

MIECZYŚLAW JANKIEWICZ, JERZY KĄCZKOWSKI, JANUSZ SKUPIN
Akademia Rolnicza w Warszawie, Akademia Rolnicza w Poznaniu

CZYNNIKI BIOCHEMICZNE OKREŚLAJĄCE WARTOŚĆ UŻYTKOWĄ ZIARNA ZBÓŻ W UKŁADZIE BIAŁKOWO-PROTEOLITYCZNYM

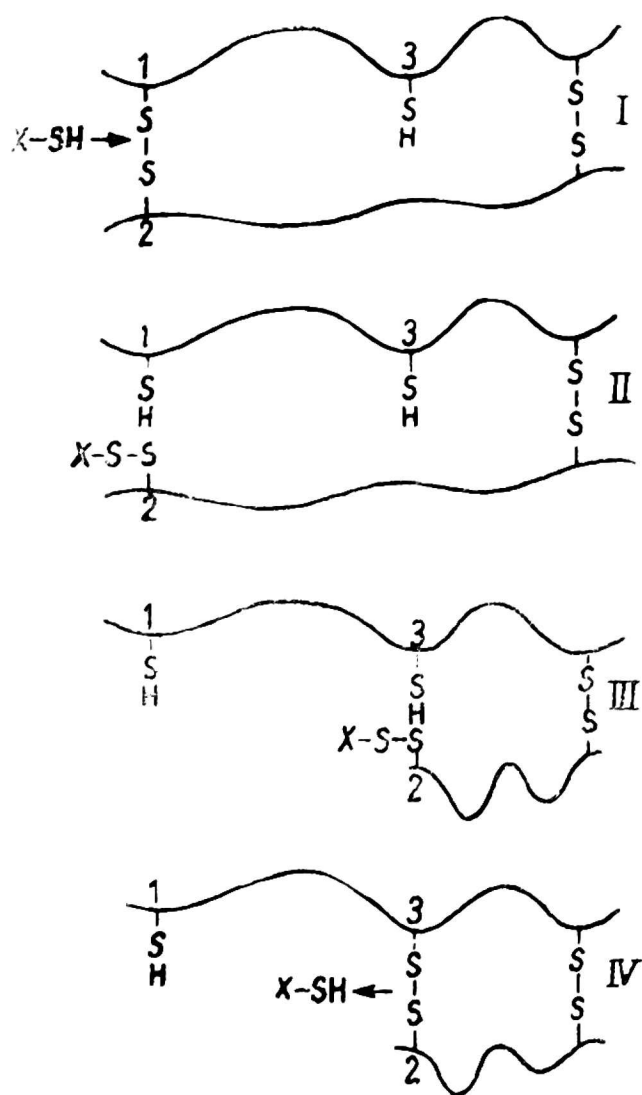
Białka roślinne stanowią coraz bardziej cenny, a przede wszystkim tańszy od zwierzęcych, surowiec w odżywianiu człowieka i zwierząt. Ich wartość użytkowa zależy nie tylko od składu aminokwasowego, ale i struktury wpływającej na dostępność zawartych w nich wiązań peptydowych. Różnorodność białek roślinnych jest ogromna, zarówno z uwagi na zawartość aminokwasów egzogennych, jak i strukturę wtórną. Z tą ostatnią cechą wiąże się między innymi różnorodność funkcji fizjologicznych oraz użytkowych. Jednym z bardziej interesujących zespołów białek o szczególnych funkcjach strukturalnych jest kompleks występujący w endospermie pszenicy, zwany już od dawna glutenem. Pod względem fizjologicznym jest to białko zapasowe, natomiast już bardzo dawno zwrócono uwagę na jego cechy technologiczne, gdyż ma ono szczególną elastyczność i rozciągliwość, a w procesie wytwarzania ciasta tworzy (z udziałem innych składników) plastyczną i elastyczną strukturę, nadającą mu przy pieczeniu porowatość, dzięki zatrzymywaniu gazów wewnątrz tej struktury.

Charakterystyka układu glutenowego

Występujące w ziarnie zbóż chlebowych białka można zaliczyć ogólnie do dwóch grup o wyraźnie zarysowanych właściwościach technologicznych. Prolaminy i gluteliny, a także tak zwane białka nierozpuszczalne, stanowiące razem grupę białek glutenowych, cechują się szczególną zdolnością do agregacji w warunkach środowiska wodnego, której rezultatem jest osiągnięcie stanu utożsamianego z cechami substancji glutenowej (19, 49). Białka te tworzą w tak uformowanych agregatach podstawowy element konstrukcji matrycy glutenowej.

Zaliczane do drugiej grupy białka albuminowe i globulinowe nie wykazują zdolności do samodzielnego tworzenia podobnych agregatów (19, 49). Należy jednak brać pod uwagę, że wiele z nich jest obdarzonych funkcjami enzymatycznymi, a dzięki dużej reaktywności oddziałują

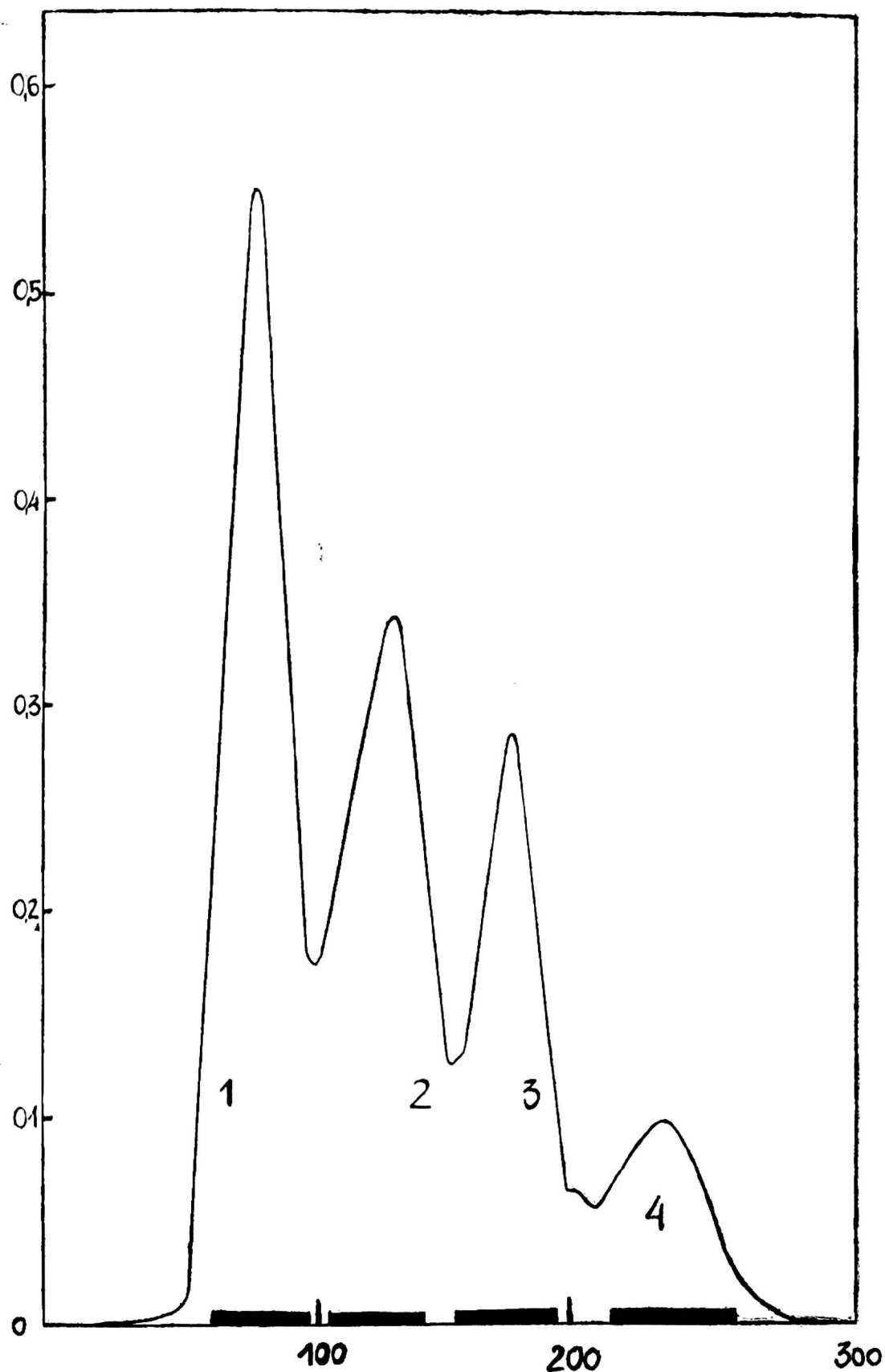
one także modyfikująco na białka typu glutenowego (9, 21). Wykazano więc, że albuminy i globuliny pełnią, w pewnym stopniu, funkcję „lepiszcza” ułatwiającego powstawanie agregatów z białek prolaminowych i glutelinowych, które ze względu na swą wielkość tracą już zdolność dyspergowania w konwencjonalnych kwaśnych roztworach słabych elektrolitów (21, 24). Uczestnicząc w interakcjach za pośrednictwem swoich grup sulfhydrolowych białka albuminowe i globulinowe są w stanie zmieniać rozmieszczenie mostków dwusiarczkowych w przestrzennej strukturze matrycy glutenowej, zwłaszcza, jeżeli poddaje się ją równoczesnym odkształceniom mechanicznym podczas mieszenia ciasta (9, 10, 13).



