

Jan Dobrowolski, Aleksandra Andruszewska

SAPONINY W ZMARZŁYCH BURAKACH CUKROWYCH

Z Katedry Biochemii

Kierownik: prof. dr Jan Dobrowolski

Wstęp

Zbiory buraków cukrowych w kampanii 1966 r. na skutek gwałtownych zmian temperatury w poważnej części uległy zepsuciu.

W grudniu kiedy procesy rozkładowe stwierdzono jedynie w warstwach powierzchniowych buraków, a duże partie surowca już się nie nadawały do przerobu na cukier powstał projekt zużytkowania nadpsutej masy buraczanej na paszę dla bydła.

Zagadnieniem wartości pokarmowej zmarzłych buraków zajął się profesor S. Seidler - Kierownik Katedry Żywienia Zwierząt Wyższej Szkoły Rolniczej w Szczecinie.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń na myszach (wyniki nie zostały opublikowane) Seidler zakwestionował przydatność surowej masy buraczanej na paszę ze względu na jej znaczne toksyczne własności.

Z punktu widzenia biochemii istotnym było wyjaśnić jakie związki trujące powstały na skutek szybkiego zamrażania i rozmrażania buraków składowanych w otwartych kopcach. Wstępne analizy wykazały, iż nie są to szkodliwe aminy gdyż, nie stwierdzono ich nagromadzenia. Proces rozkładu niewielkiej ilości białek zawartych w burakach nie osiągnął jeszcze tego stadium. Mogły to być wysoce trujące saponiny. Celowość zbadania buraków na zawartość saponin, o tyle była uzasadniona, że związek ten w wyższej temperaturze ulega rozkładowi, a zatem po stwierdzeniu zwiększonej ilości saponin uzyskuje się motywację do zalecenia przerobu buraków na susz, który już nie miałby własności trujących. W ten sposób przemysł przynajmniej częściowo uchroniłby się od milionowych strat spowodowanych niekorzystnymi warunkami klimatycznymi.

Teoretyczne wiadomości

Saponiny są to glikozydy o złożonej budowie, tworzą w wodzie koloidowe roztwory, obniżające napięcie powierzchniowe, co powoduje pienienie się cieczy. Są one szeroko rozpowszechnione w przyrodzie.

Na skutek hemolitycznego działania saponiny należą do silnych trucizn, szczególnie czułe na ten związek są ryby [2], stąd nierzadkie są wypadki

zatrucia ryb po spuszczeniu przez cukrownię do rzeki ścieków podużytecznych.

W burakach cukrowych może być zawarte do 0,3% saponin, gromadzą się one przeważnie w warstwie powierzchniowej [3]. Saponiny i sapogeniny można oznaczyć chromatograficznie za pomocą kwasu trójchlorooctowego lub roztworu trójchlorku antymonu w chloroformie nasyconym wodą. Plamy fluoryzują w nadfiolecie. Po wywołaniu plam aldehydami (najlepiej cynamonowym) plamy obserwuje się w świetle widzialnym. Do rozdzielania saponin stosuje się układy z wodą w charakterze fazy nieruchomej. Wśród roztworów umożliwiających dobry rozdział wyróżniają się: n- butanol-kwas octowy-woda (4:1:5) oraz układy zawierające alkohole C_4 , C_5 z dodatkiem chloroformu względnie benzenu nasyconych wodą [4].

Chociaż hemolityczny sposób oznaczania saponin jest mniej czuły od chemicznego - w przypadku szybkiej chromatografii cienkowarstwowej zastosowanie metody hemolitycznej w pracy jest uzasadnione, tym bardziej, że chromatogram w pewnym sensie daje ilościowo ujęty obraz toksyczności saponin.

Metodyka badań

Analizę soków buraczanych na saponiny przeprowadzono metodą chromatografii cienkowarstwowej, wykorzystując ich właściwości hemolityczne [5].

Warunki oznaczania. Nośnikiem był żel kwasu krzemowego o ziarnistości $\approx 0,09$ mm. Dla przygotowania 5 płytek (19,5 x 17 cm) rozpuszczono w 60 ml wody 26 g żelu i 4 g gipsu.

Układ: izopropanol - woda - kwas mrówkowy (70:24:6).

Mikropipetka o wartości podziałki 5 mikrolitrów.

