

BADANIE BIAŁEK GLUTENU PRZY POMOCY ELEKTROFOREZY NA ŻELU I CHROMATOGRAFII MOLEKULARNO-SITOWEJ

E. KAMIŃSKI

Katedra Technologii Rolnej WSR Poznań

Przez dłuższy czas utrzymywał się pogląd, że gluten składa się z dwóch typów białek tj. gliadyny i gluteniny, które uważano za białka jednorodne. Nie przydawano natomiast większej roli białkom rozpuszczalnym typu albumin i globulin, a niektórzy autorzy uważali je w glutenie za zbędne.

Z drugiej strony przedmiotem dyskusyjnym pozostawały właściwości fizyczne glutenu otrzymywanego z mąki bliskich do siebie pod względem genetycznym odmian pszenicy lub z mąki frakcjonowanej powietrzem.

Dopiero w ostatnich latach zastosowanie nowoczesnych metod w badaniach białek zbóż, jak np. różnego rodzaju elektroforezy, immunoelektroforezy, sączenia molekularnego na żelu, analizy przy pomocy ultrawirówek itd. wniosło duży wkład w poznanie białek zbóż i składu glutenu.

Surowiec i metody badań

Do badań brano mąkę z pszenicy twardej i mąkę z pszenicy miękkiej. Ekstrakcje białek z mąki przeprowadzano sukcesywnie przy pomocy następujących rozpuszczalników:

- 1) woda destylowana,
- 2) 0,2 m roztwór NaCl zbuforowany do pH 7,
- 3) 70% etanol,
- 4) 0,05 n roztwór kwasu octowego.

Ekstrakcję przeprowadzano każdym z wyżej wymienionych rozpuszczalników 3-krotnie w homogenizatorze. Stosunek mąki do rozpuszczalników wynosił za każdym razem jak 20 : 150, czas ekstrakcji wynosił 5 min. Po ekstrakcji, płyn wirowano 30 min przy obrotach 2000/MIN. Klawrowne roztwory liofilizowano lub zagęszczano przy pomocy Carbowaksu.

Zawartość azotu w ekstraktach oznaczano metodą Kjeldahla. Współczynnik przeliczeniowy używano 5,7.

Gluten otrzymywano dwojakiego rodzaju:

a) gluten normalny otrzymywano przez wmywanie ręcznie zarobionego ciasta z 30 g mąki wodą destylowaną;

b) gluten zmodyfikowany otrzymywano z mąki z której wyekstrahowano białko rozpuszczalne w wodzie i białka rozpuszczalne w roztworze soli.

Gluten normalny i gluten zmodyfikowany rozpuszczano w rozcieńczonym kwasie octowym lub buforze mleczanu glinu o pH 3,2 i nominalnej sile jonowej 0,05. Ten sam bufor używano również do elektroforezy białek na żelu skrobiowym.

Koncentracja białka w roztworze używanym do elektroforezy wynosiła od 5 do 8%.

Dla inaktywowania amylazy, do roztworów białek dodawano około 10 mg thiomersalu ($C_2H_5 Hg S C_6H_4COONa$) lub inaktywowano przez ogrzewanie w gotującej się wodzie w czasie 10 sek.

Elektroforetyczny rozdział białek przeprowadzono według metody Smithiesa (20) w modyfikacji Elton, Ewart (5). Napięcie prądu na żelu wynosiło 140 V, czas elektroforezy wynosił 4—5 godz. Do wybarwienia białek na żelu używano 0,007% roztworu Nigrosiny w 2% kw. trójchlorooctowym. Z otrzymanych elektroforogramów robiono zdjęcia i rysunki. Przy sporządzaniu rysunków zachowywano te same odległości między frakcjami jak i na elektroforogramie. Filtrację białek glutenowych, rozpuszczanych w N/100 CH_3COOH , przeprowadzano na żelu dekstranowym. Do filtracji używano sephadex G-100 oraz następujące rozpuszczalniki: woda; N/50 CH_3COOH ; N/50 NH_4OH . Gęstość optyczną zebranych frakcji oznaczano na spektrofotometrze przy długości fali 275 m μ . Fizyczne właściwości glutenu, rozciągliwość właściwą, badano według metody Kozminej (13).