Rys. 1. Schemat reakcji wymiany między grupami sulfhydrylowymi i mostkami dwusiarczkowymi w białku glutenowym (9, 10). I, II, III i IV — proponowane fazy przemieszczania wiązania dwusiarczkowego w cząsteczce białkowej w warunkach odkształcenia mechanicznego

Białka zawarte w endospermie pszenicy dają się rozfrakcjonować różnymi metodami na albuminy i globuliny (białka rozpuszczalne) oraz niskocząsteczkowe prolaminy (gliadyne) i wysokocząsteczkową glutelinę (gluteninę). Należy sądzić, że dwie ostatnie grupy białek (i być może część albumin i globulin) już w procesie wmywania lub ekstrakcji podlegają różnorodnym interakcjom, tworząc w stanie uwodnionym kompleks

określany właśnie jako gluten. Jedynie ten zespół białkowy posiada wspomniane szczególne właściwości strukturalne, a ztraca je po rozfrakcjonowaniu.

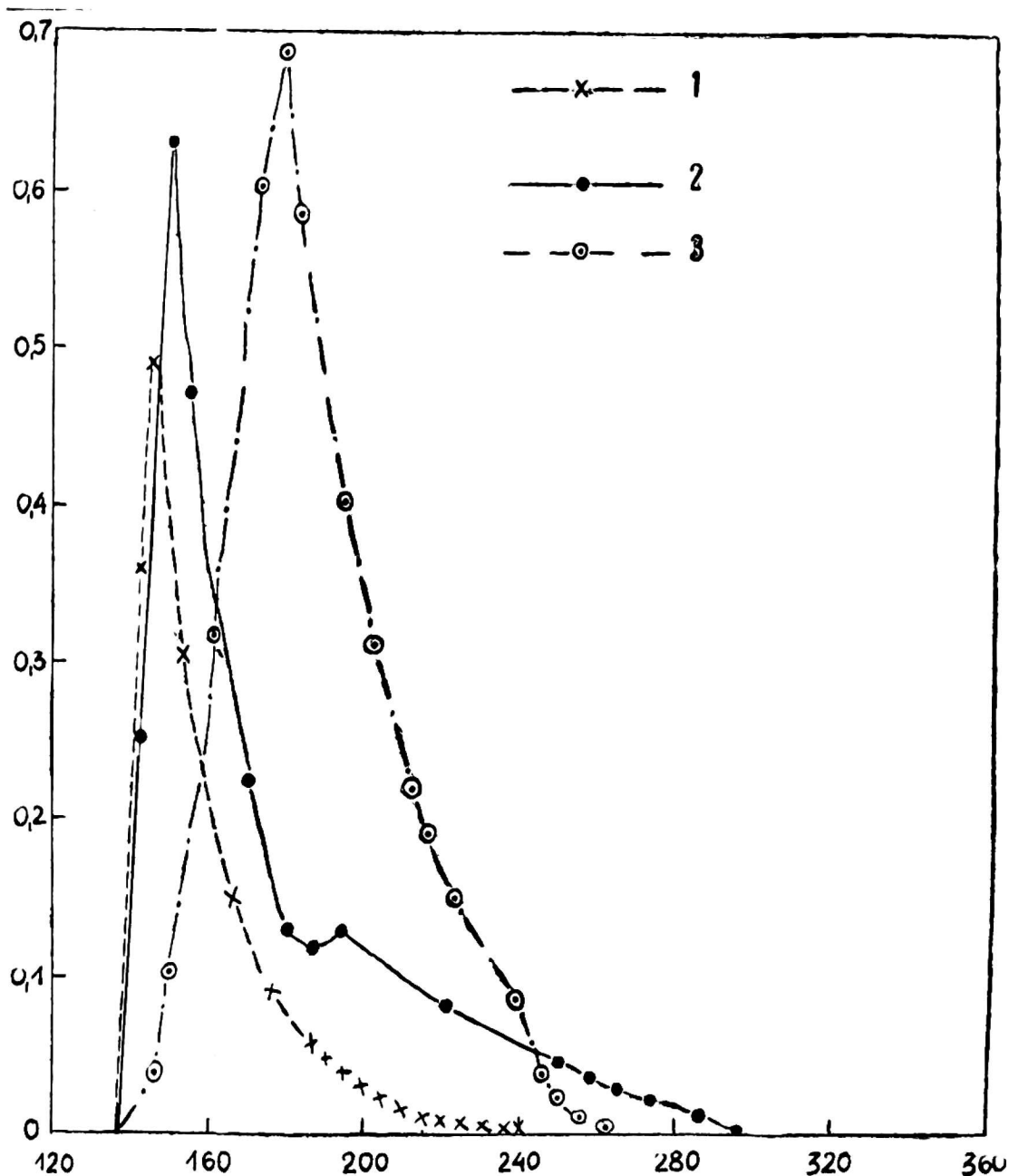


Rys. 2. Typowy rozdział białek glutenowych na kolumnie z Sefadexs G 100 w 0,05 M buforze octanowym: 1 — glutenina, 2 — gliadyna, 3 — albuminy i globuliny, 4 — peptydy; oś pozioma — objętość elucji w ml, oś pionowa — ekstynkcja przy 280 nm

