

WITOLD ROGULSKI

*Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
— Akademia Rolnicza w Warszawie*

ZWIĄZKI AZOTOWE NIEBIAŁKOWE Z POEKSTRAKCYJNEJ ŚRUTY RZEPAKOWEJ

N-niebiałkowy (NPN) występuje w materiale biologicznym jako składnik wielu związków o różnorodnej budowie chemicznej i roli fizjologiczno-żywniowej.

Natura, rodzaj czy ilość poszczególnych form N-niebiałkowego mączek lub śrut nasion roślin oleistych nie jest jeszcze całkowicie poznana, dotyczy to szczególnie rzepaku.

Jedną z podstawowych trudności w całej analizie azotowych składników roślin jest problem wyizolowania z odpowiednią wydajnością frakcji NPN zawierającej cały (lub większość różnych form) N badanego materiału.

Dotychczas używano wiele metod, jednakże ciągle brak jest dokładnych informacji dotyczących wydajności tej frakcji. Ten fakt jest spowodowany dużym zróżnicowaniem materiału roślinnego a także zastosowanymi warunkami izolowania NPN.

Wszystkie najczęściej stosowane dotychczas metody izolowania NPN z materiału biologicznego można zasadniczo sprowadzić do dwóch sposobów lub dróg postępowania. Jeden z tych sposobów polega na bezpośredniej ekstrakcji materiału z odpowiednim rozpuszczalnikiem, natomiast drugi pośredni sposób jest dwustopniowy, w którym pierwszym etapem jest również ekstrakcja surowca najczęściej wodą lub rozcieńczonymi wodnymi roztworami alkaliów a następnie usunięcie wyekstrahowanych jednocześnie białek i innych makrocząsteczek poprzez ich wytrącenie za pomocą powszechnie znanych metod do tych celów przeznaczonych. Ta ostatnia droga postępowania jest według Bhattya i Finlaysona [3] dosyć szeroko używana, jednakże stężenia wytrącanych białek są sprawdzane także dość dowolnie, co może prowadzić do całkiem błędnych wyników izolowanego w ten sposób NPN.

Jednym z pierwszych badaczy, uważanych dzisiaj za prekursora izolowania z materiału biologicznego rozpuszczalnej frakcji N-niebiałkowego metodą pośrednią był Amerykanin Steward [52]. Ekstrahował on pocięte drobno skrawki bulw ziemniaka za pomocą wody przez okres 30-minutowego mieszania, a następnie uzyskany płyn oczyszczał od nierozpusz-

czalnej pozostałości przepuszczając go przez delikatny jedwab. Czysty i klarowny płyn szybko ogrzewał przez okres 10 minut w temperaturze 80°C celem wytrącenia białka.

W tej pośredniej metodzie wyodrębniania NPN z materiału biologicznego poza etapem ekstrakcji, ważnym zagadnieniem ilościowego pozyskania rozpuszczalnej frakcji N-niebiałkowego jest wspomniany wcześniej sposób wytrącania białka z otrzymanego wyciągu. Stosowano do tego celu wiele powszechnie znanych czynników wytrącających takich jak kwas trójchlorooctowy (TCA) do końcowego stężenia 4—15%, kwas wolframowy, kwas sulfosalicylowy (SSA), kwas octowy (HAc), koloidalne żelazo, różne rozpuszczalniki organiczne takie jak zimny aceton, względnie 5—10 × objętość zimnego etanolu (EtOH) do końcowego stężenia 70—80%, roztwory metali ciężkich w środowisku alkalicznym, wspomnianą wyżej koagulację na gorąco, doprowadzanie białka ekstraktu do jego punktu izoelektrycznego (PI) w którym wykazuje ono najmniejszą rozpuszczalność, czy wreszcie pozyskiwać można frakcję NPN w ogóle bez wytrącania białka na drodze wyczerpującej wielogodzinnej dializy uzyskanego ekstraktu [55] lub poprzez inne jeszcze sposoby wytrącania N-białkowego tutaj nie wymienione.

Kwas trójchlorooctowy jest jednym z powszechnie używanych czynników wytrącających białko. Polecane stężenia TCA do odbiałczania roztworów wynoszą od 3 do 5% [12], jednakże dużo wyższe stężenia tego odczynnika były praktycznie używane do rozdzielenia białka od frakcji N-rozpuszczalnego w ekstraktach nasion oleistych [1, 4, 15]. W tym przypadku stwierdzono, że wyższe stężenie TCA (niż to przeważnie polecane) wytrąca także więcej białek z tych ekstraktów w związku z tym autorzy tych prac sugerują dla praktycznych celów wybór odpowiedniego stężenia TCA, które będzie w miarę całkowicie wytrącało białka z badanego ekstraktu materiału biologicznego; będzie to równocześnie stężenie, przy którym rozpuszczalność białka ekstrahowanego surowca jest co najwyżej minimalna bądź żadna.

Izolowanie rozpuszczalnej frakcji NPN osiągnąć można drogą bezpośredniej bądź pośredniej ekstrakcji badanego materiału. W tych obydwu metodach ważnym czynnikiem jest wzór odpowiedniego rozpuszczalnika, który w optymalny sposób powinien ekstrahować większość różnych związków azotowych niebiałkowych.

Dotychczas do ekstrakcji NPN używano wielu różnych rozpuszczalników, poczynając od wody, poprzez rozcieńczone wodne roztwory kwasów, zasad i soli, jak też szereg rozpuszczalników organicznych stosowanych zarówno na zimno, w temperaturze pokojowej lub na gorąco [2, 5, 6, 9, 13, 50].

