1934. — 2. Dąbrowski T.: Praca w druku, Roczniki PZH, Warszawa. — 3. Harler G. R.: The Culture and Marketing of Thea, Oxford University Press, London 1958. — 4. Kursanow A. L.: Biochimia czajin. proizw., 32, Sb. 1, 1935. — 5. Bokuczawa M. A., Popow W. P.: Dokł. ANSSSR, 145, 99, 1954. — 6. Shaw W. S., Jones.: Theotannin, Madras 1932. — 7. Woroncow W. E.: Biochimia czaja, Piszczepromizdat, Moskwa 1946. — 8. Serenkow G. P.: Sow. subtropiki, 22, 8, 1940. — 9. Bokuczawa M. A.: Biochimia czajin. proizw., 49, 3, 1937. — 10. Bokuczawa M. A., Szubert T. A.: idem, 90, 6, 1950.
11. Bokuczawa M. A.: Biochimia czaja i czajnego proizwodstwa, Moskwa 1958. — 12. Oparin A. J.: Biochimia czajin. proizw., 95, sb. 3, 1937. — 13. Bokuczawa M. A., Popow W. R.: Dokł. ANSSSR, 284, 114, 1957. — 14. Moore S., Stein W. H.: J. Biol. Chem., 367, 176, 1948. — 15. Niewiarowicz A.: Przemysł Spożywczy, 12, 501, 1955. — 16. Noworytko J., Sarnecka-Keller M.: Acta Biochem. Pol., 2, 91, 1955. — 17. Roland Ir. I. F., Gross A. M.: Anal. Chem. Soc., 4121, 71 1949. — 18. Giri K. V., Radha Krishnan A. N., Vaidyanathan C. S.: Nature, 1025, 170, 1952. — 19. Neurath H., Kenneth B.: The Proteins, Vol I, II, Akad. Press, New York 1953 — 1954.