Jednakże wymienione frakcje nie są jednorodne, gdyż każda z nich w elektroforezie lub przy pomocy innych metod daje wiele frakcji o różnych właściwościach. Gluteninę i gliadynę, a także białka rozpuszczalne uzyskuje się obecnie najprościej przez frakcjonowanie dyspersji glutenu w kwasie octowym (lub wyciągu mąki w kwasie octowym) (43) na Sefadeksie G 100 lub G 200 (35), co pozwala uzyskać odrębne frakcje widoczne na rys. 2. Stosunek między gliadyną i gluteniną nie jest stały i zależy od stosowanych warunków. Stąd niektórzy badacze, a także autorzy uważają, że obydwie frakcje pozostają ze sobą w równowadze, związanej z agregacją, względnie dezagregacją określonych podjednostek. Między innymi nasze badania wykazały, że frakcja I poddana ponownemu rozdzielaniu na Sefadeksie G 100 dała obraz podobny do obserwowanego na rys. 2, a więc nastąpiło przywrócenie, w pewnym stopniu, równowagi między frakcjami wysoko- i niskocząsteczkowymi. Jednakże elektroforeza gluteniny potraktowanej czynnikiem redukującym, prowadzona na żelu skrobiowym, lub poliakrylamidowym wykazała, że obok jednostek o identycznej ruchliwości z jednostkami gliadyny, glutenina zawiera też zupełnie inne jednostki, a nawet niektóre z tych o jednakowej ruchliwości, posiadają różny skład aminokwasowy (8, 17). Ponadto badania widm ORD wykazały, że podjednostki gliadyny posiadają przewagę struktur spiralnych, natomiast podjednostki gluteniny wykazują znacznie większy procent struktur kłębkowych, nieuporządkowanych (56). Wreszcie skład aminokwasowy wykazuje różnice, z których największe znaczenie ma, być może, stosunkowo wysoka w gluteninie zawartość resztek glutaminy, której grupy amidowe są potencjalnymi źródłami międzylańcuchowych wiązań wodorowych (55). Dlatego też podjednostki te wykazują znaczną tendencję do agregacji. Jest więc możliwe, że równowaga występuje nie między gliadyną i gluteniną, ale między agregatem gluteniny a jej podjednostkami, przy czym równowaga ta jest zależna od obecności podjednostek gliadyny.

Badania cienkich przekrojów niedojrzałej endospermy pszenicy w mikroskopie elektronowym (16) wykazały obecność tzw. „ciałek białkowych” (protein bodies), przyczepionych do błony lipoproteinowej obok rybosomów, znajdujących się na powierzchni siateczki endoplazmatycznej. W okresie „nalewania ziarna” tworzy te zawierają niskocząsteczkowe białka typu gliadyny i są zapewne miejscem ich biosyntezy. W ziarnie dojrzałym „protein bodies” nie były już obserwowane. Natomiast wysokocząsteczkowe białka tworzące gluteninę syntetyzowane są w głównej mierze (zwłaszcza te o większych cząsteczkach), przypuszczalnie poza „protein bodies” i w czasie całego okresu dojrzewania ziarna zarówno przed pojawieniem się tych tworów, jak i po ich zaniku (11). Tak więc biosynteza obydwu wymienionych frakcji odbywa się niezależnie.

Według poglądów Simmondsa, podjednostki tworzące wysokocząsteczkowe agregaty gluteniny pochodzą z lipoproteidów oraz produktów degradacji membran i struktur podkomórkowych (44), natomiast pochodzenie podjednostek tworzących gliadynę nie jest wyjaśnione. W dalszym ciągu kształtowania się kompleksu, podjednostki o różnym charakterze łączą się w większe agregaty z udziałem wiązań S-S, wodorowych oraz hydrofobowych, którym ostatnio przypisuje się coraz większe znaczenie.



Rys. 3. Porównanie ciężarów cząsteczkowych gluteniny trzech odmian pszenicy przez sączenie molekularne na żelu agarozowym (BioGel A 5M) w buforze tris + 3M mocznik, pH 6,0. 1 — Red River 68 (półkarłowa HRS), 2 — Ponca (HRW), 3 — Brevor (SWW); oś pozioma — objętość elucji w ml, oś pionowa — ekstynkcja przy 280 nm

Bardzo ważnym zagadnieniem jest wyjaśnienie przyczyn genetycznych lub innego rodzaju kształtujących własności reologiczne i wartość reologiczną glutenu i pszenicy. Niewątpliwie struktura wtórna lub obecność w kompleksie gluteniny niektórych z omawianych podjednostek ma istotny udział w kształtowaniu wartości technologicznej mąki pszennej. Mianowicie wykazano, że jakość pszenicy jest wprost proporcjonalna do ilości tzw. gluteniny resztkowej, czyli nierozpuszczalnej w kwasie octowym (36), a inni badacze wykazali, że wiąże się ona z ciężarem cząsteczkowym tej frakcji gluteniny (7), co obrazuje rys. 3.

Badania genetyczne wykazały, że za jakość technologiczną ma być odpowiedzialny gen zawarty w chromosomie 1D heksaploidalnej pszenicy *Triticum aestivum*, gdyż genom D nie występuje w *T. durum*, która nie tworzy glutenu o właściwej strukturze (30, 55). Jednakże genowi temu można przypisywać kontrolę wytwarzania szeregu różnych frakcji białka gluteniny, gdyż *T. durum* nie zawiera szeregu frakcji, występujących w normalnej pszenicy. Na przykład przy porównywaniu obrazów elektroforetycznych różnych odmian i klas pszenicy wykazano, że *T. durum* nie zawiera powolnej frakcji, która w *T. aestivum* wykazywała nasilenie skorelowane z wartością technologiczną. Jest więc również możliwe, że właśnie ta frakcja gluteniny jest kontrolowana przez gen zawarty w chromosomie 1D oraz odpowiedzialna za jakość pszenicy.

Istotne znaczenie mają też badania nad własnościami poszczególnych frakcji białek kompleksu glutenowego i nad próbami ich skorelowania z wartością technologiczną mąki. W badaniach tych wiele uwagi poświęca się wiązaniom dwusiarczkowym (i grupom -SH) oraz wiązaniom wodorowym. Ponieważ zawartość cysteiny w glutenie wykazuje niewielkie rozbieżności i nie jest skorelowana z jego jakością, należy sądzić, że w głównej mierze nie ilość wiązań S-S, a ich rozmieszczenie w kompleksie ma istotny wpływ na wartość technologiczną mąki (9). Ewart (14) stwierdził, że w glutenie ponad połowa wiązań S-S występuje pomiędzy łańcuchami polipeptydowymi i są one określane jako powierzchniowe. Kączkowski ze wsp. (5) wykazał, że procentowa zawartość międzylańcuchowych wiązań S-S w glutenie jest czynnikiem zasadniczym dla kształtowania jakości mąki, natomiast szybkość wymiany grup SH i wiązań S-S w glutenie zdyspergowanym nie wykazuje bezpośredniego powiązania z jakością.

Układ wiązań wodorowych w glutenie z którym związana jest zawartość cząsteczek białkowych, zgodnie z sugestiami Wakara (50) ma istotny wpływ na cechy reologiczne glutenu i ciasta. Jednakże bardziej szczegółowe badania własności hydrodynamicznych glutenu (29) oraz glutenu i gluteniny (1), występujących w postaci dyspersji w salicylanie sodowym tylko w części potwierdziły ten pogląd, gdyż wykazały, że je-

dynie znaczne różnice w wartości technologicznej mąki związane są z różnicami w właściwościach hydrodynamicznych. Autorzy sądzą więc, że przypuszczalnie układ strukturalny jakiejś określonej frakcji gluteninowej może mieć istotny wpływ na jakość mąki, a oznaczane wartości wypadkowe zespołu białek maskują własności tej zasadniczej frakcji.

