

BIOCHEMIA ZBÓŻ

J. JANICKI, E. SOBKOWSKA

Katedra Technologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu

Ziarno zbóż, jeden z podstawowych środków spożywczych (w skali światowej 72% kalorii dostarczają produkty zbożowe (29), przedstawia pod względem wartości odżywczej w dużym stopniu nierozwiązany jeszcze problem. Wynika to głównie z poważnych trudności metodycznych przy oznaczaniu w ziarnie zbóż składników stanowiących o wartości odżywczej. Duża zawartość skrobi, trudny dostęp do składników występujących w warstwie aleuronowej, obfitość różnego rodzaju substancji przeszkadzających, sprawiają, że metody pozwalające na uzyskanie wyników powtarzalnych przy badaniach np. na tkankach zwierzęcych, zawodzą w odniesieniu do ziarna zbóż. Klasycznym tego przykładem jest oznaczanie zawartości witamin. Różne laboratoria posługujące się tą metodą, lub te same laboratoria przeprowadzające analizę różnymi metodami otrzymują wyniki różniące się w bardzo poważnym stopniu (8, 11).

W Katedrze Technologii Rolnej WSR w Poznaniu prace z zakresu biochemii zbóż prowadzone od wielu lat dotyczą następujących zagadnień:

- 1) charakterystyki białek zbożowych,
- 2) składu aminokwasów białek, ze szczególnym uwzględnieniem niedoborów aminokwasów,
- 3) wartości witaminowej,
- 4) charakterystyki enzymów,
- 5) charakterystyki skrobi,
- 6) kwasów nukleinowych,
- 7) charakterystyki mikroflory w zbożu i produktów zbożowych.

Charakterystyka białek zbożowych

Wprowadzenie nowoczesnej techniki analitycznej do rozdziału białek zbożowych zmienia od podstaw dotychczasowe poglądy opierające po-

dział białek na ich rozpuszczalności. Przeprowadzony przez jednego z pracowników Katedry (18) rozdział białek pszenicy przy pomocy elektroforezy na żelu skrobiowym wykazał, że uważane za jednorodne białka, albuminy, globuliny, prolaminy i gluteliny rozdzielają się na znaczne ilości w dużej mierze analogicznych elektroforetycznie frakcji. Białka rozpuszczalne w wodzie rozdzielają się na 22 frakcje, rozpuszczalne w roztworze soli na 23 frakcje, a rozpuszczalne w alkoholu na 10 frakcji o większym i 9 o mniejszym stężeniu. Rozpuszczalność białek nie może zatem być jedynym kryterium przynależności ich do pewnej grupy. Przy użyciu elektroforezy na żelu skrobiowym ujawniła się również różnica między glutenem pszenicy miękkiej i twardej (19). Różnica ta polega przede wszystkim na różnej ilości poszczególnych frakcji wchodzących w skład białek rozpuszczalnych w alkoholu. Pozwala to wnioskować o różnej budowie białka pszenicy twardej i miękkiej.

Skład aminokwasowy białek zbóż

Jak wykazały prace Sure (27) Hutchinsona i in. (4) oraz Desphaude i współpr. (1) aminokwasami limitującymi wartość odżywczą białek pszenicy i żyta są przede wszystkim lizyna, a dalej tryptofan, treonina, i metionina. Na te aminokwasy zwróciliśmy szczególną uwagę (9, 14, 15).

Badano pszenice jare i ozime o zawartości białka (N-og. $\times 5,73$) od 10,8 do 15,4% z okolicy Słupi Wielkiej (woj. poznańskie) i z Czesławic (woj. lubelskie). Wykazano, że w określonych warunkach w metodzie hydrolizy kwasowej Dustina i współpracowników (2) przy długotrwałym odparowywaniu kwasu solnego może zachodzić utlenianie metioniny nawet do 90%. Stwarza to następnie poważne trudności przy oznaczaniu metioniny metodami chromatografii bibułowej (24) i kolorymetrycznie (22). Przy zastosowaniu atmosfery azotu przy odparowywaniu HCl wyeliminowaliśmy te straty prawie całkowicie (do około 5%). Stwierdziliśmy również, że metoda oznaczania tryptofanu Spiesa i Chambersa (26) (hydroliza zasadowa) w modyfikacji Krauzego i współpracowników (20) nie nadaje się do badania zbóż mimo zastosowania takadiastazy w celu wstępnego rozłożenia skrobi.