W y n i k i b a d a ń

1. Zawartość azotu w ekstraktach białkowych. Nizej przedstawione dane odnośnie zawartości azotu i białka w poszczególnych ekstraktach z mąki o wyciągu 60% z pszenicy twardej (tabela 1).

Zawartość białka w mące wynosiła 15,4%.

Ilość wyekstrahowanego białka przy pomocy 4 różnych rozpuszczalników wynosiła 13,36% co stanowi 86,7% od białka ogólnego.

2. Analiza ekstraktów białkowych przy pomocy elektroforezy na żelu skrobiowym. Wyniki przedstawiono na rys. 1.

Tab. 1

Zawartość azotu i białka w poszczególnych ekstraktach z mąki pszenicy twardej

Ekstrakty wodne	Zawartość	
	azotu %	białka %
Ekstrakt 1	0,31	1,77
Ekstrakt 2	0,12	0,68
Ekstrakt 3	0,08	0,46
suma	0,51	2,91
Ekstrakty roztworem soli (0,2 m NaCl)		
Ekstrakt 1	0,15	0,85
Ekstrakt 2	0,10	0,57
Ekstrakt 3	0,07	0,39
	0,32	1,81
Ekstrakty alkoholowe (70% etanol)		
Ekstrakt 1	0,805	4,59
Ekstrakt 2	0,142	0,81
Ekstrakt 3	0,071	0,41
	1,018	5,81
Ekstrakty kwasowe (0,05 n kw. octowy)		
Ekstrakt 1	0,284	1,62
Ekstrakt 2	0,213	1,21
	0,497	2,83

Białka rozpuszczalne w wodzie rozdzielono w polu elektrycznym na żelu skrobiowym na 22 frakcje; białka rozpuszczalne w roztworze soli na 23 frakcje; białka rozpuszczalne w 70% etanolu na 6 frakcji o większym stężeniu, 4 frakcje o mniejszym stężeniu i ślady innych frakcji białek. Podobne frakcje otrzymano przy elektroforezie białek rozpuszczalnych w 0,05n kw. octowym. Ekstrakty białkowe jak widać z elektroforogramów różnią się nie tylko ilością frakcji lecz również rozmieszczeniem tych frakcji w polu elektrycznym.

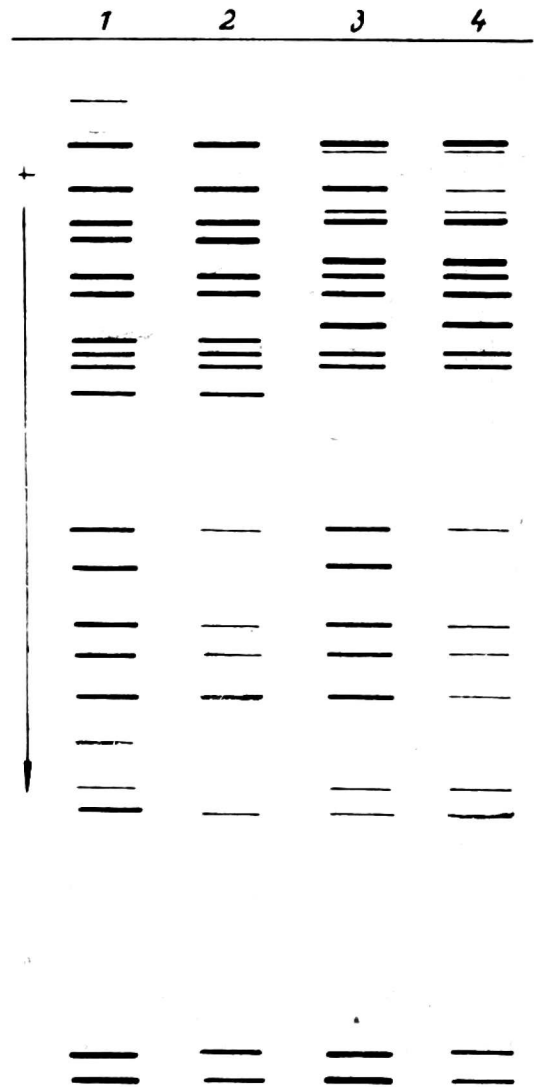
3. Analiza białek glutenowych przy pomocy elektroforezy na żelu skrobiowym. Wyniki analizy przedstawiono na rys. 2.