Obecnie coraz większą uwagę zwraca się na oddziaływania hydrofobowe pomiędzy łańcuchami niepolarnymi łańcuchów polipeptydowych, jako na ważny czynnik kształtujący właściwości reologiczne ciasta, jednakże brak opracowanej metodyki badawczej nie pozwala na wniknięcie w istotę tego zagadnienia. Tak więc układ różnych wiązań i ich ilości występujące w poszczególnych cząsteczkach kompleksu glutenowego, jak i pomiędzy nimi oraz innymi składnikami niebiałkowymi, ma niewątpliwie wpływ na wartość technologiczną mąki, ale wymaga jeszcze bardziej wnikliwych badań powiązanych z uzyskaniem możliwie czystych frakcji o zachowanej strukturze naturalnej.

Rola i znaczenie struktury molekularnej białek zbożowych w technologii

Układ białkowy mąki jest głównym składnikiem umożliwiającym nadanie ciastu optymalnych cech reologicznych (10, 19, 32, 39). Postęp osiągnięty w badaniach tego układu pozwolił na wprowadzenie ciągłych metod produkcji pieczywa, a nawet na częściową automatyzację procesu technologicznego (32, 39).

Podstawową trudność dla technologii stanowi wytworzenie, w przyjętych warunkach procesu technologicznego, takiej struktury molekularnej matrycy glutenowej ciasta, która byłaby jednakowa w przypadku wykorzystywania surowca o różnej wyjściowej charakterystyce układu białkowego (21). Zadanie technologa polega na takim modelowaniu tej matrycy, aby stanowiła ona siatkę dostatecznie sprężystą i elastyczną, zdolną utrzymać w cieście maksymalną ilość gazów fermentacyjnych, przy równoczesnym równomiernym ich rozmieszczeniu. W zależności od jakości surowca technolog musi podejmować różnokierunkowe działania. Zależy np. o konieczności ochrony pierwotnych właściwości kompleksu glutenowego przed modyfikującym działaniem enzymów proteolitycznych, skutkami oddziaływania mechanicznego i interakcjami z substancjami wprowadzanymi do systemu. Zaznaczyć trzeba, że większość dodatków stosowanych w nowoczesnym piekarstwie, takich jak mleko, tłuszcze, cukry i syropy, izolaty lub koncentraty białkowe roślinne i inne, zawierają składniki wykazujące dużą reaktywność w stosunku do białek zbożowych. Częściej jednak staje się przed koniecznością indukowania odpowiednich zmian strukturalnych tej matrycy. W przypadku posługi-

wania się próbami pszenicy o małej zawartości białek glutenowych, cechujących się tworzeniem matrycy o niskim stopniu usieciowania przestrzennego i niewielkiej odporności na odkształcenia mechaniczne, dąży się do korekty tych właściwości, między innymi przez częściową denaturację białek i obniżenie aktywności proteolitycznej w środowisku (12, 25). Jeżeli natomiast układ białkowy mąki okazuje się zbyt „mocny”, osiąga się optymalną strukturę matrycy glutenowej, stwarzając korzystne warunki dla wzmożonej proteolizy (32), względnie na drodze stopniowego uszkodzenia mechanicznego kompleksu (32, 39) lub przez stosowanie dodatków powodujących jego częściową dezagregację (32, 39). Podstawą modelowania reologicznych właściwości ciasta jest więc właściwe operowanie procesami agregacji, względnie dezagregacji białek wchodzących w skład systemu.

Przedsatwione w części I właściwości białek ziarna zbóż chlebowych i wyróżniająca się labilność struktury glutenowej zależne od warunków i składu systemu nakazują rozpatrywanie glutenu jako swoistego stanu, przyjmowanego przez odpowiednie białka w określonych warunkach (19, 49). Wykazano np., że stan taki nie jest właściwy wyłącznie dla białek ziarna zbóż chlebowych, ale można osiągnąć go również w sposób konwencjonalny, wymywając białka z mąki sporządzonej z nasion niektórych roślin tropikalnych.

W praktyce technologicznej struktura matrycy glutenowej w cieście jest znacznie bardziej złożona, niż wynikałoby to z kombinacji, jakie daje wzajemne oddziaływanie na siebie poszczególnych grup białek zawartych w mące. Dlatego też istnieje potrzeba uwzględniania w prowadzonych badaniach nad systemem, praktycznie wszystkich tych interakcji, do jakich zdolne są substancje białkowe (19). Sądzi się nawet, że zagadnienie interakcji białek z różnymi substancjami niebiałkowymi występującymi w naturalnym surowcu zbożowym, lub wprowadzonymi do mąki w postaci określonych dodatków technologicznych, nabiera charakteru węzłowego w badaniach nad rolą białek w kształtowaniu wartości wypiekowej zbóż chlebowych (19).

Badania interakcji białek zbożowych koncentrują się aktualnie na kilku zagadnieniach.

Stosunkowo zaawansowane są prace nad interakcjami białek zbożowych z innymi białkami roślinnymi, np. soi i innych nasion strączkowych jadalnych, stosowanymi przy produkcji chleba wzbogacanego o podwyższonej wartości biologicznej (32, 39). Obejmuje się także badaniami analogiczne interakcje z białkami mleka (20, 39), które w coraz większym stopniu są wykorzystywane w piekarstwie. Bierze się pod uwagę zarówno białka kazeinowe, jak i laktoglobuliny i albuminy. Kappa-kazeina ze względu na swą szczególną reaktywność oraz β -laktoglobulina stanowią

bardzo interesujące układy modelowe (20). Zmiany właściwości glutenu wywoływane przez te białka są nieproporcjonalnie duże w stosunku do ilości stosowanych dodatków.

Podobnie ważne okazały się rezultaty badań interakcji białek zbożowych z substancjami tłuszczowymi. Lipoproteidowe modele struktury glutenowej okazują się bardzo użyteczne przy wyjaśnianiu wielu cech technologicznych ciasta (19). Zaawansowanie prac nad tymi interakcjami pozwala wykorzystywać optymalnie bogatą gamę emulgatorów i tłuszczów piekarskich, a także znacznie je udoskonalać (32, 39).

W ostatnim okresie zwraca się coraz większą uwagę na zagadnienie interakcji białek zbożowych ze składnikami mąki o charakterze cukrowców. Szczególnie istotne wydają się interakcje z pentozanami i substancjami śluzowymi (22). Znany jest powszechnie fakt, że wymycie glutenu z ciasta żytniego jest możliwe dopiero po obniżeniu naturalnej zawartości substancji śluzowych w próbce (15, 32). Występujące w nadmiarze (jak w ziarnie żyta) uwodnione cząsteczki tych substancji uniemożliwiają, jak się wydaje, dostateczne zbliżenie się do siebie podjednostek białkowych, aby mogły wytworzyć się wiązania wodorowe stabilizujące powstający kompleks. Inaczej przedstawia się sytuacja, jeżeli substancje śluzowe występują w mące w ilościach mniejszych od progowej. Wówczas uczestniczą one w procesie powstawania agregatów białkowych, co sprzyja tworzeniu się bardzo dużych cząsteczek stojących na granicy agregatów gluteninowych i białek nierozpuszczalnych (22). Zbyt szczupły jest jeszcze materiał wynikowy, aby można było snuć bardziej rozwinięte rozważania na ten temat. Nie ulega jednak już dzisiaj wątpliwości, że prace takie będą musiały wejść na dłuższy okres do planu badań krajowych ośrodków zajmujących się chemią białek zbożowych, chociażby z tej przyczyny, iż podstawowym rodzajem chleba produkowanego w Polsce jest chleb pszenno-żytni. Model, jaki stanowi ciasto pszenno-żytnie, jest znacznie bardziej skomplikowany niż w przypadku ciasta pszennego. Kryje on w sobie wiele niewiadomych, a brak opracowań teoretycznych staje się jednym z hamulców postępu technicznego krajowego piekarstwa.