Na podstawie wyników analiz stwierdziliśmy, że skład aminokwasowy białek zbóż zmienia się w zależności od gatunku, odmiany i rejonu uprawy. Różnice ilościowe między poszczególnymi odmianami pszenic pochodzącymi z jednego rejonu uprawy i z jednego zbioru przeciętnie nie przekraczają 20%. Natomiast pszenice z województwa poznańskiego przeciętnie zawierają o 60% lizyny więcej niż pszenice z województwa lubelskiego. Zawartość lizyny w życie jest przeciętnie o 40% wyższa

niż w pszenicy. Jeśli uwzględnimy ponadto nieco wyższą niż w pszenicy (o 10—20%) zawartość treoniny i metioniny wydaje się, że białko żyta jest cenniejsze dla organizmu człowieka niż białko pszenicy.

W ostatnich latach Lawrence i współpracownicy (21), Mc Dennott i Pace (23) oraz Simmonds (25) wykazali odwrotną zależność istniejącą pomiędzy zawartością białka, a zawartością lizyny (mniej wyraźnie także i innych aminokwasów) w pszenicy. Uzyskane przez nas dane w obecnym stadium prac nie pozwalają na całkowicie pewne potwierdzenie występowania opisanego zjawiska w różnych odmianach pszenic uprawianych w Polsce, jednakże tendencja taka istnieje. Ustalenie tej zależności będzie miało duże znaczenie dla wytypowania do uprawy w Polsce konkretnych odmian, które przy dużej zawartości białka będą zawierać również stosunkowo dużo lizyny.

Wartość witaminowa

Badania zawartości witamin w ziarnie zbóż prowadzone w naszej Katedrze obejmują przede wszystkim problemy metodyczne. Celem ich jest ustalenie standardowych metod do oznaczania zawartości witamin w ziarnie zbóż i w produktach zbożowych. Prace te prowadzone są wspólnie z Organizacją ICC (International Association for Cereal Chemistry), w której kierownikiem sekcji witaminowej jest przedstawiciel Polski — autor tego referatu.

Oznaczanie zawartości witamin w zbożu i produktach zbożowych związane jest z bardzo poważnymi problemami metodycznymi. Jak już wspominaliśmy, po rozesłaniu próbek ziarna i mąki do 21 znanych w świecie laboratoriów, otrzymaliśmy wyniki analiz witamin różniące się między sobą bardzo poważnie (8, 11).

Witamina B₁

Stwierdziliśmy, że w metodzie tiochromowej na wartość wyniku i błąd metody często duży wpływ ma wartość próby zerowej. W przyjętych warunkach analizy w próbce tej może powstawać tiochrom (13), a ponadto występują w niej również inne substancje fluoryzujące (12). Dlatego też zaproponowaliśmy modyfikacje w sporządzaniu próby zerowej (3), które pozwalają na uniknięcie tego źródła błędu. Przy badaniu zawartości witaminy B₁ w pszenicy i życie stwierdziliśmy, że rejon uprawy oraz odmiana mają duży wpływ na zawartość tej witaminy w ziarnie (10). Różnice między niektórymi odmianami dochodzą nawet do 100%.

W i t a m i n a B₂

Zawartość witaminy B₂ w zbożu jest dotychczas wielkością nie ustaloną. Zależnie od użytej metody można otrzymać zawartość od kilku do kilkudziesięciu µg. W Katedrze naszej prowadzimy systematyczne prace nad wpływem różnych czynników na wynik oznaczenia zawartości witaminy B₂ w zbożu. Stwierdziliśmy, że w metodzie lumiflawinowej na powstawanie lumiflawiny ma wpływ obecność fruktozy, podczas gdy glukoza względnie produkty hydrolizy kwasowej skrobi tego wpływu nie wykazują. Jednakże dodatek żelaza do glukozy rzutuje w poważny sposób na tworzenie się lumiflawiny (7, 17). W metodzie fluorometrycznej czynnikiem ograniczającym dokładność metody jest trudność z ustaleniem wielkości próby zerowej. Wygaszanie fluorescencji flawin przy pomocy Na₂S₂O₃ prowadzi do poważnych niekiedy błędów.

