

EKSTRAKCJA BIAŁEK Z MATERIAŁU ROŚLINNEGO ZA POMOCĄ DETERGENTÓW

STANISŁAW BURACZEWSKI, LUCYNA BURACZEWSKA

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN
w Jabłonie k. Warszawy
Dyrektor: prof. dr Jan Kielanowski

Poszukiwania sposobu pełnej ekstrakcji białek z materiału roślinnego są spowodowane m. in. potrzebami coraz dokładniejszej analizy ich wartości biologicznej, jak również próbami otrzymywania białkowych koncentratów roślinnych dla celów żywieniowych.

Wydajność ekstrakcji związków azotowych jest bardzo różna i zależy nie tylko od stosowanej metody, ale i od rodzaju i stanu materiału roślinnego (2, 6). Na ogół białka najłatwiej ekstrahowane są z młodych, niezdrewniałych tkanek roślinnych. Uprzednie poddawanie roślin procesom, które mogą powodować denaturację białka, jak np. suszenie, pogarsza wydajność ekstrakcji. Przegląd stosowanych metod ekstrakcji podają Chibnal (3), Taylor (8), Bondi (1), Pirie (6).

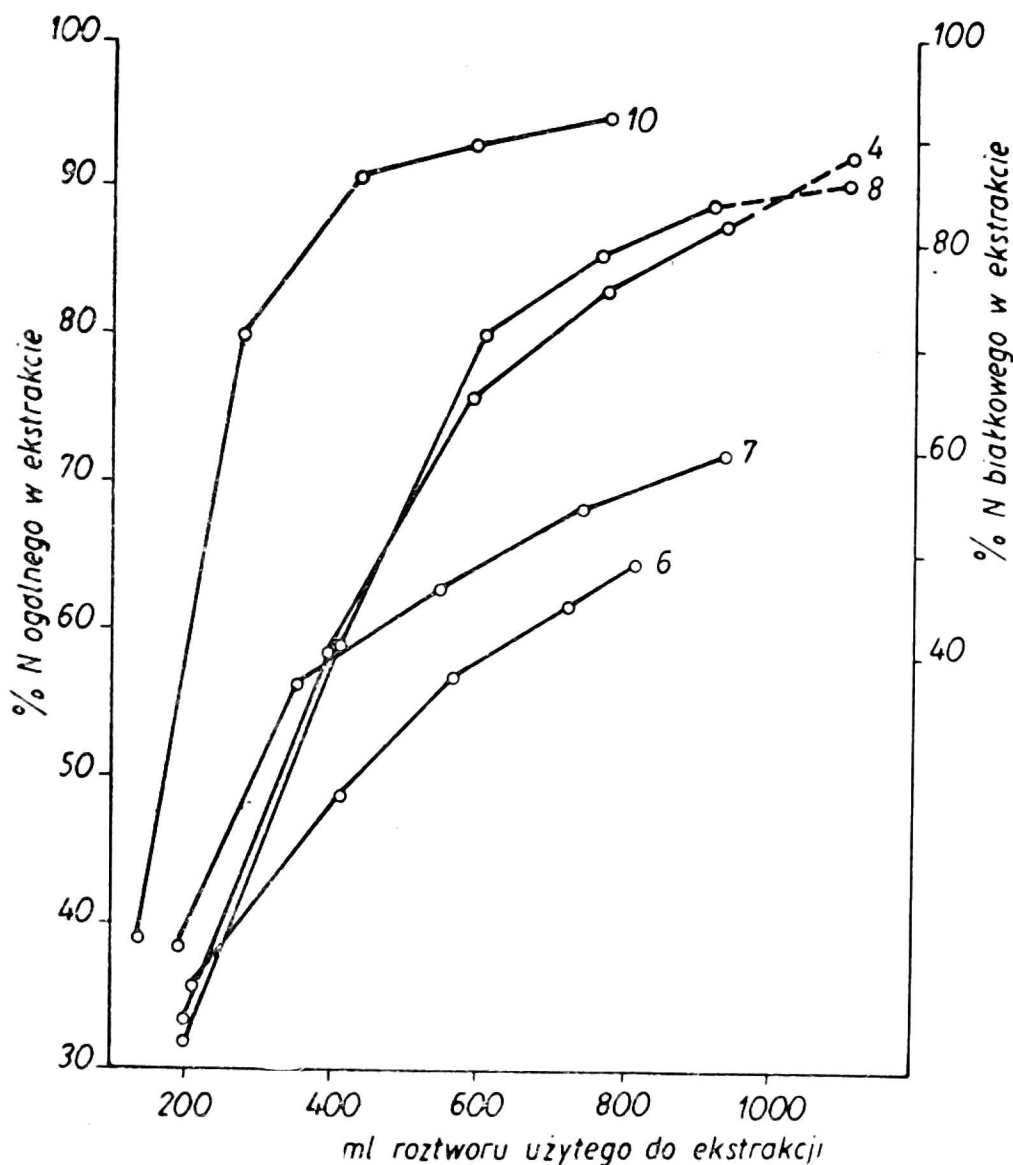
Festenstein (4) stosując detergenty Triton 100 i deoksycholan sodu do ekstrakcji białek z liści stwierdził, że zwiększają one ilość wyekstrahowanych białek, jeżeli traktuje się nimi pozostałość po uprzedniej ekstrakcji alkalicznej. Ekstrahował on 90—95% związków azotowych z liści tytoniu i fasoli. Wcześniej Crook stosował Calgon, który zwiększał ekstrakcję białek przy pH 8, lecz śluzowacenie włókna utrudniało oddzielenie białka.