W interakcjach wymienionych typów, prowadzących do powstawania agregatów białkowych, istotne znaczenie mają zmiany równowagi pomiędzy poszczególnymi rodzajami sił strukturalnych. Tak więc należy traktować obecne w białkach reaktywne grupy sulfhydrylowe jako potencjalne miejsca, w których przy zastosowaniu łagodnego utleniania mogą powstać silne kowalencyjne wiązania dwusiarczkowe o podstawowym znaczeniu dla tworzenia stabilnych agregatów (9). Duża energia tych wiązań, przy równoczesnej dużej łatwości przemieszczania się ich

wewnątrz kompleksu pod wpływem kontrolowanego odkształcania mechanicznego, nadaje im wysoką rangę jako możliwości oddziaływania technologicznego. Odpowiednie przesuwanie równowagi, a więc zwiększanie lub obniżanie liczby wiązań dwusiarczkowych w systemie pozwala korygować jego właściwości reologiczne w bardzo szerokich granicach.

Znacznie słabsze od wiązań dwusiarczkowych wiązania wodorowe, występujące jednak w ogromnej ilości w matrycy glutenowej, pełnią, jak sądzi się, rolę pierwszoplanową w wytwarzaniu stanu glutenowego (23, 33, 48). Regulacja stosunków ilościowych w obrębie tych wiązań, w przypadku uformowanego już kompleksu glutenowego, daje jednak mniejsze możliwości korekty właściwości technologicznych systemu, niż przy wiązaniach dwusiarczkowych.

Spośród pozostałych sił strukturalnych duże znaczenie wykazują także wiązania hydrofobowe. Występują one w pewnej ilości w naturalnej matrycy glutenowej. Ilość ta zwiększa się wydatnie po wprowadzeniu do ciasta emulgatorów i preparatów tłuszczowych, pozwalając indukować bardzo subtelne zmiany właściwości reologicznych systemu, prowadzące do doskonałych efektów technologicznych (32, 39).

Byłoby niewskazaniem uproszczeniem rozpatrywać modelowanie matrycy glutenowej z pominięciem roli aparatu enzymatycznego (27, 28, 34, 40, 53). Uformowana matryca glutenowa ciasta ulega w procesie technologicznym poważnym zmianom pod wpływem enzymów proteolitycznych, dla działalności których środowisko ciasta okazuje się bardzo korzystne (32, 39).

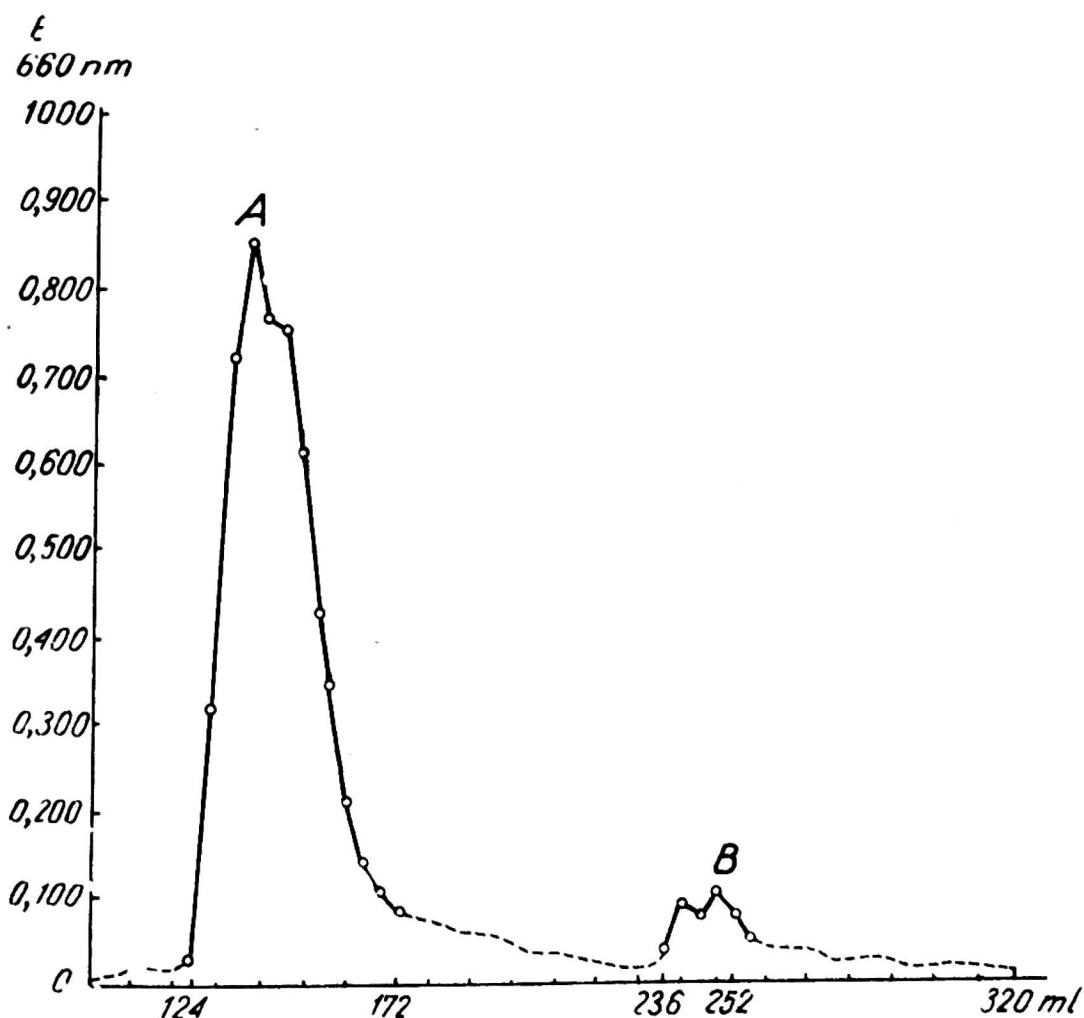
Enzymy proteolityczne ziarna zbóż

Badania nad układem enzymów proteolitycznych ziarna zbóż oraz ich naturalnymi inhibitorami i aktywatorami mają istotne znaczenie zarówno w aspekcie teoretyczno-poznawczym oraz praktycznym.

Te dwie grupy biologicznie czynnych substancji, są związane ściśle z układem białkowym i w stanie naturalnym współdziałają ze sobą. Istota badań teoretycznych nad układem peptydaz i inhibitorów ziarna zbóż (np. pszenicy) wiąże się ponadto ściśle z faktem, że zboże stanowi bardzo dogodny materiał badawczy, mający wszelkie cechy układu modelowego. Użytkowe znaczenie badań nad peptydazami zbożowymi i ich naturalnymi inhibitorami (regulatorami aktywności proteolitycznej) jest ściśle skorelowane z właściwymi dla celów technologicznych cechami reologicznymi ziarna i mąki, np. poprzez mechanizm modyfikujący układ białkowy. Mimo licznych publikacji na temat enzymów proteolitycznych ziarna zbóż, a w szczególności pszenicy (34, 54), ich aktywacji i hamowa-

nia, brak jest do chwili obecnej jednoznacznych ustaleń empirycznych, dotyczących charakteru tych enzymów, pochodzenia, struktury, lokalizacji centrów aktywnych itp.