Poważny wpływ na wielkość wyniku ma również metoda wydobycia flawin z badanej próby. Występowanie silnie związanych form witaminy B₂ w zbożu jest problemem przyciągającym obecnie dużą uwagę literatury światowej. Prowadzone przez nas prace w tym kierunku koncentrują się obecnie na metodach enzymatycznej hydrolizy próby przy użyciu różnych zestawów enzymów hydrolizujących.

W i t a m i n a P P

Sposób hydrolizy ma również wpływ na wyniki uzyskiwane przy oznaczaniu witaminy PP. Stwierdziliśmy — podobnie jak i inne laboratoria — że hydroliza alkaliczna uwalnia większe ilości tej witaminy niż hydroliza kwasowa (10). W pszenicy znaleźliśmy tej witaminy do 100% więcej niż w życie.

W i t a m i n a E

Występowanie witaminy E w zbożu jest — jak ogólnie wiadomo — połączone z częścią anatomiczną ziarna. W zarodkach stwierdziliśmy jej ilość około 14 razy większą niż w bielmie (344 µg/g zarodków, 25,5 µg/g bielma). Prowadzimy również prace nad występowaniem tej witaminy w różnych nasionach. Poważne ilości stwierdziliśmy w nasionach pszczeczki (2,66 mg/g oleju), znacznie mniejsze w rzepaku (0,41 mg/g oleju). W badaniach chromatograficznych stwierdziliśmy, że w nasionach witamina występuje w największej mierze w postaci α-tokoferolu (5).

C h a r a k t e r y s t y k a e n z y m ó w

Rola różnego rodzaju grup tiolowych w procesie aktywacji enzymów proteolitycznych i amylolitycznych jest ogólnie biorąc — znana, jednakże w odniesieniu do białka pszenicy jest ciągle jeszcze problemem otwar-

tym. Brakuje bowiem fundamentalnych danych dotyczących charakterystyki enzymów proteolitycznych i amylolitycznych pszenicy. W związku z tym w Katedrze naszej prowadzi się badania nad oznaczaniem różnych form grup sulfhydrylowych białek pszenicy w powiązaniu z aktywnością zarówno proteolityczną jak i amylolityczną. Badania te mają na celu udowodnienie sulfhydrylowego charakteru tych enzymów jak również wyjaśnienie mechanizmu działania tzw. ulepszaczy w procesach technologicznej obróbki ciasta.

O roli grup tiolowych w procesach enzymatycznych świadczy stwierdzony wzrost zawartości glutationu w początkowych stadiach kiełkowania ziarna pszenicy (16). Udowodniliśmy, że poziom glutationu (zredukowanego) wzrasta już po 3—6 godzinach od chwili namoczenia ziarna o 40—120%, by po 21—27 godz. w momencie wyraźnego wzrostu kielka osiągnąć do 360% pierwotnego poziomu. Fakt ten potwierdzony został na drodze miareczkowania amperometrycznego grup SH pszenicy. Stwierdziliśmy mianowicie, że po 3—6 godz. moczenia ziarna poziom grup SH wzrasta o 40—56%, podczas gdy po 18—24 godz. o 115—120%.

Na uwagę zasługuje zaobserwowany w trakcie badań fakt, że zawartość grup SH w skiełkowanym i następnie wysuszonym do normalnej wilgotności ziarnie, w ciągu dwóch lat nie uległa zmianie.

Przebadano wpływ różnych specyficznym reagujących z grupami tiolowymi związków takich jak N-etylo-maleimid, kwas jodoctowy, kwas p-chlorortęciobenzoesowy i chlorortęcioetylen na aktywność proteolityczną i amylolityczną. Związki te okazały się wyraźnymi inhibitorami aktywności enzymatycznej pszenicy, co wskazuje na sulfhydrylowy charakter badanych enzymów.

Podobny wpływ wykazały związki utleniające jak np. H_2O_2 i J_2 . Natomiast dodatek związków sulfhydrylowych jak glutation i kwas tioglikolowy powodował wyraźny wzrost aktywności proteolitycznej i amylolitycznej pszenicy. Prowadzimy również badania nad wyodrębnieniem i oczyszczeniem proteaz pszenicy w celu potwierdzenia dotychczas uzyskanych wyników na homogenicznych preparatach enzymatycznych. Dotychczasowe obserwacje świadczą o obecności przynajmniej dwóch różnych enzymów proteolitycznych w wyodrębnionej frakcji enzymatycznej (28).