Elektroforogramy 1 i 2 przedstawiają frakcje białek glutenowych z mąki pszenicy twardej: 1 — gluten normalny, 2 — gluten zmodyfikowany tj. po ekstrakcji z mąki białek rozpuszczalnych w wodzie i kwasie octowym. Elektroforogramy 3 i 4 przedstawiają frakcje białek glutenowych i pszenicy miękkiej: 3 — gluten normalny, 4 — gluten zmodyfikowany.

Gluten normalny zawiera wszystkie frakcje odpowiadające frakcjom białek rozpuszczalnych w alkoholu i kw. octowym oraz niektóre frakcje odpowiadające frakcjom białek rozpuszczalnych w wodzie i w roztworach soli. Gluten zmodyfikowany posiada wszystkie frakcje odpowiadające frakcjom rozpuszczalnym w alkoholu i roztworze kwasu octowego, natomiast zawiera mniej frakcji rozpuszczalnych w wodzie i roztworze soli.



Rys. 1. Frakcje białek z mąki pszenicy twardej: 1 — frakcje rozpuszczalne w wodzie, 2 — frakcje rozpuszczalne w 0,2 m NaCl, 3 — frakcje rozpuszczalne w 70% C₂H₅OH, 4 — frakcje rozpuszczalne w 0,05 n CH₃COOH



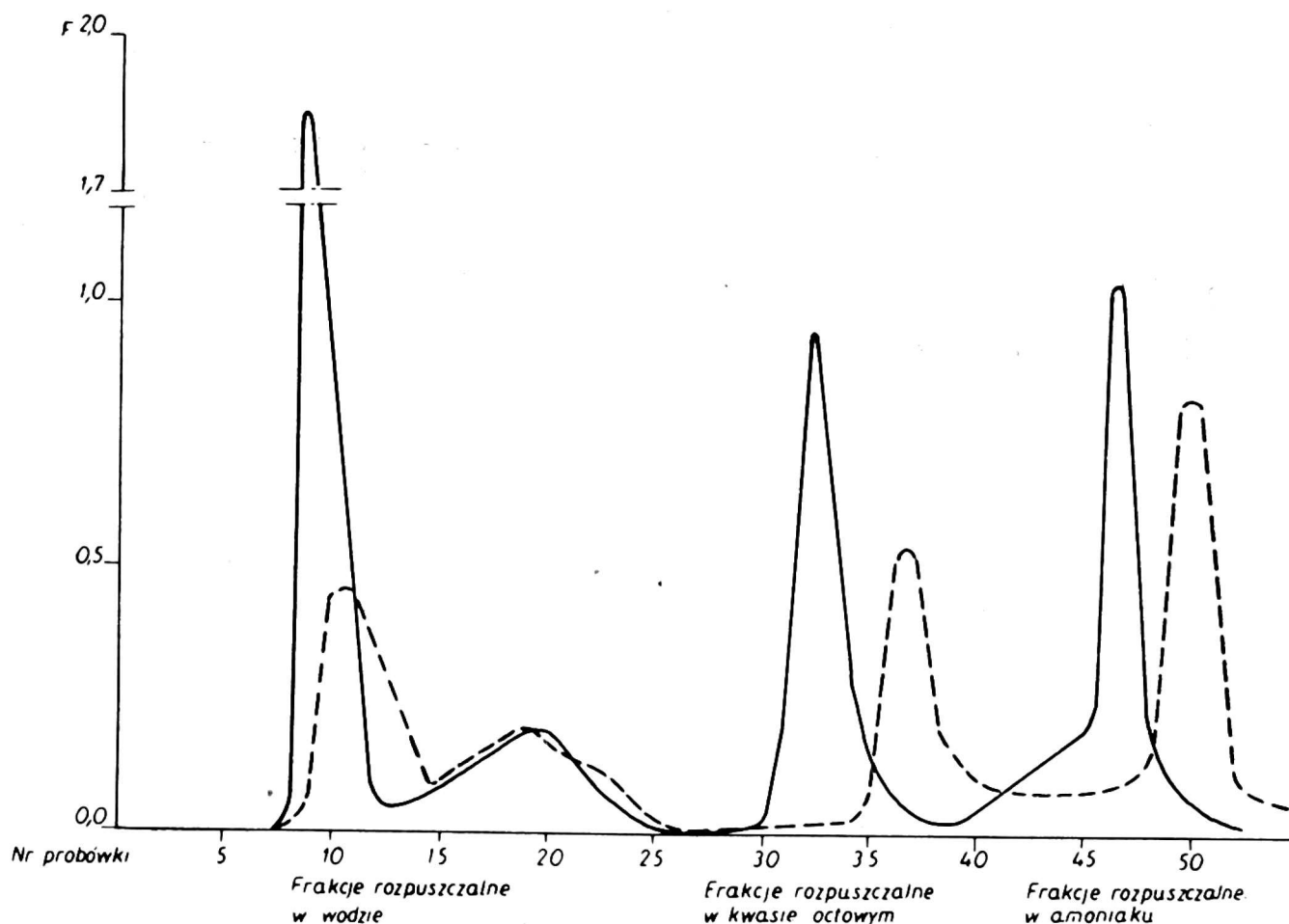
Rys. 2. Frakcje białek glutenowych rozpuszczalnych w buforze mleczanu glinu: 1 — gluten normalny z pszenicy twardej, 2 — gluten zmodyfikowany, 3 — gluten normalny z pszenicy miękkiej 4 — gluten zmodyfikowany