W badaniach nad otrzymywaniem NPN z materiału biologicznego

stosowano zarówno różne rozpuszczalniki jak też sposoby wytrącania białka i samej ekstrakcji.

Z przeglądu wielu prac dotyczących wyodrębniania frakcji NPN z różnego materiału biologicznego, prowadzonych szczególnie w USA [16, 61] i gdzie indziej [2, 39, 41] wynika, że od dawna i obecnie najczęściej używanym i uniwersalnym do tego celu rozpuszczalnikiem w metodzie bezpośredniej ekstrakcji jest 70—80% EtOH oraz w mniejszym stopniu 10—15% TCA [5, 7, 20, 22, 24, 25, 40, 43, 52, 54]. Oba te rozpuszczalniki jak również zastosowane warunki ekstrakcji badanego materiału a więc czas, temperatura, pH czy wreszcie sam sposób izolowania dostarczać mogą ekstraktów o nieco różnym składzie jakościowym, jak też różnej względnej wydajności izolowanej frakcji NPN czy białka [14, 18, 26, 46, 49].

Wspomniany wyżej sposób ekstrakcji dotyczy też ilości użytego rozpuszczalnika, co nie jest obojętne dla praktycznej strony izolowania NPN jak również liczby kolejnych ekstrakcji z jednym rozpuszczalnikiem dających opłacalną jeszcze zawartość ekstrahowanego N. Te warunki przeważnie ustala się w badaniach wstępnych.

Zarówno ilość rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji NPN jak też liczba kolejnych ekstrakcji jest różna i istnieje w tym przypadku stosunkowo duża dowolność postępowania, podyktowana najczęściej także względami natury praktycznej.

W aspekcie ilościowym dla zwiększenia względnej wydajności izolowanej frakcji NPN z materiału biologicznego warunki ekstrakcji obejmujące jej sposób czy rodzaj użytego rozpuszczalnika mają właściwie znaczenie podstawowe.

Przeważnie dąży się do tego, ażeby ekstrakcja była w miarę możliwości wyczerpująca i całkowita odnośnie otrzymywanych związków w ogóle a w przypadku charakterystyki ilościowej w szczególności. Z tego też względu 15% TCA sprawiać może pewne praktyczne trudności, gdyż służy on nie tylko do bezpośredniego izolowania NPN ale najczęściej także zachodzi potrzeba ilościowego oznaczenia w nim otrzymanych związków azotu.

Z metodyki oznaczeń różnych związków azotowych niebiałkowych w tym rozpuszczalniku, między innymi wolnych aminokwasów (aa) wynika, że TCA przeszkadza w tych oznaczeniach i powinien być z ekstraktu usunięty [6]. Jednakże Bhatti i Finlayson [5] stwierdzili, że usuwanie TCA z ekstraktu mączek nasion oleistych jest męczące i trudne ponieważ jest wtedy wymagane kilkakrotne przemywanie z wodą nasyconą eterem, a to z kolei prowadzić może do obniżenia zawartości określonego w ten sposób NPN. Z tych i innych względów już w 1946 roku Amery-

kanin Steward, zwracał uwagę na fakt, że wytrącanie białka z ekstraktów wodnych na drodze koagulacji przez ogrzewanie jest ogólnie przyjętą i korzystną metodą usuwania tego składnika, ponieważ unika się zanieczyszczeń ekstraktu innymi często interferującymi w przeprowadzanych analizach odczynnikami. Ten sam autor, jak też wielu innych wymienionych wcześniej badaczy wskazywało na stosunkowo dużą uniwersalność i łatwość pracy z 80% EtOH jako rozpuszczalnikiem, zarówno do samego izolowania NPN jak również późniejszych możliwości oznaczeń ilościowych poszczególnych rodzajów N-niebiałkowego.

Według niektórych danych [10, 11, 39, 53] 70—80% EtOH wyciąg z odtłuszczonego materiału roślinnego zawiera następujące związki azotowe: wolne aa, peptydy, amoniak, typowe amidy jak mocznik, asparaginę i glutaminę, różne zasady organiczne typu amin, azotany i azotyny, betainy, białka typu prolamin, alkaloidy, glukozydy, nityle [23] oraz inne nie wymienione tutaj związki zawierające azot.

Jedne z tych związków występują w nieco większych ilościach, inne natomiast w mniejszych. Ze względu na to, że w wyciągu tym ponadto znajdują się w dużej ilości związki należące do grupy węglowodanów wykazując podobną do nich rozpuszczalność, w związku z tym czyste ilościowe i-z zadowalającą wydajnością wydzielenie składników azotowych z otrzymanej frakcji NPN nastęrcza poważne trudności [10], natomiast można je z stosunkowo dużą dokładnością oznaczyć w tym rozpuszczalniku za pomocą szeregu różnych metod postępowania.