Badania nad peptydazami ziarna zbóż rozwijane były na przestrzeni lat w związku z zastosowaniem w technologii piekarstwa tzw. ulepszaczy mąki (flour improvers), czyli związków o charakterze utleniającym, jak np. bromianów, jodanów itp. Próby interpretacji mechanizmów ich działania na strukturę układu białkowego pszenicy oparte zostały na dwóch niezależnych hipotezach: 1) hipotezie bezpośredniego wpływu tych związków na strukturę białek ziarna pszenicy, a głównie glutenu, 2) hipotezie Jörgensena (26) oraz Ballsa i Halle (2, 3) zakładającej pośredni wpływ związków utleniających i redukujących oraz specyficznie blokujących grupy sulfhydrylowe na kompleks glutenowy poprzez procesy aktywacji i hamowania enzymów proteolitycznych ziarna.

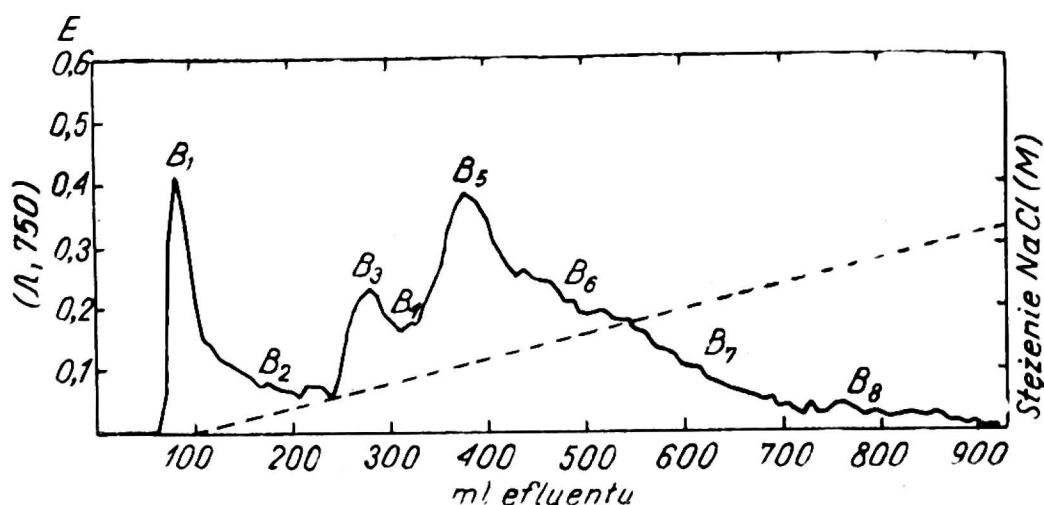


Rys. 4. Chromatograficzny rozdział peptydaz ziarna pszenicy (47) na SE-Sefadeks C 50 w buforze boranowym, pH 9,2; oś pozioma — objętość elucji w ml; oś pionowa — ekstynkcja przy 660 nm

Według Jörgensena wszystkie peptydazy ziarna pszenicy należą do grupy papainy, czego jednak do chwili obecnej nie udokumentowano. Obecnie wiadomo, że rola substancji redukujących w procesie proteolizy glutenu polega nie tylko na aktywacji enzymów proteolitycznych, lecz również na modyfikacji substratu, m. in. w wyniku redukcji jego wiązań dwusiarczkowych, czyli na zmianach w strukturze wtórnej układu białkowego.

Badania Skupina i wsp. (54) nad współzależnością między aktywnością proteolityczną i amylolityczną ziarna pszenicy, a poziomem grup sulfhydrylowych doprowadziły do wyizolowania dwóch peptydaz (A i B), różniących się zarówno zachowaniem w warunkach chromatografii na żelu SE-Sefadeks C 50, jak też ruchliwością elektroforetyczną i składem aminokwasowym (46, 47). Peptydaza A jest dominującym enzymem we frakcji peptydohydrolaz, wyodrębnionych z ziarna pszenicy. Zarówno peptydaza A, jak i B wykazywały aktywność wobec glutenu, jako naturalnego substratu, natomiast specyficzność substratowa tych peptydaz jest nadal sprawą otwartą.

Według badań Mc Donalda i Chena (34) większość białek aktywnych proteolitycznie można wyekstrahować z mąki pszennej wodą przy pH 8,0, względnie buforem octanowym przy pH 3,8. Optymalną aktywność ekstrahowanych peptydaz wobec hemoglobiny jako substratu uzyskuje się według tych autorów przy pH 4,4. Badania wymienionych autorów (34, 47, 54) jednoznacznie wskazują, że tylko część enzymów proteolitycznych obecnych w mące, posiada charakter papainy. Liczne inhibitory trypsyny i chymotrypsyny nie wpływały na aktywność peptydaz mąki. Ponadto



Rys. 5. Rozdział preparatywny na DEAE-celulozie szczytu B albuminy kaszy jęczmiennej po sączeniu molekularnym na Sefadeksie G 75. Wysoką aktywność antytrypsynową zlokalizowano w zakresie pasma wymywania B₇ (52); oś pozioma — objętość elucji w ml, oś pionowa lewa — ekstynkcja przy 750 nm, oś pionowa prawa — stężenie NaCl w M

na uwagę zasługują niezależne stwierdzenia Redmana (40), Kamińskiego (27, 28) oraz Skupina i wsp. (46), że kompleks glutenowy zawiera specyficzne peptydazy wpływające na jego własności reologiczne. Jest oczywiste, że ziarna pszenicy zawierają również szereg innych enzymów proteolitycznych, np. typu aminopeptydaz i karboksypeptydaz, które mogą rzutować na własności użytkowe ziarna i mąki.

Badacze fińscy (31) wyizolowali z ziarna jęczmienia aminopeptydazę, trzy różne karboksypeptydazy oraz dwie peptydylopeptydazy. Stwierdzono efektywność tych enzymów w procesie autolizy słodu, która prowadziła do wolnych aminokwasów, co wpływa korzystnie na właściwości piwa.

Dotychczasowy stan wiedzy nad peptydazami pszenicy wytycza zasadnicze kierunki badawcze, istotne z użytkowego punktu widzenia.

1. Badania nad przynależnością klasyfikacyjną enzymów proteolitycznych ziarna.

2. Ustalenie specyficzności substratowej tych enzymów (określenie ich wpływu na poszczególne białka ziarna, a głównie na układ glutenowy).

3. Ustalenie udziału aktywności proteolitycznej mikroflory wgłębnej i powierzchniowej ziarna w ogólnej aktywności peptydaz zbożowych.

4. Ujednolicenie metod określania aktywności proteolitycznej.

5. Badania nad izoenzymami peptydaz z genetycznego punktu widzenia.

Naturalne inhibitory peptydaz ziarna zbóż

Z problematyką badawczą peptydaz ziarna zbóż wiąże się ściśle zagadnienie roli i funkcji ich naturalnych inhibitorów. Od czasu, gdy Osborn i Mendel wykazali korzystny wpływ podwyższonej temperatury na wartość odżywczą soi, podejmowano liczne badania nad identyfikacją czynników, które mają szkodliwy wpływ i opóźniają wzrost zwierząt karmionych surową paszą roślinną. Obok badań nad białkami soi, wykazującymi głównie funkcję antytrypsynową, liczni badacze poszukiwali analogicznych białek, szczególnie ważnych w roślinach o dużym znaczeniu z żywieniowego punktu widzenia (18, 41). Stwierdzono występowanie takich substancji w fasoli zwykłej, złotej, limeńskiej, bobie, grochu gołębim oraz zbożach, ziemniakach, lucernie siewnej i w innych roślinach. Substancje te mają charakter peptydowy, pełnią rolę naturalnych regulatorów aktywności proteolitycznej oraz mogą wpływać na wartość odżywczą produktów i ich właściwości technologiczne.

Z charakteru i funkcji dotychczas poznanych inhibitorów peptydaz

wynika, że substancje te można również zaliczyć do grupy czynników określających wartość użytkową ziarna zbóż i rozpatrywać w ścisłej korelacji z jego naturalnym składem enzymatycznym.