Przygotowanie roztworu detekcyjnego. 4,5 g żelatyny rozpuszczono w 100 ml 0,9% NaCl i ogrzewano na łaźni wodnej przez 30 minut. Po ostudzeniu koloidu do 45°C dolewano 6 ml krwi bydlęcej odwołknięonej, dokładnie mieszając roztwór do uzyskania jednorodnej masy.

Tok doświadczenia. Baterie płytek z naniesionymi roztworami umieszczano w statywie, który ustawiano w hermetycznie zamykanej komorze zanurzając w roztworze rozdzielającym dolny brzeg żelu na 0,5 cm. Czas rozdzielania od 4 do 5 godzin. Po wyjęciu z komory, płytki suszono na powietrzu przez 12 godzin.

Na poziomo ułożone płytki z dorobionymi z tektury burtami nalewano roztworu detekcyjnego (wywoływacza) starając się uzyskać jak najcieńszą warstwę równomiernie rozprowadzoną po całej płytce.

Płytki pozostawiano na przeciąg 24 godzin. W tym czasie saponiny przedyfundują z żelu do warstewki żelatyny z krwią, powodując hemolizę krwi, co manifestuje się białą plamą na ciemnym tle płytki. Wielkość plamy z pewnymi poprawkami jest proporcjonalna do ilości saponin w danym miejscu na płytce.

Przyrządzanie wyciągów

a) Dwie odważki po 20 g krajanki buraczanej mieszano z kwarcowym piaskiem do uzyskania jednorodnej miazgi. Jedną próbkę poddano ekstrakcji

wodnej, drugą alkoholowej. Próbki ogrzewano w kolbie z chłodnicą zwrotną.

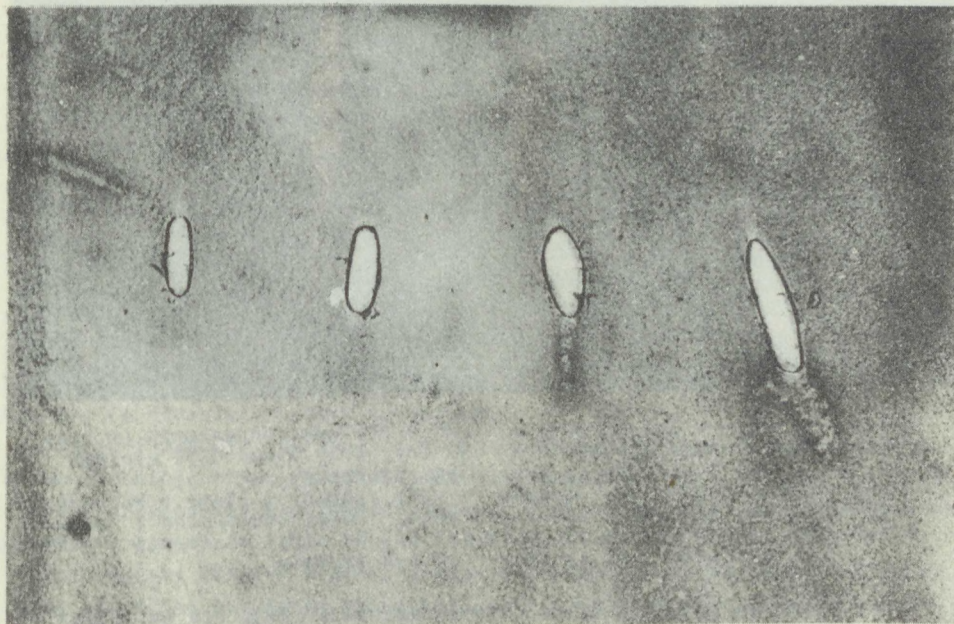
b) Sok buraczany naturalny, 50 g krajanki buraczanej homogenizowano w aparacie, po odwirowaniu uzyskiwano 18 mililitrów soku ($\approx 36\%$).

c) Badano również sok dyfuzyjny pobrany z cukrowni jednocześnie z krajanką buraczaną.

Wyniki i omówienia

Po wykonaniu kilkudziesięciu próbnych chromatogramów roztwory wzorcowe saponiny (0,5%) i badane soki, rozcieńczano w takim stosunku aby przy tej samej liczbie naniesień, stężenia porównywanych roztworów standardowego i badanego były zbliżone, a w konsekwencji tego plamy niewiele różniły się swoją wielkością. Takie postępowanie wraz z zachowaniem jednakowych warunków oznaczania podniosło dokładność metody, która na ogół jest obciążona błędem sięgającym 20%.

Ilościowej oceny plam dokonano planimetrycznie.