Rutkowski [48] podaje, że zawartość cukrowców w mączce rzepakowej wynosi przeciętnie do 38%. Głównymi składnikami tych związków są polisacharydy z niewielką ilością mono-, dwu- i trójcukrowców. Obecność nisko cząsteczkowych węglowodanów, ekstrahowanych z mączek nasion rzepaku za pomocą 80% EtOH wykazali także niedawno w swoich badaniach Theander i Aman [56]. Ci autorzy badali poziom nisko cząsteczkowych węglowodanów w mączkach uzyskanych z nasion 6 szwedzkich odmian rzepaku (*Brassica napus* i *Brassica campestris*). Pozbawione łuski nasiona rzepaku poddawano ogrzewaniu i odtłuszczeniu, a w dalszej kolejności mączki tych nasion były ekstrahowane wrzącym 80% EtOH pod chłodnicą zwrotną. Wykazano, że frakcja materiału rozpuszczalnego w gorącym 80% EtOH stanowi 30—37% suchej masy badanych mączek rzepaku. Po usunięciu z wyizolowanej w ten sposób „frakcji NPN” pewnej ilości materiału tłuszczo-podobnego przez ekstrakcję chloroformem, pozostałość była poddana rozdziałowi na kolumnie z wymienniczym jonowym na frakcje obojętną, zasadową i kwaśną. Stwierdzono, że frakcja obojętna zawiera głównie nisko cząsteczkowe węglowodany, które stanowiły ok. 14—17% suchej masy badanych mączek rzepaku, frakcja zasadowa otrzymana po rozdziale na wymienniczu jonowym sta-

nowiła około 1—2% ekstrahowanego materiału w stosunku do suchej masy zimowych odmian mączek rzepaku i zawiera głównie aminokwasy oraz frakcja kwaśna, która odpowiadała od 6—10% suchej masy tych zimowych odmian mączek rzepaku i zawierała głównie tioglikozydy ale także aminokwasy i produkty rozkładu sinapiny, tj. kwas sinapinowy i cholinę. Frakcja obojętna cukrów poddana dalszemu rozdzielaniu chromatograficznemu na kolumnie wypełnionej Sephadexem G-15 dostarczała 8 frakcji, których identyfikacja przeprowadzona na drodze chromatografii gazowo-cieczowej oraz bibułowej pozwoliła stwierdzić obecność 12 nisko cząsteczkowych cukrów z których dominującymi była sacharoza i stachioza oraz w mniejszych ilościach rafinoza, glukoza, fruktoza, galaktoza i inne cukry. Sacharoza i stachioza stanowiły w obojętnej frakcji węglowodanów ok. 6,5—7,5% w stosunku do suchej masy 6 badanych mączek rzepaku.

Ci sami autorzy badali pozostałość mączek zimowej odmiany rzepaku (*Brasica napus*) uzyskaną po uprzedniej ekstrakcji 80% EtOH. Theander i Aman [57] wykazali, że ta pozostałość wolnej od tłuszczu mączki, uzyskana z odłuskanych i ogrzewanych nasion rzepaku zawiera materiał białkowo-polisacharydowy. Materiał ten poddawano dalszemu rozdzielaniu na frakcje: obojętną, kwaśną i zasadową poprzez ekstrakcję wodną, buforem (EDTA, pH 5,6) oraz 10% wodnym roztworem NaOH. Stwierdzono, że nierozpuszczalna w 80% EtOH pozostałość badanych mączek rzepaku składa się głównie z obojętnych węglowodanów, kwasów uronowych, białka i substancji ligninopodobnych (tzw. „Klason-lignina”). Badania te wykazały, że frakcję obojętną tworzą neutralne węglowodany, które w tym materiale stanowią ok. 17% co korespondowało z ok. 12% suchej masy mączki. W materiale tym ponadto wykazano obecność około 3% kwasów uronowych odpowiadających substancjom pektynowym i we frakcji zasadowej ekstrahowanej 10% NaOH ok. 65% białka oraz około 2% tzw. „Klason-ligniny” składającej się z trzech rodzajów hemiceluloz w zależności od stopnia postępowania tj.: hemicelulozy otrzymanej poprzez zobojętnienie kwasem octowym alkalicznego ekstraktu mączki, wytrąconej 3 objętościami EtOH z tego ekstraktu oraz rozpuszczalnej hemicelulozy w tych 3 stosowanych objętościach EtOH. Pozostałość uzyskanego materiału po ekstrakcji 10% wodnym roztworem NaOH stanowiła celuloza, jako główny składnik polisacharydowy mączki rzepakowej. Analiza hydrolizatów obojętnej frakcji węglowodanów materiału polisacharydowego pozostałości mączki rzepakowej otrzymanej po uprzedniej ekstrakcji 80% EtOH, wykazała, że głównymi jej składnikami była arabinoza, glukoza i w mniejszym stopniu ksyloza oraz galaktoza, jak też ślady mannozy, ramnozy, fukozy. Wyniki tych badań ponadto sugerują, że niska zawartość arabinozy w osadzie hemiceluloz otrzymanych po ich

wytrąceniu 3 objętościami EtOH z alkalicznego ekstraktu pozostałości mączki rzepakowej jest spowodowana faktem ich wcześniejszego rozpuszczenia w 80% EtOH wraz z nisko cząsteczkowymi węglowodanami, tym bardziej, że i uzyskany z tego materiału etanolowy supernatant nie zawierał praktycznie arabinozy. Autorzy tych badań sądzą, że rozpuszczalny w wodzie arabinian i arabinogalaktan izolowany wcześniej przez Larma i wsp. [28] z mączek nasion rzepaku (*Brassica napus*) jest praktycznie w większości rozpuszczalny w 80% EtOH, jeśli ta ekstrakcja była przeprowadzona jako pierwsza, co miało miejsce w tych badaniach [29].

Dla ogólnej charakterystyki NPN badanego materiału ważne są także niektóre aspekty i problemy ilościowego określania różnych form NPN w wyizolowanej frakcji, wynikające zarówno z natury samego materiału jak też często z zastosowanej metody. W wyodrębnionej z materiału biologicznego frakcji NPN dla jej dalszej charakterystyki chemicznej, zarówno ilościowej jak i jakościowej czy następnie także oceny żywieniowej wymagana jest znajomość koncentracji poszczególnych rodzajów związków azotowych niebiałkowych.