Zadania badawcze związane z naturalnymi inhibitorami peptydohydrolaz pochodzenia roślinnego, zwierzęcego lub mikrobiologicznego są skomplikowane z uwagi przede wszystkim na labilną strukturę tych substancji, jak również ze względu na fakt, że w warunkach naturalnych mogą one występować w formie kompleksów ze specyficznymi peptydazami.

Spośród inhibitorów naturalnych pochodzenia roślinnego, inhibitory peptydohydrolaz ziarna pszenicy były do niedawna poznane w minimalnym stopniu. W 1964 r. Shyamala i Lyman (42) donieśli po raz pierwszy o wyizolowaniu z ziarna pszenicy inhibitora termolabilnego i o niskiej aktywności antytrypsynowej. Uzyskany inhibitor był prawie jednorodny i zawierał jedynie 1% zanieczyszczeń, prawdopodobnie o charakterze cukrowców.

Badania prowadzone kompleksowo przez Skupina nad układem peptydaz z inhibitorami ziarna pszenicy doprowadziły do wyizolowania w postaci jednorodnej dwóch naturalnych inhibitorów (45). Opracowane dwa różne warianty metodyczne preparatyki inhibitorów prowadziły do uzyskania identycznych substancji. Inhibitory te charakteryzowały się różną ruchliwością elektroforetyczną, różnym składem aminokwasowym oraz ciężarem cząsteczkowym.

Dotychczasowe badania nad inhibitorami peptydaz ziarna pszenicy wskazują na polipeptydowy charakter tych substancji, ich niską aktywność antyproteolityczną, zdolność do tworzenia kompleksów z trypsyną (lecz nie w 100%) oraz zdolność do hamowania autoproteolizy glutenu.

Celem udokumentowania specyficzności wyizolowanych inhibitorów przebadano szereg preparatów enzymatycznych w charakterze układów odniesienia. Z badań wynika, że inhibitory te nie wykazywały żadnej aktywności w stosunku do α -chymotrypsyny i papainy, a niewielką aktywność w stosunku do ficyny i preparatu „Pronaza” ze *Streptomyces griseus*, natomiast najwyższą w przypadku trypsyny. Stwierdzono też, że aktywność proteolityczna surowych preparatów peptydohydrolaz ziarna pszenicy jest tylko w ok. 50% hamowana przez te inhibitory. To empiryczne stwierdzenie sugeruje, że ziarna pszenicy zawierają oprócz enzymów podobnych do papainy, również peptydazy typu trypsyny, a przypuszczalnie również enzymy o jeszcze innym charakterze. Z uwagi na stwierdzony termolabilny charakter omawianych inhibitorów oraz bardzo niski poziom ich występowania w ziarnie pszenicy, można pokusić się o stwierdzenie, że substancje te nie ograniczają wartości odżywczej ziarna pszenicy i jego przetworów, mogą natomiast odgrywać pewną rolę

w technologii piekarstwa. Dotychczasowe badania wskazują jednak na obecność w ziarnie pszenicy większej liczby substancji hamujących naturalne peptydazy. Nadal jest więc otwarty problem ich identyfikacji, mechanizmu działania, funkcji, jak również roli produktów termicznej fragmentacji tych inhibitorów. Niską aktywność antyproteolityczną stwierdza się również w ziarnie jęczmienia. Prowadzone przez Warchalewskiego (51, 52) badania nad charakterem inhibitorów ziarna jęczmienia pozwoliły zlokalizować aktywność antyproteolityczną w albuminach i globulinach. Aktywność ta zanikała w miarę wydłużającego się okresu przechowywania ziarna. Zdolność hamowania rodzimych peptydaz przez te inhibitory może wskazywać na ich rolę fizjologiczną w sterowaniu aktywnością proteolityczną na poziomie wewnątrzkomórkowym, a tym samym na ich wpływ na własności fizykochemiczne białek magazynowanego ziarna czy jego przetworów.

Zakończenie

Przedstawiony w artykule układ białkowo-proteolityczny wraz z towarzyszącymi substancjami regulującymi aktywność peptydaz, występujący w ziarnie zbóż chlebowych, stanowi bardzo złożony zespół czynników, które mają istotne znaczenie w technologii piekarstwa. Charakter białek tworzących podstawową matrycę glutenową, a więc ich wzajemne stosunki i struktura posiada istotne znaczenie w technologii i może być w sposób świadomy modyfikowany przy pomocy zabiegów chemicznych i mechanicznych. Ale równocześnie nie należy zapominać, że wraz z białkiem jest wprowadzany do ciasta cały zestaw enzymów proteolitycznych, wpływających rozluźniająco na białka glutenowe, jak również układ specyficznych inhibitorów znoszących ten wpływ. Znajomość udziału tych wszystkich czynników w kształtowaniu matrycy glutenowej ciasta, a więc i struktury pieczywa, winna być podstawą świadomego działania technologów przemysłu piekarskiego.

Materiał zawarty w tym artykule stanowił treść referatu sympozjalnego, wygłoszonego w ramach Sympozjum „Biochemia w naukach rolniczych” na XI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Białymstoku we wrześniu 1973 r.

LITERATURA

1. Bartoszewicz K., Kączkowski J., Liss W.: Some hydrodynamic properties of gluten and glutenin obtained from flour of different baking quality. Bull. Acad. Polon. Sci. ser. sci. biol 20, 827, 1972,

2. Balls A.K., Halle W.S.: Proteolytic enzymes of flour. *Cereal Chem.* 13, 54 1936.
3. Balls A.K., Halle W.S.: The preparation and properties of wheat proteinase. *Cereal Chem.* 15, 622 1938.
4. Bernacka T., Kączkowski J., Liss W.: The SH/S-S exchange in dispersed gluten. *Bull. Acad. Polon. Sci. ser. sci. biol.* 19, 621, 1971.
5. Bernacka T., Kączkowski J.: The contents of S-S bonds in wheat gluten. *Bull. Acad. Polon. Sci. ser. sci. biol.* 21, 565, 1973.
6. Bietz J. A., Wall J. S.: Wheat gluten subunits; molecular weight determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chem.* 49, 416, 1972.
7. Bietz J. A., Huebner F. R., Wall J. S.: Glutenin — the strength protein of wheat flour. *Bakers Digest.* 47, 26, 34, 67, 1973.
8. Bietz J. A., Wall J. S.: Isolation and characterisation of gliadin-like subunits from glutenin. *Cereal Chem.* 537, 50, 1973.
9. Bloksma A. H.: The role of thiol and disulfide groups in dough rheology. *Reports of the Intern. Assoc. for Cereal Chem, 7th Meeting Vienna, June 1972*, p. 100.
10. Bloksma A. H., Hlynka I.: Basic considerations of dough properties. *Wheat — Chemistry and technology*, St Paul, Minn. 1964, s. 604.
11. Bushuk W., Wrigley C. W.: Glutenin in developing wheat grain. *Cereal Chem.* 48, 448, 1971.
12. Ciesielski T., Jankiewicz M.: Wpływ zabiegów hydrotermicznych (kondycjonowania) na niektóre właściwości biochemiczne i wartość przemysłową pszenicy i żyta. *Roczn. WSR Poznań* 28, 9, 1965.
13. Ewart J. A. D.: Recent research and dough visco-elasticity. *Reports of the Intern. Assoc. for Cereal Chem, 7th Meeting, Vienna June 1972*, s. 108.
14. Ewart J. A. D.: Further studies on S-S bonds in cereal glutelins. *J. Sci. Food Agric.* 23, 567, 1972.
15. Golenkow W. F.: K woprosu ob usłowijach formirowanija rżanoj klejkowiny. *Biochimija Ziarna i Chlebopieczeniya*, Sb. 6, Izd. AN ZSRR 1960, s. 156.
16. Graham J. S. D., Jennings A. C., Morton R. K., Palk B. A., Raison J. K.: Protein bodies and synthesis in developing wheat endosperm. *Nature (London)*, 196, 197, 1962.
17. Huebner F. R., Donaldson G. L., Wall J. S.: Unique compositional differences between glutenin subunits. *Cereal Chem.* 51, 1974 (w druku).
18. Janicki J., Warchalewski J., Skupin J., Kowalczyk J.: Inhibitory trypsyny pochodzenia roślinnego. *Post. Biochem.* 16, 101, 1970.
19. Jankiewicz M.: *Białka w technologii zbóż*. Wyd. Przem. Lekkiego i Spoż. Warszawa 1968, s. 142.
20. Jankiewicz M., Kędzior Z.: Interakcje typu białko-białko w modelowym cieście pszennym wzbogaconym wybranymi białkami mleka (w przygotowaniu do druku).
21. Jankiewicz M., Krawczyk-Szmytkowska L.: Rola albumin w kształtowaniu właściwości fizykochemicznych układu białkowego ciast modelowych (w przygotowaniu do druku).
22. Jankiewicz M., Michniewicz J.: Rola pentozanów rozpuszczalnych w kształtowaniu właściwości fizykochemicznych układu białkowego ciast modelowych (w przygotowaniu do druku).