Niniejsza praca przedstawia wyniki zastosowania do ekstrakcji białek z nadziemnych części roślin lucerny następujących detergentów: Sulfaolu 50, Sapogenu T-gel, Nekaliny, Teepolu oraz Mersonalu D.

Materiał i metody

Lucernę siewną zebrano 18. IX. 1961 r. w stadium początkowego okresu kwitnienia i po zważeniu przechowywano w temp. 14—18°C poniżej zera. Do ekstrakcji materiał mielono na młynku (robot kuchenny „Imme” — Typ B, prod. NRD), w pojemniku oziębianym suchym lodem. Otrzymaną mączkę wymieszano i przygotowano 25-gramowe naważki, które dalej przechowywano w zamrażarce.

Detergenty Teepol, prod. f-my Shell, oraz Mersolan f-my Wolfen otrzymano z Zakładu Detergentów Instytutu Chemii Ogólnej. Nekaliń S, Sulfapol 50 i Sapogen T-gel otrzymano z Łódzkich Zakładów Przemysłu Chemicznego. Teepol, Mersolan i Nekaliń użyto bezpośrednio do przygotowywania roztworów; Sulfapol 50 (zawartość substancji aktywnej — alkilobenzenosulfonianu sodu 45—50%) i Sapogen T-gel