Z różnych badań wynika, że ważnym ilościowo składnikiem frakcji NPN są wolne aminokwasy, praktycznie często utożsamiane z zawartością NPN w zależności od materiału z którego są izolowane [24].

Określenie zawartości wolnych aa w wyizolowanej z danego materiału frakcji NPN było do niedawna sprawą dosyć kłopotliwą. Jeszcze w roku 1954 Bisset używał do tego celu dwukierunkowej chromatografii bibułowej. Podczas ciągłych udoskonaleń metod chromatograficznych wprowadzono automatyczną technikę rozdziału tak złożonej mieszaniny aa na jonitach [38] od jej zapoczątkowania przez Moora i Steina [36].

Według Lazarusa [31] kiedy wolne aa są ekstrahowane z materiału roślinnego, wówczas jednocześnie zachodzi ekstrakcja cukrów, soli, lipidów, kwasów organicznych, barwników i związki te mogą interferować podczas chromatograficznego rozdziału aa. Interferencja ta jest szczególnie wyraźna w chromatografii bibułowej i cienkowarstwowej. W początkowych pracach nad tym zagadnieniem Moor i Stein [36] stwierdzili, że nieorganiczne sole nie wpływają na jonowymienną chromatografię kolumnową, jednakże ponowne naniesienie surowego ekstraktu roślinnego na kolumnę z wymiennicem jonowym może zakłócać rozdział aa poprzez interferencję z poliwalentnymi nieorganicznymi kationami, lipidami i silnie adsorbującymi się barwnikami. Dlatego też według Lazarusa [31] stopień wstępnego oczyszczania otrzymanego ekstraktu aa ma pewne znaczenie i powinien być uwzględniany.

Obecnie powszechną i wspólną metodą oczyszczania różnego rodzaju ekstraktów względnie płynów biologicznych jest adsorpcja a na krótkiej kolumnie z wymiennicem jonowym w formie kwaśnej (H^+). Aniony

i substancje obojętne włączając w to cukry i kwasy organiczne są wymyte z kolumny wodą, natomiast aa są następnie eluowane z niej roztworem zasady (0,2 n NaOH według Lazarusa [31]), rozcieńczonym wodnym roztworem amoniaku lub kwasu solnego.

Kationy metali nie są eluowane z kolumny na skutek ich silnego powinowactwa z centrum wymiennym jonitu. Podobnie niektóre barwniki i lipidy są także zatrzymywane przez matrix jonitu.

Wang [60] używał we wstępnym oczyszczaniu ekstraktu roślinnego do eluowania aa 1 n i 6 n HCl.

W 1972 roku Nowakowski i Byers [40] badając zawartość NPN w tym także wolnych aa w niektórych trawach stwierdzili, że 2 n NH_4OH jako eluent z kolumny zawierającej Dowex 50—x4 zarówno w formie H^+ i NH_4^+ dawał zadowalające ilości odzyskanych aa kwaśnych i obojętnych ale odzyskanie aa zasadowych było niecałkowite. Ci badacze stosując za Wangiem 1 n lub 6 n HCl jako eluent aa również otrzymali niepowtarzalne wyniki, dodatkowo HCl powoduje według nich hydrolizę glutaminy i asparaginy, dostarczając równoważnych ilości amoniaku, który we właściwym rozdziale aa może z kolei zanieczyszczać stosowane bufony, zmieniając ich pojemność i zakłócając rozdział. Ponadto według Nowakowskiego HCl powoduje uwalnianie niektórych nieorganicznych kationów mogących ujemnie wpływać na właściwy rozdział aa co niezależnie od tego zostało wcześniej wykazane przez Larsena (1969). Oprócz tego Nowakowski i Byers [40] zwracali uwagę na fakt występowania pewnych trudności w oznaczaniu amidów (glutaminy i asparaginy) podczas zwykłego rozdziału aa na kolumnie z wymiennicem jonowym, której temperatura wynosząca ok. 60°C powoduje rozkład tych amidów, a szczególnie glutaminy z konsekwencją wzrostu amoniaku i tworzeniem kwasu 2-pirolidyno-5 karboksylowego zamiast typowej reakcji z ninhydryną. Podobnie do tych spostrzeżeń Thompson i wsp. [58] również nie polecali wstępnego oczyszczania 70—80% EtOH ekstraktu ze względu na możliwość obniżenia zawartości kwasu glutaminowego na drodze jego estryfikacji z etanolem.

Ponieważ metody wstępnego oczyszczania etanolowego ekstraktu aa nie były ilościowe Nowakowski i Byers [40] zdecydowali się na omięcie tego etapu usuwania substancji interferujących na korzyść innego rozwiązania. Znaną objętość etanolowego ekstraktu odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem w temp. poniżej 40°C , otrzymaną pozostałość rozpuszczano w wodzie a następnie ekstrahowano z 3 \times objętością chloroformu celem usunięcia barwników, lipidów oraz innych interferujących substancji podczas właściwego rozdziału aa. Faza wodna po jej odparowaniu pod próżnią służyła już bezpośrednio do oznaczeń aa. Z tego krótkiego opisu niektórych tylko aspektów ilościowego oznaczania NPN

można sądzić, że poziom wolnych aa może podlegać pewnym wahaniom spowodowanym chociażby sposobem ich określania.

Ponadto według Kapoora [24] różnice w wartościach wolnych aa powinny także uwzględniać aa otrzymane z amidów jak też peptydów, które nie są wytrącane przez 15% TCA, a które w zależności od materiału z jakiego pochodzą mogą stanowić ważny ilościowo składnik określanego NPN. W przypadku rzepaku ten aspekt wydaje się być szczególnie interesujący, tym bardziej jeśli połączyć go z naturą i charakterem białka tego materiału.