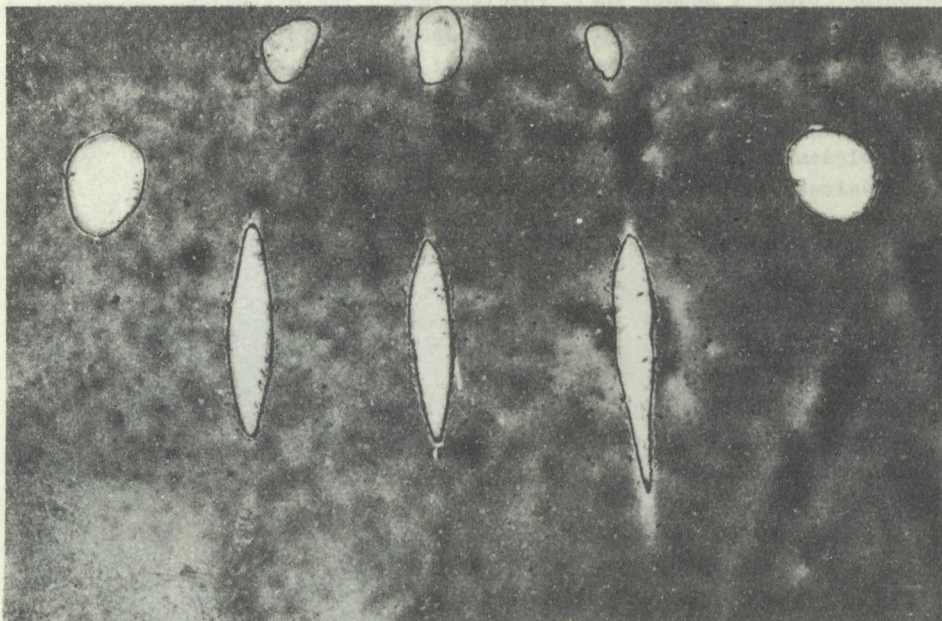


Ryc.1. Saponiny w naturalnym soku buraczanym (z lewa na prawo: plamy z naniesieniami soku: 2,4, 6,8 - jedno naniesienie 5 μ l).

Chromatogram czystego soku z buraków (ryc.1) dowodzi, że mierzenie powierzchni plam w tym przypadku dawało zadowalające wyniki, gdyż wielkość plam dosyć miarowo wzrasta wraz ze wzrostem objętości naniesionego soku, jak uwidacznia to tabelka.

| Liczba naniesień pipetą soku | Powierzchnia plamy w cm^2 |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| 2 | 0,29 |
| 4 | 0,45 |
| 6 | 0,62 |
| 8 | 0,85 |

Obliczona średnia zawartość saponin w naturalnym soku: 0,16%. Na ryc.2 przedstawiono chromatogram saponin w wyciągu alkoholowym z krajanki buraczanej.



Ryc.2. Saponiny w alkoholowym wyciągu z krajanki buraczanej (z prawa na lewo: wzorec saponin 0,5% roztwór, trzy plamy 0,5% wyciągu saponin, oraz plama wzorcowa)

Plamy wzorca są skupione okrągłe (czysty roztwór), plamy soku badanego wydłużone na skutek obecności dużej ilości składników w soku, z tego też powodu różnią się wartości R_f . Na linii startowej trzy mniejsze jest to druga frakcja saponin

Powierzchnia skrajnych plam wzorcowych niewiele różni się od trzech środkowych plam soku badanego.

($1,315 \text{ cm}^2 - 1,300 \text{ cm}^2$). Zawartość saponin w wyciągu 0,49%. Zwracają uwagę plamy hemolityczne w punktach startowych. Mogą to być sapogeniny. W każdym razie obydwie rozdzielone frakcje działają hemolitycznie, a sumaryczna zawartość tego czynnika w ekstrakcie wobec tego wzrasta do 0,57%.

Wodne wyciągi z buraków były około 50% uboższe w saponiny i odpowiadały zawartości saponin w soku dyfuzyjnym czyli 0,25%. Również w soku dyfuzyjnym saponiny dzielą się na dwie frakcje (ryc.3).