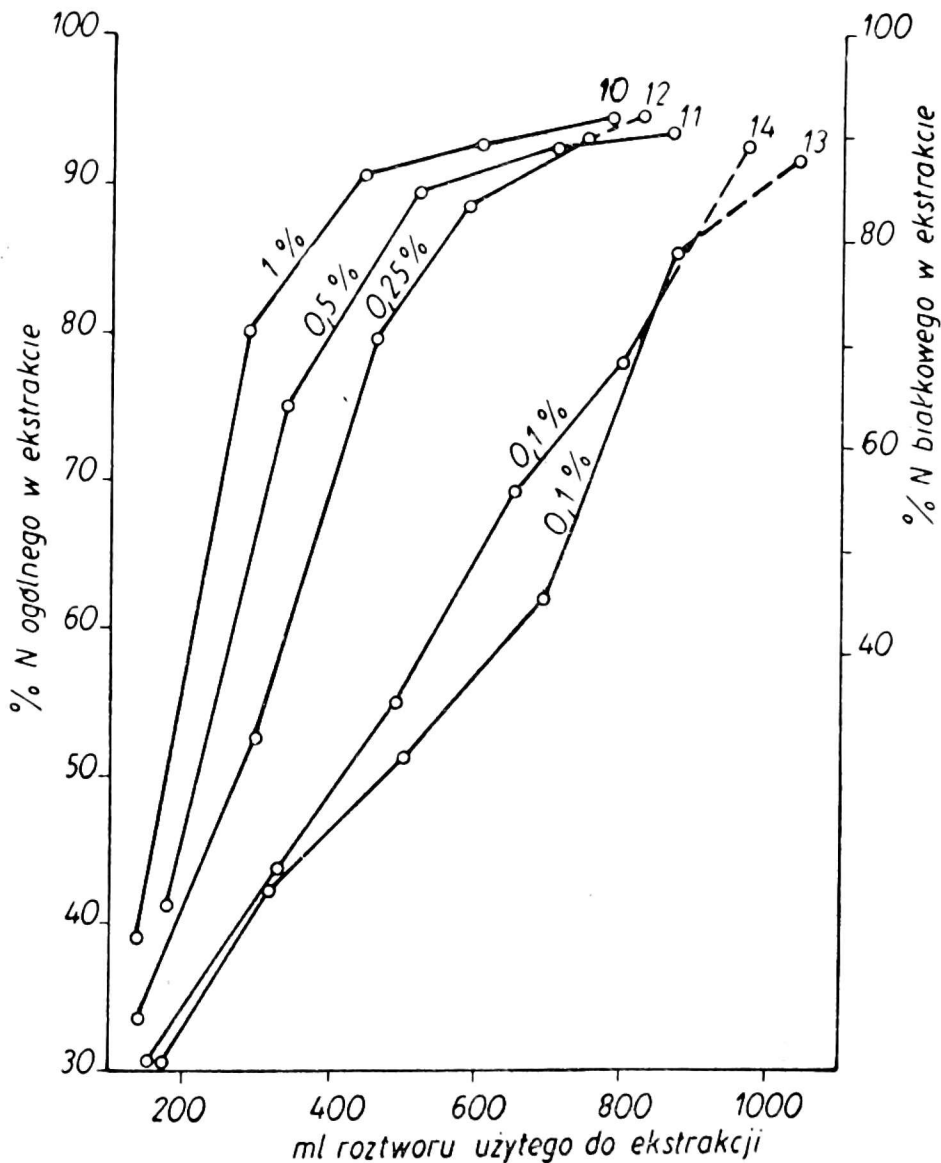


Rys. 1. Porównanie przebiegu ekstrakcji azotu z roślin lucerny roztworami: 10 — 1% Sapogenem, 8 — 1% Sulfapolem, 6 — 1% Nekaliń, 4 — 1% Teepolem, 7 — 1% Mersolanem. Numeracja krzywych odpowiada numerom ekstrakcji w tabeli

(zawartość substancji aktywnej — produktu kondensacji kwasu olejowego z metylotauryną ok. 20%) oczyszczono przez rozpuszczenie w etanolu i odwodnienie bezwodnym siarczanem sodu. Po odwirowaniu i odparowaniu preparaty były używane do przyrządzania roztworów.

Oznaczanie azotu wykonywano metodą jodometryczną wg Reifera i Tarnowskiej (7). Wytrącone białko oczyszczano wg Fowdena (5).

Przebieg ekstrakcji azotu. Próbkę 25-gramową zmielonej lucerny przenoszono do moździerza i rozcierano ok. 5 min. z dodatkiem 20—30 ml roztworu ekstrahującego. Następnie rozcier przenoszono



Rys. 2. Przebieg ekstrakcji azotu z roślin lucerny roztworami Sapogenu o stężeniu 0,1—1%. Numeracja krzywych odpowiada numerom ekstrakcji w tabeli

do 100 ml pojemnika homogenizatora typu MSE z dodatkiem 50—60 ml roztworu. Homogenizowano ok. 3 min. Homogenizat odwirowywano przy ok. 3500 obr/min. Ekstrakcję osadu powtarzano 9—11 razy używając każdorazowo 70—100 ml roztworu, z tym, że po 4 ekstrakcjach omijano rozcieranie w moździerzu. Ekstrakty łączono razem po 2, oznaczano pH i azot ogólny otrzymując 5—6 kolejnych wyników ekstrakcji.