Wielu badaczy donosi, że nasiona rzepaku posiadają białko o bardzo skomplikowanym składzie, charakteryzujące się różną masą cząsteczkową i różnymi punktami izoelektrycznymi. Białko rzepaku posiada punkty izoelektryczne (PI) w szerokim zakresie pH wynoszącym od pH 4—11 [33, 42]. Stąd też białka rzepaku można podzielić na białka kwaśne, obojętne i zasadowe, a w zależności od masy cząsteczkowej na wysoko, średnio i nisko cząsteczkowe. Gilberg i Törnell (1976) podają, że białka kwaśne i obojętne, które mają PI w zakresie pH 4—8 mogą być w zależności od masy cząsteczkowej podzielone na 3 grupy o masie cząsteczkowej odpowiednio: 320 000, 150 000, 75 000.

W roku 1968 Bhatta i wsp. [3] izolowali z nasion rzepaku obojętne białko typu „globulin” o współczynniku sedymentacji 12 S i stwierdzili, że stanowi ono wraz z innymi nisko-cząsteczkowym białkiem (1,7 S) o charakterze zasadowym około 25—30% wszystkich obecnych w ekstrakcie mączki rzepakowej białek, natomiast według tych badaczy stwierdzona także w tym ekstrakcie znakomita większość innych pozostałych białek posiada niższą masę cząsteczkową, prawdopodobnie w zakresie 10 000—25 000 [4].

W następnej pracy ci autorzy [21] charakteryzując 12 S „globuliny” stwierdzili, że jest to konglomerat zawierający jedno duże głównie obojętne białko i fragment glikoproteidowy. Jak wykazano ten agregat białka przy wartościach pH poniżej 3,5 dysocjuje do podfrakcji polipeptydowych z których główna podfrakcja glikoproteidowa ma współczynnik określony analizie sedymentacyjnej 2,7 S. W ten sposób wykazano, że zmiany w wartościach pH powodują także istotne zmiany w strukturze 12 S globulin. Stwierdzono, że 12 S globuliny są glikoproteidami zawierającymi galaktozaminę, glukozę i arabinozę, prawdopodobnie konwalencyjnie związane z białkami. Zauważono także, że tylko część, to jest około 25% białek nasion rzepaku jest rozpuszczalna w wodzie i część ta odpowiada glikoproteidom usuniętym w ten sposób z dużego agregatu 12 S „globulin”.

Niskocząsteczkowe zasadowe białka z nasion rzepaku izolował w 1972 roku w Szwecji Lönnerdal i Janson [33].

W surowym ekstrakcie (pH 7) po jego chromatograficznym rozdziale otrzymano 2 piki z których niższy zawierał nisko cząsteczkowe białka. Dalszy rozdział tych nisko cząsteczkowych białek dostarczał 4 nowych podfrakcji z których każda była białkiem składającym się z dwóch łańcuchów polipeptydowych mających Ala względnie Pro jako aminokwasy N-końcowe. Dwie z tych czterech podfrakcji dających się izolować w czystej formie poddano dalszej analizie, która wykazała, że są to białka o masie cząsteczkowej rzędu ok. 13 623 i dające w wyniku ich rozczepienia z chlorowodorkiem guanidyny 2 polipeptydy o masie cząsteczkowej ok. 9 106 i 4 517. Analiza aa wykazała, że większość lub cały kwas glutaminowy i asparaginowy (Glu, Asp) występują w formie ich amidów jako glutamina i asparagina (Glu-NH₂, Asp-NH₂), dając przez to zasadowy charakter tych białek, o pI w pH ok. 11.

Nowsze prace Lönnerdala i wsp. [34] dotyczące charakterystyki wyizolowanego białka na drodze alkalicznej ekstrakcji mączki rzepakowej wykazały, że białka te po ich rozdziale na Sephadexie G-200 dają 3 główne piki z których dwa pierwsze odpowiadają białkom o masie cząsteczkowej ponad 250 000 i ok. 150 000 odpowiednio, co jest zgodne z danymi Bhattya [3] natomiast 3 obszerny pik koresponduje do 2 grup białek, jednej mającej masę cząsteczkową rzędu 50—75 000 i drugiej o masie ok. 13 000 [33].

Według tych badań [34] białka wysoko cząsteczkowe ekstrahowane przy udziale alkaliów i wytrącone HCl (pH 6,6) mają pI określone na drodze ogniskowania izoelektrycznego w pH 4—6 co jest zgodne z ich kwasowym charakterem wykazanym wcześniej przez Ohlsona i Seepa [42], natomiast średnio cząsteczkowe białka wykazują najmniejszą rozpuszczalność (pI) w zakresie pH 5—8. Bhattya [4] sugerował, że śruta z nasion rzepaku zawiera 10—12 i prawdopodobnie więcej białek. Lönnerdal i wsp. [34] podają obecność przynajmniej 19 pasm białek w analizie ogniskowania izoelektrycznego (pI) w zakresie pH 4,5—10.

Quinn i wsp. [46] dla śruty rzepakowej (*Brassica campestris*) donoszą o obecności ponad 30 różnych gatunków białek, których większość ma pI w obojętnym zakresie pH.