4. Analiza białek glutenowych przy pomocy chromatografii molekularno-sitowej. Do analizy wzięto gluten normalny i gluten zmodyfikowany. Gluten zmodyfikowany otrzymano z tej samej mąki lecz uprzednio wyekstrahowano z niej w homo-

genizatorze białka rozpuszczalne w wodzie i roztworach soli. Wyniki analizy przedstawiono graficznie na rys. 3.

Otrzymano 4 stożki zarówno dla jednego jak i dla drugiego glutenu. Pierwsze dwa stożki odpowiadają białku rozpuszczalnemu w wodzie, trzeci w kwasie octowym i czwarty w amoniaku.

Stożki te różnią się jak widać wysokością, tj. zawartością białka, w poszczególnych frakcjach, zwłaszcza w frakcji pierwszej.



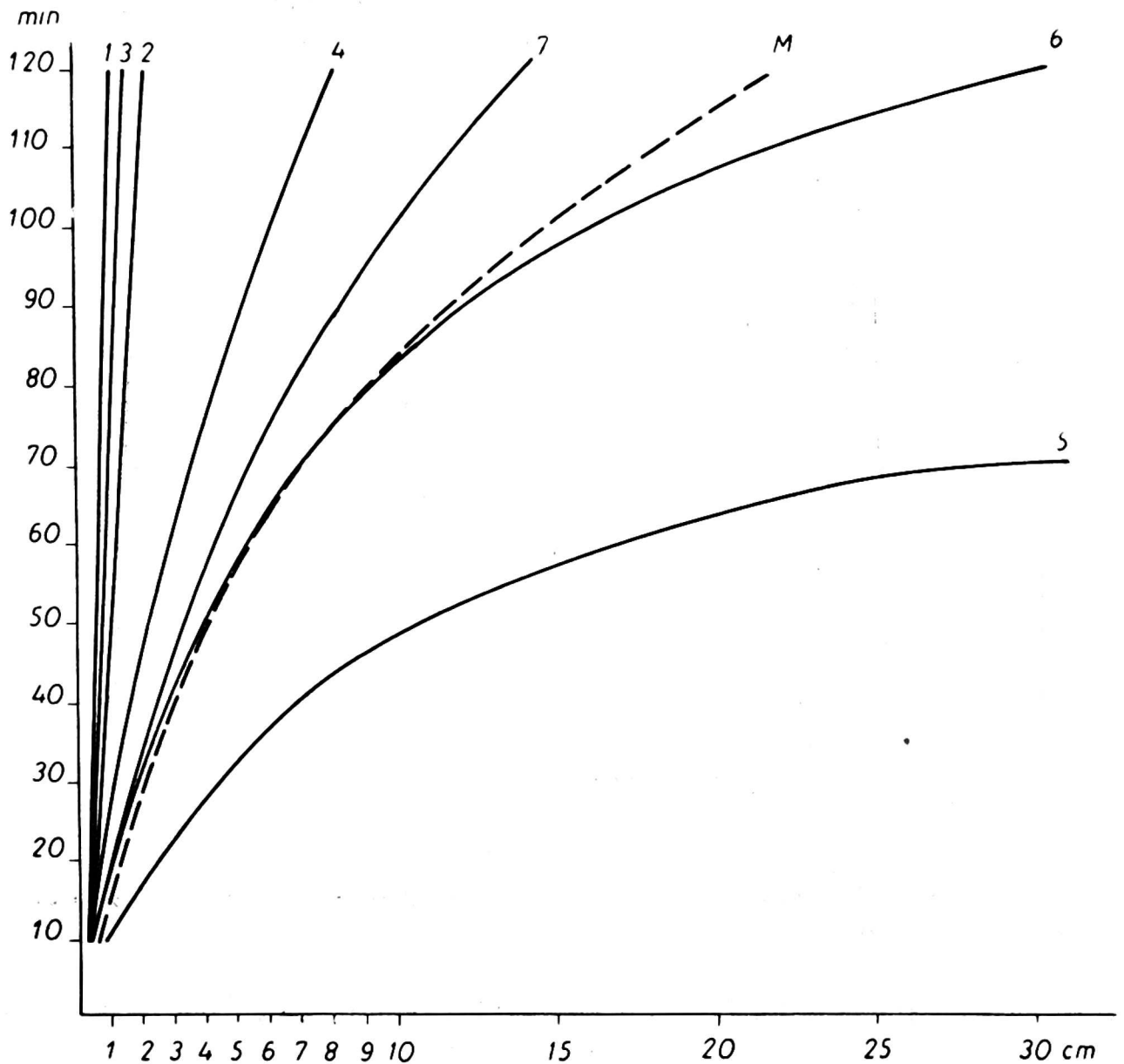
Rys. 3. Filtracja białek glutenowych na żelu „Sephadex G-100” rozpuszczalnych w 0,01 n kwasie octowym: ——— gluten normalny, - - - - gluten zmodyfikowany

5. Fizyczne właściwości glutenu. Gluten otrzymany normalnym sposobem, tj. bez poprzedzającej ekstrakcji białek rozpuszczalnych w wodzie i roztworach soli, charakteryzuje się dobrymi właściwościami fizycznymi, tj. posiada dobrą elastyczność, sprężystość i odpowiednią rozciągliwość. Te właściwości fizyczne glutenu zależą od typu pszenicy, odmiany i szeregu innych czynników.

W zasadzie mocny gluten otrzymuje się z pszenic twardych i szklistych. Słaby gluten z pszenic miękkich. Z jednej i tej samej mąki można otrzymać również gluten o różnych fizycznych właściwościach jeżeli mąka ta zostanie rozfrakcjonowana powietrzem na frakcje o różnej wielkości cząstek. Na rys. 4 przedstawiono graficznie rozciągliwość glutenu z mąki frakcjonowanej powietrzem. Najmniejszą rozciągliwość

niał gluten z frakcji mąki bogatej w białko, której cząstki były w granicach 0—7 μ . Największą rozciągliwość miał gluten z frakcji mąki cząstki której były w granicach 35—65 μ .