Przed wytrąceniem białka wszystkie ekstrakty z próbki łączono, zakwaszono kwasem octowym do pH 4,1—4,5, a kwasem solnym do niższego pH, i ogrzewano na wrzącej łaźni wodnej do 70°C. Jeżeli białko

Tabela 1

Wyniki ekstrakcji związków azotowych z lucerny

Nr ekstrakcji	Roztwory ekstrahujące i ich pH	pH ekstraktów	N wyekstr. w % N ogólnego	Warunki strącania białka	Ilość N w preparacie białkowym w % N ogóln.	Zawartość azotu w preparacie białkowym w %
1	a) bufor boranowy 0,2 M, pH 9,0 — 600 ml	9,0	53,4	pH 4,5	19,3	11,4
	b) bufor boranowy 0,2 M, pH 9,0 — 1% Teepol — 250 ml	9,0	4,1	pH 4,5	białko nie wytrąciło się	
2	Wodorotlenek sodu 0,1%	9,4—11,9	60,7	pH 4,5	27,5	10,5
3	a) woda — 505 ml	6,0	40,7	pH 4,4	12,5	10,8
	b) Teepol 1%, pH 8,1 — 502 ml	6,9	30,8	pH 1,3 + 10% etanolu	29,0	10,2
4	Teepol 1%, pH 8,1 (0,2% NaOH)*	6,0—7,0	92,5	pH 4,5 + 20% etanolu	53,2	10,0
5	Teepol 1% w NaOH 0,005 N, pH 11,3 (0,2% NaOH)*	7,1—10,1	73,4	pH 4,5 + 50% etanolu	28,5	9,8
6	Nekalina 1%, pH 10,0	7,4—9,5	64,5	pH 2,0	29,8	10,2
7	Mersolan 1% w NaOH 0,01 N, pH 11,8	7,7—11,2	71,9	pH 1,4	33,4	9,8
8	Sulfapol 1%, pH 8,6 (0,2% NaOH)*	6,3—7,8	90,6	pH 4,5 + 25% acetonu	60,5	9,04
9	Sulfapol 0,1%	—	72,2	pH 4,5	31,3	10,5
10	Sapogen 1%, pH 8,7	6,2—8,3	94,5	pH 1,2 + 10% etanolu	35,1	9,7
11	Sapogen 0,5%, pH 8,3	6,4—7,8	93,2	pH 1,3	21,6	10,7
12	Sapogen 0,25%, pH 7,4 (0,2% NaOH)*	5,9—7,2	94,5	pH 3,3 + 30% etanolu	50,7	10,1
13	Sapogen 0,1%, pH 6,7 (0,2% NaOH)*	5,8—6,8	91,4	pH 4,1 pH 3,0	33,7 53,5	10,6 9,6
14	Sapogen 0,1% zalkalizowany ługiem do pH 8,85	5,8—7,7	92,5	pH 3,3	47,5	10,5

* NaOH stosowano do ostatniej ekstrakcji, pH ekstraktu 11,9—12,1

nie wytrącało się, dodawano 10—30% etanolu. Po ostudzeniu osad białkowy odwirowywano, oczyszczano, suszono w temperaturze pokojowej w eksykatorze i oznaczano azot.

Wyniki i dyskusja

Wykresy (rys. 1 i 2) przedstawiają krzywe, odpowiadające procentowej ilości wyekstrahowanych związków azotowych przez określone objętości roztworów.

Z przedstawionych danych wynika, że z użytych detergentów najaktywniejszym okazał się Sapogen w stężeniach 0,25—1% (tab. 1). Około 90% azotu ogólnego (powyżej 80% azotu białkowego) znajdowało się w pierwszych trzech ekstraktach połączonych (rys. 1), a ok. 95% po zakończeniu ekstrakcji. Mniejszą aktywność wykazują Sulfapol i Teepol (ok. 75—80% azotu ogólnego w pierwszych trzech połączonych ekstraktach). Przy zastosowaniu pozostałych detergentów, jak również buforu boranowego o pH 9,0, 0,1% wodorotlenku sodu, wody, ekstrahowano tylko ok. 60—70% azotu ogólnego.