Bhattya [4] sugerował, że ponieważ znakomita większość białek (poza 25—30% obojętnych białek typu „globulin” 12 S) śruty rzepakowej posiada niską masę cząsteczkową, prawdopodobnie rzędu 10 000—25 000 to dlatego białka te w przeciwieństwie do innych białek są względnie rozpuszczalne w 5% TCA (k.s.), a także z dużą trudnością wytrącają się przy wyższych stężeniach tego odczynnika. Ten autor sądzi, że śruta rzepakowa zawiera tym samym więcej N-rozpuszczalnego w TCA (tzw. „TCA-soluble-N”) niż śruty innych nasion oleistych, słonecznikowa lub sojowa (sojowa ok. 5% wg [27]).

Gilberg i wsp. [18] badali rozpuszczalność i stopień wytrącania związków azotu i fosforu (N i P) z odtłuszczonych ogrzewanych i nieogrzewanych mączek nasion rzepaku. Wykazano, że krzywe rozpuszczalności N i P mają obraz złożony w zależności od pH ekstrakcji. Autorzy tych badań tłumaczą ten fakt bardzo skomplikowanym składem białka rzepaku, mającego różną masę cząsteczkową jak też punkty izoelektryczne, pH 4—11.

Stwierdzono, że kwas fitynowy może reagować zarówno z jonami metali (Mg^{++} , Ca^{++} , K^+ , Na^+) jak też z białkami i w zależności od pH tworzyć rozpuszczalne względnie nierozpuszczalne z nimi kompleksy. Kwas fitynowy z jonami metali dawał na przykład rozpuszczalne kompleksy przy niższych wartościach pH niż 4,5—6,5, natomiast obniżenie rozpuszczalności tego związku obserwowano w zakresie pH 4,5—8,0, co autorzy tłumaczą wytworzeniem nierozpuszczalnych kompleksów soli Ca i Mg kwasu fitynowego w tym przedziale pH. Kwas fitynowy dawał rozpuszczalne kompleksy z białkami przy pH 8—10, natomiast nierozpuszczalne w pH ok. 2,0.

Porównanie krzywych rozpuszczalności N obydwu rodzajów badanych mączek rzepaku, ogrzewanej i nieogrzewanej pozwoliło stwierdzić że przebieg rozpuszczalności ma podobny charakter i wykazuje wartości ekstremalne przy pH ok. 11.

Rzeczywiste obniżenie rozpuszczalności N ogrzewanej śruty rzepakowej w porównaniu do nieogrzewanej było bardzo małe przy pH ok. 11, natomiast przy innych wartościach testowanego pH te różnice wystąpiły zdecydowanie wyraźniej. Najmniejszą rozpuszczalność N (pI) dla obydwu rodzajów badanych śrut rzepaku stwierdzono w pH 4,0, wynosiła ona dla śruty ogrzewanej nieco ponad 20% w stosunku do N — ogólnego, zaś dla mączki nieogrzewanej odpowiednio około 40%. Innymi słowy można sądzić, że maksymalne wytrącenie białek rzepaku w pH 4,0 (pI) powinno pozostawiać jeszcze w badanym ekstrakcie śruty rzepakowej ogrzewanej nieco ponad 20% N-rozpuszczalnego i ok. 40% tego składnika w formie rozpuszczalnej w przypadku śruty nieogrzewanej. To w pewnym stopniu byłoby zgodne z sugestiami Bhattya [4] wskazującymi na fakt, że śruta rzepakowa w porównaniu z innymi śrutami z nasion roślin oleistych takimi jak słonecznikowa lub sojowa zawiera dużo więcej N-rozpuszczalnego — TCA.

Te wyniki rozpuszczalności N badanych śrut rzepaku (w pH 4,0) okazały się prawie zgodne ze stopniem wytrącania białka z alkalicznych ekstraktów otrzymanych przy pH 11,1 przez tych samych badaczy. Oni wykazali, że maksymalna wydajność wytrącania białka kwasem solnym w pH 6,6 jest raczej niska i w efekcie pozostawia jeszcze w supernatancie więcej niż 50% rozpuszczalnego N, natomiast podjęta dodatkowo pró-

ba zwiększenia wydajności białka w drugim stopniu wytrącania przez doprowadzenie pH ekstraktu do ok. 4,0 (pI) wykazała, że maksymalny wzrost wynosi w tym przypadku tylko ok. 18% rozpuszczalnego N. Badania wykazały, że maksymalna wydajność N w dwustopniowej procedurze wytrącania białka wynosi ok. 63%. Ten wynik wskazuje na fakt, że pojedyncza, a nawet dwukrotna precypitacja kwaśna alkalicznych ekstraktów mączek lub śrut z nasion rzepaku daje osady białka raczej o względnie niskiej wydajności N, pozostawiając jeszcze stosunkowo sporo N-rozpuszczalnego, niewytrącalnego za pomocą kwasów, który w tym przypadku kształtuje się na poziomie ok. 37% w dwustopniowej procedurze wytrącania białka. Podobne wyniki otrzymali poprzednio w różnych krajach inni badacze. Pokorny i wsp. [44] podają ok. 49% jako maksymalną wydajność odzyskania rozpuszczonych białek w alkalicznym ekstrakcie śruty rzepakowej. Girault [19] wskazywał, że maksymalna wydajność wytrącania białka z podobnych ekstraktów wynosi 56%.

Z krzywych rozpuszczalności N różnych nasion oleistych [26, 35, 45, 46, 51, 62] wynika, że nasiona rzepaku są jedynymi mającymi tak wysoką proporcjonalnie zawartość rozpuszczalnego-N prawie w całym zakresie pH. Ten unikalny i niekorzystny z praktycznego punktu widzenia charakter zachowania się związków azotowych nasion rzepaku w całym zakresie pH potwierdzają w swoich badaniach różni autorzy.