C h a r a k t e r y s t y k a s k r o b i

Z biochemicznego punktu widzenia jakość uzyskiwanego pieczywa zależna jest w poważnym stopniu z jednej strony od rodzaju i ilości enzymów amylolitycznych aktywnych w czasie fermentacji ciasta, z drugiej natomiast strony od podatności skrobi na działanie tych enzymów.

Właściwa regulacji ilości czynnych amylaz i dostępnej ich działaniu skrobi może prowadzić do otrzymania pieczywa o optymalnych cechach z mąk różniących się od siebie znacznie pod względem technologicznym. Tak np. przeprowadzone w Katedrze prace nad hamowaniem aktywności procesów enzymatycznych przy fermentacji ciasta z mąki z porośniętego ziarna pozwoliły na otrzymanie pieczywa o prawidłowych cechach technologicznych i organoleptycznych (6). Z drugiej strony stwierdziliśmy, że w mąkach z nieporośniętego ziarna, dodatek cukru wpływa korzystnie na cechy otrzymywanego pieczywa. Ponieważ w nieporośniętym ziarnie nie ma alfa-amylazy, która w odróżnieniu od beta-amylazy wykazuje zdolność atakowania całych, nie uszkodzonych ziaren skrobi, postanowiliśmy jej biochemiczne działanie zastąpić mechanicznym uszkodzeniem ziaren skrobi. Prace dały efekt pozytywny. Uszkodzenie skrobi do 35% dawało ten sam efekt technologiczny, co 5% dodatek cukru do ciasta. Uszkodzenia ziaren skrobi dokonuje się przez odpowiednio prowadzony sposób wymiału. Rozdrabnianie mąki ma równocześnie decydujące znaczenie dla mikrostruktury białka. Stwierdziliśmy, że przy odpowiednio prowadzonym wymiale można regulować cechy glutenu, np. z pszenicy miękkiej, charakteryzującej się słabym glutenem, można otrzymać mąkę dającą mocny gluten. Zarówno jakość glutenu jak i stopień uszkodzenia skrobi mają decydujące znaczenie dla jakości pieczywa. Dla kontroli tego procesu opracowaliśmy metodę oznaczania stopnia uszkodzenia skrobi pozwalającą na rozróżnienie ziarn całych od uszkodzonych. W celu dalszej charakterystyki skrobi opracowaliśmy również nową metodę mikroskopową określania początkowego stadium kleikowania przy pomocy selektywnego barwienia. Stwierdziliśmy, że dla skrobi pszennej w zależności od wielkości ziarenek proces kleikowania przebiega od temperatury 45° do 65°, podczas gdy dla skrobi ziemniaczanej od 55° do 70°.

K w a s y n u k l e i n o w e

Oznaczanie składu kwasów nukleinowych w materiale roślinnym napotyka poważne trudności metodyczne. Ziarna zbóż pod tym względem nie tylko nie odbiegają od reguły lecz stanowią jej jaskrawy przykład. Obfitość substancji przeszkadzających sprawia, że żadna z przyjętych metod nie daje odtwarzalnych wyników. W Katedrze przeprowadziliśmy oznaczenie składu kwasu rybonukleinowego w zarodkach żyta i pszenicy na obszernym materiale badawczym, stosując kombinację metod polegającą na otrzymaniu rodzimego kwasu rybonukleinowego poprzez ekstrakcję fenolową i następnie jego hydrolizę alkaliczną w celu oznaczenia składu nukleotydowego. Wyniki poparte analizą matematyczną wykazały skład zbliżony do średniej wyników spotykanych w literaturze.

Analiza produktów hydrolizy rybonukleazą otrzymanych preparatów kwasu rybonukleinowego wskazywała na pewne różnice w sekwencji nukleotydowej tego kwasu nukleinowego z zarodków żyta i pszenicy.

Charakterystyka mikroflory w zbożu i produktach zbożowych

Prace Katedry z zakresu mikrobiologii zboża obejmowały trzy główne kierunki badawcze:

1. Opracowanie sposobów oznaczania powierzchniowego i wglębnego zakażenia ziarna.
2. Ustalenie korelacji między stopniem i charakterem zakażenia a zdolnością i energią kiełkowania.
3. Określenie wpływu poszczególnych grup drobnoustrojów na zmiany biochemiczne i właściwości technologiczne i wypiekowe mąki.