Fizyczne właściwości glutenu zależą również od stopnia rozdrobnienia mąki. W miarę wzrostu stopnia rozdrobnienia mąki zmniejsza się ilość wymywalnego glutenu oraz zmniejsza się jego rozciągliwość (12). Otrzy-



Rys. 4. Rozciągliwość glutenu z frakcjonowanej mąki powietrzem. Frakcja cząstek mąki w μ : 1) 0—7; 2) 7—15; 3) 15—25; 4) 25—35; 5) 35—65; 6) 65—83; 7) 83—100; M — mąka wyjściowa

many elektroforogram białek glutenowych z mąki silnie rozdrobnionej jest podobny do elektroforogramu białek glutenowych z mąki w której wyekstrahowano białka rozpuszczalne w wodzie i białka rozpuszczalne w roztworze soli.

Gluten zmodyfikowany tj. gluten otrzymany z mąki z której uprzednio wyekstrahowano białka rozpuszczalne w wodzie i roztworach soli przede-

wszystkim źle się formuje, wydajność jego jest niska, 30—50% od wydajności glutenu normalnego. Gluten taki jest kruchy, mało rozciągliwy i szary. Pod względem technologicznym gluten taki nie przedstawia dużej wartości.

6. D y s k u s j a. Większość badaczy w pracach nad fizycznymi właściwościami glutenu nie przydawali większego znaczenia białkom typu albumin i globulin, chociaż zawartość tych białek w glutenie jest stosunkowo znaczna.

Tak np. według Pence i współpracowników (18) około 50% albumin i około 90% globulin, od ogólnej ich zawartości w mące, znajduje się w glutenie. Różną zawartość białek typu albumin i globulin posiadają również różne odmiany i gatunki pszenic.

Zawartość tych białek w pszenicy miękkiej i twardej według Pence przedstawia się następująco (18):

	% azotu od azotu ogólnego mąki	
	albuminy	globuliny
pszenica miękka	10,9	7,6
pszenica twarda	9,1	5,7
Durum	6,8	7,2

Białka te mają duży wpływ na fizyczne właściwości glutenu i ciasta (18, 17, 16, 8, 10). Również w mące frakcjonowanej powietrzem i otrzymanym z tej mąki glutenie zawartość tych białek jest różna (12, 9). We frakcji drobnej, bogatej w białko zawartość białek rozpuszczalnych w stosunku do białka ogólnego jest około 3-krotnie mniejsza niż we frakcji o grubszych cząstkach, tj. frakcji o niskiej zawartości białka (9).

Nie ulega chyba wątpliwości, że białka typu albumin i globulin tworzą jeden układ helikoidalny z białkami typu gliadyny i gluteniny, tworząc w ten sposób białko glutenowe. Głównymi zwojami w układzie helikoidalnym bez wątpienia są białka typu gliadyny i gluteniny.

Białka typu albumin i globulin trudno jest wyekstrahować całkowicie przy pomocy wody i roztworów soli. Gluten otrzymany z mąki po wyekstrahowaniu z niej tych białek posiada ślady białek rozpuszczalnych w wodzie i znaczne ilości białek rozpuszczalnych w roztworze soli (rys. 2, chromatogram 2 i 4).

Podobne wnioski przedstawili francuscy badacze Mossé i Baudet (1, 15). Autorzy ci stosując sukcesywną ekstrakcję białek z mąki przy pomocy wody po 8-krotnej ekstrakcji otrzymali więcej niż $\frac{1}{3}$ białek rozpuszczalnych w wodzie w stosunku do białka ogólnego. Mniemanie niektórych autorów jakoby gluten składał się jedynie z białek typu gliadyny i gluteniny wydaje się niesłuszne (18, 19). Potwierdzają to zresztą badania

elektroforetyczne. Elton i Ewart (5) wykazali w glutenie ponad 20 frakcji. Podobną ilość frakcji wykazali i inni autorzy (3, 11).

Dane niektórych autorów (19, 22) iż gluten zawiera 8—9 elektroforetycznych frakcji nie odpowiadają rzeczywistości. Frakcje te należą jedynie do gliadyny. Bourdet i współpracownicy (2) analizując wyciągi alkoholowe z różnych typów pszenicy na żelu skrobiowym wykazali od 14 do 16 frakcji białek. Elton i Ewart w prolaminach wykazali 18—20 frakcji, w tym 13—14 frakcji wolno wędrujących (6).