23. Jankiewicz M., Pomeranz Y.: Comparison of the effects of N-methylmaleimide and urea on rheological properties of dough. *Cereal Chem.* 42, 37, 1965.
24. Jankiewicz M., Pomeranz Y.: Isolation and characterisation of wheat flour proteins. I. Separation of salt- and acetic acid dispersible proteins by gel filtration, polyacrylamide gel electrophoresis and sucrose gradient centrifugation. *J. Sci. Food Agr.* 16, 644, 1965.
25. Jankowski S., Jankiewicz M., Hamburger Z.: Zmiany w stanie białka i aktywności proteolitycznej w czasie kondycjonowania pszenic. *Roczn. WSR, Poznań* 8, 39, 1960.
26. Jørgensen N.: Further investigations into the nature of the action of bromates and ascorbic acid on the baking strength of wheat flour. *Cereal Chem.* 16, 51, 1939.
27. Kamiński E., Bushuk W.: Wheat proteases. I. Separation and detection by starch gel electrophoresis. *Cereal Chem.* 46, 317, 1969.
28. Kamiński E., Bushuk W.: Detection of multiple forms of proteolytic enzymes by starch gel electrophoresis. *Canad. J. Biochem.* 46, 1317, 1969.
29. Kączkowski J., Wakar A. B., Demidow W. S., Zabrodina T. M.: Influence of D₂O on the viscosimetric properties of wheat gluten dispersions. *Bull. Acad. Polon. Sci. ser. sci. biol.* 15, 473, 1968.
30. Kerber E. R., Tipples K. H.: Effects of D genome on milling and baking properties of wheat. *Canad. J. Plant Sci.* 49, 255, 1969.
31. Kolehmainen L., Mikola J.: Partial purification and enzymatic properties of an aminopeptidase from barley. *Arch. Biochem. Biophys.* 145, 633, 1971.
32. Kozmina N. P.: *Biochimija Chlebobiečenja*. Izd. Piszczewaja Promyszl. Moskwa 1971, s. 439.
33. Kretowicz W. L.: The role of hydrogen bonds in the structure of grain biopolymers. Reports of the Intern. Assoc. for Cereal Chem. 7th Meeting, Vienna, June 1972, s. 52.
34. McDonald C. E., Chen L. L.: Properties of wheat flour proteinases. *Cereal Chem.* 41, 443, 1964.
35. Meredith O. B., Wren J. J.: Determination of molecular weight distribution in wheat flour proteins by extraction and gel filtration in a dissociating medium. *Cereal Chem.* 43, 169, 1966.
36. Orth R. A., Bushuk W.: A comparative study of the proteins of wheats of diverse baking qualities. *Cereal Chem.* 49, 268, 1972.
37. Pence J. W., Nimmo C. C., Hepburn F. N.: *Proteins w: Wheat — chemistry and technology*, St Paul, Minn. 1964, s. 604.
38. Pomeranz Y.: A review of recent studies of wheat flour lipids in bread making. *Bakers Digest* 40, 44, 77, 1966.
39. Pomeranz Y.: Relation between chemical composition and bread-making potentialities of wheat flour. *Adv. Food Res.* 16, 335, 1968, Acad. Press, New York.
40. Redman D. G.: Softening of gluten by wheat proteases. *J. Sci. Food Agric.* 22, 75, 1971.
41. Sawaryn A.: Naturalne inhibitory enzymów proteolitycznych. *Post. Hig. i Med. Dośw.* 23, 787, 1969.
42. Shyamala G., Lyman R. L. The isolation and purification of a trypsin inhibitor from wholewheat flour. *Canad. J. Biochem.* 42, 1825, 1964.
43. Simmonds D. H., Winzor D. J.: Chromatography of the proteins from wheat flour soluble in acetic acid. *Nature (London)* 189, 306, 1961.

44. Simmonds D. H.: The ultrastructure of the nature wheat endosperm. *Cereal Chem.* 49, 212, 1972.
45. Skupin J.: Izolacja i charakterystyka inhibitorów proteaz z ziarna pszenicy. *Materiały I Sesji Kom. Techn. i Chemii Żywn. PAN Warszawa, 1970, s. 141.*
46. Skupin J., Rosińska K., Skupin A., Warchalewski J.: Sulfhydryl nature of wheat grain protease B. *Bull. Acad. Polon. Sci. ser. sci. biol.* 14, 397, 1966.
47. Skupin J., Warchalewski J.: Isolation and properties of protease A from wheat grain. *J. Sci. Food. Agric.* 22, 11, 1971.
48. Tkachuk R., Hlynka I.: Some properties of dough and gluten in D₂O. *Cereal Chem.* 45, 242, 1968.
49. Tracey M. W.: Gluten new light no an old protein. *Cereal Sci. Today* 12, 193, 196, 214, 1967.
50. Wakar A. B., Kretowicz W. L., Demidow W. S.: Changes of gluten and dough rheological properties induced by D₂O. *Studia Biophys.* 4, 85, 1967.
51. Warchalewski J., Skupin J.: Isolation and properties of trypsin and chymotrypsin inhibitors from barley grits after storage. *J. Sci. Food. Agric.* 24, 995, 1973.
52. Warchalewski J.: Porównanie właściwości antyproteolitycznych białek jęczmienia i kaszy jęczmiennej podczas przechowywania. *Przem. Spoż.* 26, 395, 1972.
53. Wierzbowski J.: Rola grup sulfhydrylowych w aktywności enzymatycznej ziarna pszenicy. *Roczn. WSR Poznań* 35, 119, 1967.
54. Wierzbowski J., Skupin J.: Determination of the relationship between sulfhydryl group and amylolytic and proteolytic enzymes in wheat and wheat flour. *Final Techn. Report FG-Po-109, Dept. of Food Biochem. Academy of Agriculture Poznań, 1964.*
55. Wrigley C. W.: The wheat protein complex and its genetic controls. *Reports of the Intern. Assoc. for Cereal Chem., 7th Meeting, Vienna, June 1972, s. 95.*
56. Wu Y. V., Cluskey J. E., Sexson K. R.: Effect of ionic strenght on the molecular weight and conformation of wheat gluten proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 133, 83, 1967.