Rutkowski i Korolczuk [46] badając niektóre aspekty izolowania białka z nasion rzepaku podają, że związki azotowe niekoagulujące przy pH 3,8 stanowią 25—40% N-ogólnego mączki rzepakowej w zależności od stosowanego szerokiego zakresu pH ekstrakcji.

Z badań Sosulskiego i wsp. [51] wynika, że N-niekoagulujący przy pH ok. 4 stanowi nieco ponad 30—32% N-og. badanych różnych odmian nasion rzepaku. Quinn i Jones [46] badając rozpuszczalność N śrut uzyskanych z nasion rzepaku (*Brassica campestris* L., odmiany Echo) wykazali, że prawie 44% N-ogólnego tych śrut występuje w formie rozpuszczalnej jako „frakcja niewytrącająca lub niekoagulująca-N” w całym badanym zakresie pH 3,5—10,0. W innym doświadczeniu tych badaczy stwierdzono, że blisko 9% N tej samej badanej śruty było rozpuszczalne w 15% TCA a 11% dializowało poprzez błony (Spectrapor-Fisher Scientific Co) o wielkości por dla masy cząsteczkowej rzędu od 6 000—8 000. W ten sposób wykazano, że ca czwarta część N-rozpuszczalnego przy pH 3,5—4,0 jest N-niebiałkowym (NPN) zawierającym także peptydy.

Na podstawie literatury dotyczącej tak izolowania jak też charakterystyki chemicznej NPN różnego materiału biologicznego można stwierdzić, że związki azotowe niebiałkowe były dotychczas przedmiotem badań dosyć różnego materiału [2, 7, 8, 32, 39, 40, 41, 47, 50, 52, 55].

Z tych badań wynika, że zawartość NPN w materiale biologicznym

jest zróżnicowana zarówno pod względem jego ilości jak też w sensie jakości związanej z występowaniem różnego rodzaju form N-niebiałkowego. Można też stwierdzić, że poza nielicznymi wyjątkami stanowi on przeważnie niewielką część N-ogólnego, sięgając granic w zależności od pochodzenia od kilku do kilkunastu procent.

Christianson [11] wykazał, że stanowił on w 80% EtOH ekstrakcie ziarna kukurydzy tylko ok. 1,45% N-og. tego materiału. Nowakowski [40] podawał, że NPN ekstrahowany z liści rajgrasu włoskiego stanowi około 15% N-og. Gately [17] wykazał, że NPN w ziarnie jęczmienia wynosił 5—8% N-og. w zależności od plonu jęczmienia i zawartości białka og. w ziarnie.

Kapoor [24] podaje, że w przeciwieństwie do zbóż NPN w kłębach ziemniaków może dochodzić od 40 do 60% N-og. w zależności od genotypu a 80% EtOH dostarczał ok. 47% N-og. ziemniaków.

Krober i wsp. [27] wykazali, że N-białkowy dojrzałych nasion soi stanowi ok. 95% N-og., natomiast pozostałe 5% to NPN. Van Etten i wsp. (1965) wyliczyli, że ok. 12% N-og. w mączkach z nasion kapusty abisyńskiej stanowił NPN.

Badania dotyczące strony jakościowej NPN związane z występowaniem różnych form N-niebiałkowego w materiale biologicznym ekstrahowanym 80% EtOH omówione wcześniej wykazały, że w skład związków azotowych niebiałkowych wchodzi w największej mierze wolne aa, amidy, amoniak, rozpuszczalne peptydy, azotany, różne aminozwiązki oraz w mniejszym stopniu inne składniki azotowe.

Wszystkie te oraz inne nie wymienione tutaj z nazwy związki azotowe niebiałkowe określane mianem NPN z żywieniowego punktu widzenia mogą mieć pewną wartość odżywczą ale też wpływać ujemnie na zdrowie i wyniki produkcyjne zwierząt, co było przedmiotem dalszych badań [47].

LITERATURA

1. Becker H.C., Milner R.T., Nagel R.H.: *Cereal Chem.*, 17, 447, 1940 — cyt. za Bhatti, 1972.
2. Bell P.M.: *J. Sci. Fd. Agric.*, 14, 133—137, 1963.
3. Bhatti R.S., Mc Kenzi S.L., Finlayson A.J.: *Can. J. Bioch.*, 46, 1191—1197, 1968.
4. Bhatti R.S.: *Cereal Chem.*, 49(6), 729—731, 1972.
5. Bhatti R.S., Finlayson A.J.: *Cereal Chem.*, 50, 329—336, 1973.
6. Bisset S.K.: *Bioch. J.*, 58, 225—227, 1954.
7. Bolton J., Nowakowski T.Z., Lazarus W.: *J. Sci. Fd. Agric.*, 27(6), 553—560, 1976.
8. Chase L.E., i in.: *J. Dairy Sci.*, 59(1), 170—174, 1976.