Gluteniny czyli białka nierozpuszczalne w 70% alkoholu w normalnych warunkach nie ulegają rozdziałowi w polu elektrycznym na żelu. Białka te mają bardzo wysoki ciężar cząsteczkowy, który wynosi ponad milion. Jeżeli natomiast cząsteczka gluteniny zostanie rozbita, przez redukcję wiązań dwusiarczkowych, tworzą się wówczas drobiny białka o mniejszym ciężarze właściwym około 20 000. Białka te przemieszczają się w polu elektrycznym na żelu skrobiowym, a ilość otrzymanych frakcji zależy od ilości wiązań SS (4). Wiązania SS i SH odgrywają bardzo dużą rolę w łączeniu poszczególnych grup łańcuchów białkowych w jedną całość jakim jest białko glutenowe (8, 16, 17, 14, 18, 21).

Białko glutenowe jak wykazał Grosskreutz (7) przy pomocy dyfrakcji promieniami X i mikroskopu elektronowego złożone są ze spiralnych łańcuchów polipeptydowych i konfiguracji alfa helikoidalnej, których średnica zwojów wynosi 70 angstromów.

Autor wyraża serdeczne podziękowanie: dr. G. A. H. Eltonowi, dr. T. Moranowi, dr. C. R. Jonesowi, dr. P. Haltonowi, dr. L. Petitowi oraz panom J. A. D. Ewartowi i B. Godonowi za umożliwienie odbycia praktyki w ich pracowniach i wykonanie tam niektórych prac.

PIŚMIENNICTWO

1. Baudet J., Mossé J.: *Ann. Physiol. Vég.* **4**, (4) 315—331 (1962).
2. Bourdet A., Feillet P., Mettavant F.: *C. R. Acad. Sc.*, t. 256, p. 4517—4520 (1963).
3. Coulson C. B., Sim A. K.: *Biochem. J.*, **80**, 46 (1961).
4. Dimler R. J.: *The Bakers Digest*, February 52 (1963).
5. Elton G. A. H., Ewart J. A. D.: *J. Sci. Fd. Agric.* **13**, 62 (1962).
6. Elton G. A. H., Ewart J. A. D.: *J. Sci. Food Agric.* **15**, 119—126 (1964).
7. Grosskreutz J. C.: *Biochem. Biophys. Acta* **38**, 900 (1960); **51**, 277 (1961).
8. Halton P.: *The Physico-chemical Properties of Protein* s. 12—25, London S. C. J. (1959).
9. Jones R. W., Dimler R. J.: *Cereal Chem.* **39**, 4, 336—340 (1962).
10. Kamiński E., Halton P.: *J. Sci. Food Agric.* **15**, No 9, 625—629 (1964).
11. Kamiński E.: *J. Sci. Food Agric.* **13**, No 11, 604—607 (1962).
12. Kamiński E.: *Roczniki WSR w Poznaniu* **18**, 22—30 (1963).

13. Koźmina N. P.: Klejkowina pszenicy, Zagotizdat, Moskwa 1950.
14. Kretowicz W. L.: Biochimija Ziarna i chlebna A. N. SSSR, Moskwa (1958).
15. Mossé J., Baudet J.: *Ann. Physiol. Vég.* **5**, (2) 151—166 (1963).
16. Pace J.: *Recent Advances in Processing Cereals*, 99—112, London S. C. J. (1962).
17. Pace J.: *The Physico-Chemical Properties of Protein*, s. 26—38, London S. C. J. (1959).
18. Pence J. W., Mecham D. K., Olcott H. S.: *Agricultural and Food Chemistry* **4**, No 8, 712—716 (1956).
19. Pence J. W., Mecham K. K.: *Recent Advances in studies on wheat Protein. Wallerstein Laboratories Communications* **25**, No 86, 37—41 (1962).
20. Smithies O.: *Biochem. J.* **71**, 585 (1959).
21. Waker A. B.: *Klejkowina Pszenicy A. N. SSSR* (1961).
22. Woychik J. H., Boundy J. A., Dimler R. J.: *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 477 (1961).