Dodatkowe zalkalizowanie roztworów detergentów nie polepszało wyników ekstrakcji. Natomiast wydaje się, że dodatkowa końcowa ekstrakcja 0,1 lub 0,2% roztworem ługu wpływa na zwiększenie rozpuszczalności resztek związków azotowych.

Użyte przez nas detergenty w opisanych warunkach nie pozwoliły na pełne wytrącenie białek z ekstraktów (tab. 1). Stosując 1% stężenia detergentów, białka przy pH 4,5 (punkt izoelektryczny) nie wytrącały się wcale lub wypadały w nieznacznych ilościach. Dalsze zakwaszanie ekstraktów, jak również dodawanie etanolu znacznie zwiększało ilość strąconego białka. Obniżenie stężenia Sapogenu ułatwiało wytrącanie białek, ale przedłużało ekstrakcję; jednocześnie pogarszało nieznacznie wyniki ekstrakcji (rys. 2). Przy 0,1% stężeniu Sapogenu białko zaczynało wytrącać się już przy pH 4,1.

Zawartość azotu ogólnego w otrzymanych preparatach białkowych przy stosowaniu detergentów wahała się od około 9,6 do 10,8%. Pełniejsze wytrącenie białka z roztworu odpowiadało zazwyczaj jego mniejszej czystości.

Wyniki wskazują, że w porównaniu z innymi metodami stosowanie detergentów ułatwia ekstrakcję białek lucerny. Jednakże potrzebne są dalsze badania nad sposobem wytrącania i oczyszczania preparatów białkowych ekstrahowanych roztworami detergentów.

PIŚMIENNICTWO

1. Bondi A., Processed plant protein foodstuffs, New York, 43—66 (1958).
2. Byers M., J. Sci. Food Agric., 12, 20—30 (1961).
3. Chibnall A. C., Metabolizm białek w roślinie, PWRiL, Warszawa (1952).
4. Festenstein G. N., J. Sci. Food Agric., 12, 305—312 (1961).
5. Fowden L., Biochem. J., 50, 355 (1951).
6. Pirie N. W., Annual review of plant physiology, 10, 33—52 (1959).
7. Reifer I., Tarnowska K., Acta soc. bot. pol., 20, 739—744 (1950).
8. Taylor J. F., The proteins, cz. A, New York (1953).

С. Бурачевски, Л. Бурачевска

ЭКСТРАГИРОВАНИЕ БЕЛКОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА ПРИ ПОМОЩИ МОЮЩИХ СРЕДСТВ

Резюме

Проведены опыты с применением моющих средств при экстрагировании белков из люцерны, собранной в период зацветания и законсервированной в замороженном виде. Из примененных средств наиболее активным является Сапоген-Т-гель — конденсат олеиновой кислоты с метилтаурином. 0,1—1,0% его растворы при 10—12-кратной экстракции 25 г пробы извлекали около 92—94% общего азота в объеме растворителя до 1 л.

Затруднение осаждения белков из-за присутствия моющих средств, можно частично преодолеть путем повышения кислотности и добавления спирта. Выделенные белки содержали 9,0—10,7% азота.

PROTEIN EXTRACTION FROM PLANT MATERIAL USING DETERGENTS

Summary

Experiment was carried out on the use of detergents to extract the proteins from lucerne plants, harvested at the beginning of flowering and preserved by freezing. Among the detergent used Sapogen — Tgel (condensate of oleic acid and methyltaurine) was most active. By using 0.1—1.0% solutions of Sapogen and extracting 10 to 12 times to a final volume of the extract about 1 l, it was possible to obtain 92—94% of total nitrogen in the extract from 25 g samples (fresh plant basis) of lucerne.

The difficulty in the precipitation of proteins due to the presence of detergents in the plants extract was overcome to some extent by the lowering of pH and addition of ethanol. The isolated protein contained 9.0—10.7% of nitrogen.