W tabelce zestawiono wyniki chromatograficznej analizy saponin w sokach buraczanych.

| | Zawartość saponin w procentach |
|-------------------|-----------------------------------|
| Sok naturalny | 0,16 ± 0,04 |
| Wyciąg alkoholowy | 0,49 ± 0,10 |
| Sok dyfuzyjny | 0,25 ± 0,05 |

Rozpuszczalnikiem najbardziej skutecznie ekstrahującym saponiny z buraków jest alkohol. Dane tabelki są zgodne ze znanym faktem, że do soku dyfuzyjnego z krajanki przechodzi tylko około 40% saponin, reszta pozostaje w wysłodkach.

Bardzo wysoka zawartość saponin w krajance buraczanej, (a może i innego składnika hemolizującego, który powstał w wyniku procesów gnilnych) jest argumentem, przemawiającym za dyskwalifikacją surowej krajanki jako paszy dla bydła.

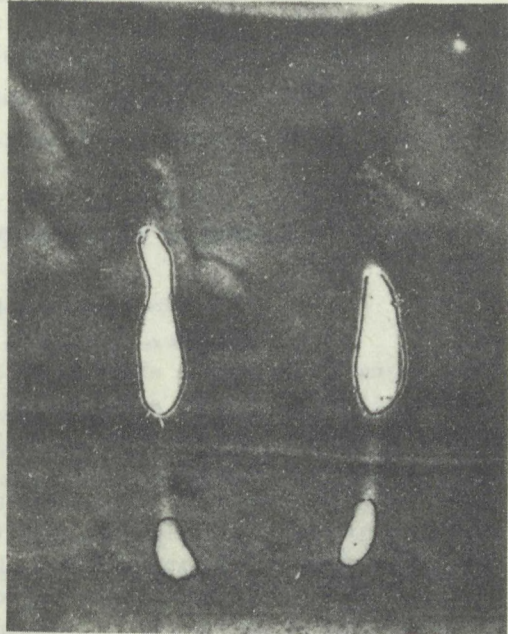
Duże nagromadzenie się związków powierzchniowo czynnych musiało odegrać istotną i niekorzystną rolę w zespole czynników, które zakłócały normalny proces technologiczny produkcji cukru [1,2] w tym stopniu, że niektóre cukrownie dysponujące wyjątkowo złym surowcem musiały wcześniej zakończyć (a właściwie przerwać) kampanię.

Należy zaznaczyć, że buraki po wykopkach nie były badane na saponiny, zatem pozostaje otwartym pytanie czy do akumulacji tego związku w jakimś stopniu przyczyniły się również warunki glebowo-klimatyczne w czasie wegetacji - uprawy.

Jako dalszy wniosek z pracy wysuwa się postulat dokonywania analiz buraków nie tylko na główne składniki, lecz również na zawartość różnych substancji swoistych, które mogą mieć wpływ na technologię cukru.

L i t e r a t u r a

- [1] D o b r o w o l s k i J., K y b e r T.: Sacharydy w zmarzłych burakach cukrowych. Szczecin 1967. Szczecińskie Towarzystwo Naukowe.
- [2] F i e s e r L.F., F i e s e r M.: Chemia Organiczna. Warszawa 1958



Ryc.3. Saponiny w dyfuzyjnym soku (z cukrowni). Z prawa na lewo: I plama; 2 naniesienia, II plama; 4 naniesienia

- [3] G o ł o w i n P.W., G e r a s i m e n k o A.A.: Chimija i tehnologija swiekłosacharnogo proizwodstwa. Kijew 1964.
- [4] H a i s I.M., M a č e k K.: Papirova Chromatografie. Praha 1959.
- [5] S t a l E.: Dunnschicht - Chromatographie. Berlin 1962.

SAPONINES IN FREEZED WHITE BEETS

S u m m a r y

Freezed and partly rotten white beets caused serious disturbances in the technological process of sugar during the beet campaign in 1965/66. They have not been of use as fodder either. Beets were examined with reference to poisonous saponin content. For analysis the thin-layer chromatography method was applied. Silica acid gel in the system: isopropanol - water - formic acid (70:24:6) was used to separate the saponines. The developing solution consisting of animal blood suspended in gelatine was layered on a plate. The quantity of saponines was determined from the size of blood stains chemolysed by saponines which diffused from the plate to the defecting layer.

Juices and extracts of white beets have shown the quantity of saponines highly exceeding the norm, namely: natural juice 0,16%, diffusive juice 0,25% and alcohol extract 0,49%.

In conclusion a postulate may be put forward of carrying analyses of white beets also on the content of surface active components.

Prof.dr Jan Dobrowolski
Katedra Biochemii WSR
Szczecin, ul.Słowackiego 17
Polska-Poland