Opracowano sposób oznaczania zakażenia wglębnego ziarna, co stało się możliwe dzięki ustaleniu metody powierzchniowego wyjaławiania ziarna bez uszkodzenia mikroflory wglębnej. Wyizolowano szereg szczepów pleśni oraz bakterii wykazujących zdolność zarówno hamowania (pleśnie) jak i przyspieszania (bakterie) kiełkowania ziarna. Ustalono, że decydujący wpływ na zmiany biochemiczne i wartość technologiczną posiada mikroflora wglębna ziarna, złożona przede wszystkim z tlenowych, przetrwalnikujących laseczek należących do grupy *Subtilis*. Z pleśni, mikroflora wglębna reprezentowana jest zasadniczo przez rodzaje *Aspergillus* i *Penicilium* określane jako tak zwane pleśnie przechowalniane.

PIŚMIENNICTWO

1. Desphaude P. D., Harper A. E., Elvehjem A. C.: J. Nutr. **62**, 503 (1957).
2. Dustin J. P., Czajkowska C., Moore S., Bigwood E. J.: Anal. Chim. Acta **9**, 256 (1956).
3. Gassman B., Janicki J., Kamiński E.: Intern. Z. f. Vitaminforschung **33**, 1, 1 (1963).
4. Hutchinson J. B., Moran T., Pace J.: Brit. J. Nutr. **13**, 151 (1959).
5. Janicki J., Gogolewski M., Kamiński E.: Roczn. Techn. i Chem. Żywn. **9**, 99 (1962).
6. Janicki J., Kamiński E.: Studia nad możliwością polepszenia wartości wypiekowej mąki z porośniętego żyta. Praca magisterska. Poznań, 1950.
7. Janicki J., Kamiński E.: V Intern. Congr. of Nutr., Abstracts. Washington, 1960.
8. Janicki J., Kamiński E.: Getreide u. Mehl, Heft 1, 1 (1960).

9. Janicki J., Kamiński E.: *Hod. Roślin. Aklimat. Nasiennictwo*, **4**, 5, 595 (1960).
10. Janicki J., Kamiński E.: *Hod. Rośl. Aklimat. Nasiennictwo*, **5**, 1, 53 (1961).
11. Janicki J., Kamiński E.: *Roczn. Technol. i Chem. Żywn.* **9**, 5 (1962).
12. Janicki J., Kamiński E., Bartołd Z.: *Die Nahrung* **6**, 5, 423 (1962).
13. Janicki J., Kamiński E., Frąckiwiak N.: *Intern. Symp. on B-Vitamins*, Poznań, 1959, str. 453.
14. Janicki J., Kamiński E., Niewiarowicz A., Trojanowska K.: *Roczniki WSR w Poznaniu*, **13**, 103 (1962).
15. Janicki J., Kowalczyk J.: Oznaczanie składu aminokwasowego niektórych odmian krajowych pszenicy i żyta przy użyciu automatycznego analizatora aminokwasów. Praca złożona do druku w *Biochemii Ziarna*.
16. Janicki J., Wierzbowski J.: *Roczniki WSR w Poznaniu* **8**, 33 (1960).
17. Kamiński E.: *Intern. Symp. on B-Vitamins*, Poznań, 1959, str. 470.
18. Kamiński E.: *J. Sci. Food Agric.*, **13**, 603 (1962).
19. Kamiński E.: w tych Materiałach, str.
20. Krauze S., Piekarski L., Maksymczuk J.: *Roczniki PZH*, **11**, 385 (1960).
21. Lawrence J. M., Day K. M., Huey E., Lee B.: *Cereal Chem.* **35**, 169 (1958)
22. Mc Carthy T. F., Sullivan N.: *J. Biol. Chem.*, **141**, 71 (1941).
23. Mc Dennot E. E., Pace J.: *J. Sci. Food Agric.*, **11**, 109 (1960).
24. Roland J. F., Gross A. M.: *Anal. Chem.* **26**, 502 (1954).
25. Simmonds D. H.: *Cereal Chem.*, **39**, 445 (1962).
26. Spies J. R., Chambers D. C.: *Anal. Chem.* **20**, 30 (1948).
27. Sure B.: *Agricult. Food Chem.*, **2**, 1108 (1954).
28. Sprawozdania roczne nr 1, 2, 3 dla Agriculture Research Service. Department of Agriculture USA (1960—1962) Fg-Po-109.
29. Wilson E. D., Fisher K. H., Fuqua M. E.: *Principles of Nutrition*. J. Wiley. New York, 1959, str. 250.