9. Cherry J.H.: *Molecular Biology of Plants*. Columbia Univ. Press. NY. pp. 162—163, 1973.
10. Chmielewska J.: *Metody badania składników roślin*. PWRiL, Warszawa, str. 98, 1955.
11. Christianson D.D., i in.: *Anal. Chem.*, 32(7), 874—878, 1960.
12. Dawson R.M.C., i in.: *Data for biochemical research*. Clarendon Press. Oxford. p. 622, 1969 — cyt. za Bhattya, 1972.
13. Elmore C.D., Leffler H.R.: *Crop. Sci.*, 16(6), 867—871, 1976.
14. El Nockrastry A.S., Mukherjee K.D., Mangold H.K.: *J. Agric. Fd. Chem.*, 25(1), 193—197, 1977.
15. Finlayson A.J., Christ C.M.: *Can. J. Bot.*, 49, 1733—1742, 1971.
16. Frey K.J.: *Cereal Chem.*, 28, 506—509, 1951.
17. Gately T.F.: *J. Agric. Sci.*, 87(2), 243—249, 1976.
18. Gilberg L., Törnell B.: *J. Food Sci.*, 41(5), 1063—1069, 1976.
19. Girault A.: *J. Sci. Fd. Agric.*, 24, 509—518, 1973.
20. Glass L., Hedrick T.J.: *J. Dairy Sci.*, 60(2), 185—189, 1977.
21. Goding L.A., Bhattya R.S., Finlayson A.J.: *Can. J. Bioch.*, 48, 1096—1103, 1970.
22. Hood L.L., Brunner J.R.: *J. Food Sci.* 40(6), 1152—1155, 1975.
23. Josefsson E.: *J. Sci. Fd. Agric.*, 26, 1299—1310, 1975.
24. Kapoor A.C., Desborough S.L., Li P.H.: *Potato Res.*, 18, 582—587, 1975.
25. Knuckles B.E., i in.: *J. Agric. Fd. Chem.*, 23(2), 209—212, 1975.
26. Korolczuk J., Rutkowski A.: *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 48, 398—399, 1971.
27. Krober O.A., Gibbons S.J.: *J. Agric. Fd. Chem.*, 10, 57—59, 1962.
28. Larm O., Theander O., Aman P.: *Acta Chem. Scand.*, B. 29, 1011—1014, 1975.
29. Larm O., Theander O., Aman P.: *Acta Chem. Scand.*, B. 30, 627—630, 1976.
30. Larsen P.O.: *Risö Rep. № 189*. Danish Atomic Energy Commission. Risö. Denmark. p. 37, 1969 — cyt. za Nowakowski, 1972.
31. Lazarus W.: *J. Chromat.*, 87, 169—178, 1973.
32. Lee J.W.: *J. Sci. Fd. Agric.*, 13, 320—324, 1962.
33. Lönnerdal B., Janson J.C.: *Bioch. Biophys. Acta*, 278, 175—183, 1972.
34. Lönnerdal B., Gilberg L., Törnell B.: *J. Food Sci.*, 42(1), 75—78, 1977.
35. Mattil K.F.: *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 48, 477—480, 1971.
36. Moor S., Stein W.H.: *J. Biol. Chem.* 192, 663—681, 1951.
37. Moor S., Stein W.H.: *J. Biol. Chem.*, 211, 893—906, 1954.
38. Moor S., Spackman D.H., Stein W.H.: *Anal. Chem.*, 30, 1185—1190, 1958.
39. Nowakowski T.Z.: *J. Agric. Sci.*, 59, 387—392, 1962.
40. Nowakowski T.Z., Byers M.: *J. Sci. Fd. Agric.*, 23, 1313—1333, 1972.
41. Nowakowski T.Z., Bolton J., Lazarus W.: *J. Sci. Fd. Agric.* 26, 1483—1492, 1975.
42. Ohlson R., Seep R.: *Proteins and other Cruciferes*. In: „Food Protein Sources” Ed. Pierie N.W. Cambridge University Press, 1975 — cyt. za Lönnerdal, 1977.
43. Peterson D.M., Dale S., Smith D.B.: *Crop. Sci.*, 16(1), 67—71, 1976.

44. Pokorny J., Vodicka M., Zalud J.: *Food Technol.*, 7(2), 167, 1963 — cyt. za Gilberg, 1976.
45. Pokorny J., Sefr Z.: *Food Technol.*, 8, 234, 1964 — cyt. za Quinn, 1976.
46. Quinn J.R., Jones J.D.: *Can. Inst. Fd Sci. Technol. J.*, 9(1), 47—51, 1976.
47. Rogulski W.: *Praca doktorska SGGW-AR*, Warszawa, 1981.
48. Rutkowski A.: *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 48, 863—868, 1971.
49. Rutkowski A., Korolczuk J.: *Proceedings 4-th Internationaler Rapskongress, Giessen, Germany 4—8.VI.1974*, 637—649, 1975.
50. Seifer A.: *Anal. Bioch.*, 40, 412—423, 1971.
51. Sosulski F.W., Bakal A.: *Can. Inst. Food Technol. J.*, 2(1), 28—32, 1969.
52. Steward F.C., Street H.E.: *Plant. Physiol.*, 21, 155—193, 1946.
53. Steward F.C., Thompson J.F.: *Plant Physiol.*, 1, 233—264, 1950.
54. Steward F.C., Durzan D.J.: *Metabolism of nitrogenous compounds. In: Plant Physiol.: A. Treatise, IV. A. ed. by F.C. Steward. Academic Press. N.Y., 1965* — cyt. za Bhatti, 1973.
55. Synge R.L.M.: *Mioch. J.*, 49, 642—650, 1951.
56. Theander O., Aman P.: *Swedish. J. agric. Res.*, 6, 81—85, 1976.
57. Theander O., Aman P.: *Swedish. J. agric. Res.*, 7, 69—77, 1977.
58. Thompson J.F., Morris C.J., Gering R.K.: *Anal. Chem.*, 31, 1028—1031, 1959.
59. Van Etten C.H., i in.: *J. Agric. Fd. Chem.*, 13, 24—26, 1965.
60. Wang-D.: *Nature*, 186, 326—327, 1960.
61. Wiggans S.C., Frey K.J.: *Cereal Chem.*, 35, 235—239, 1958.
62. Wolf W.J.: *J. Agric. Fd. Chem.*, 18(6), 969—976, 1970.