

# Elektroforeza gliadyn – nowa metoda oznaczania odmianowego składu partii pszenic handlowych

A. BOURDET, J. C. AUTRAN \*)  
Paryż

Od szeregu lat młynarstwo przywiązuje rosnące znaczenie do odmianowego charakteru przetwarzanych pszenic. Od czasu ukazania się na rynku nowych odmian pszenic, wysoko wydajnych, z których mąki nadają się do wypieku chleba tylko z wielkim trudem (niektóre w ogóle nie nadają się do użycia), pośrednie kryteria, na których podstawie młynarze oceniali dotychczas jakość surowca okazały się nie wystarczające, jeżeli nie wręcz błędne.

Poważnie zaniepokojone nadmiernym wzrostem produkcji takich pszenic, młynarstwo reprezentuje pogląd, że m. in. ze względu na wahania powodowane względami agro-klimatycznymi tylko kryterium odmianowości może zagwarantować poziom technologicznej jakości. Tylko rozróżnienie odmian może pozwolić na odróżnienie pszenic nadających się do produkcji chleba od innych, do wyłącznego skarmienia zwierzętami.

Wydaje się, że przyjęła się już koncepcja oparcia stosunków między producentami i przechowalnikami oraz między przechowalnikami i młynarzami na deklarowaniu składu odmianowego poszczególnych partii pszenic. Odpowiednie deklaracje, pociągające za sobą nieuniknione zróżnicowanie cen, muszą być oczywiście przedmiotem odpowiedniej kontroli, w celu zagwarantowania pełnej prawdziwości wystawianych atestów. Problem nabrał szczególnego znaczenia dla gospodarki francuskiej od chwili zniesienia wszelkich ograniczeń w lenie EWG. Stąd więc pszenice dopuszczone we Francji do uprawy i handlu (było ich dotychczas 80 odmian) powiększyły się o dalszych 150–160 odmian pszenicy będących przedmiotem uprawy i obrotu w innych krajach wspólnoty.

Rozpoznawanie odmian nie jest problemem nowym. Opracowano liczne metody, pozwalające na badanie bądź roślin bądź ziarna, a niektóre spośród nich stosowane są po dzień dzisiejszy. Identyfikacja w trakcie wegetacji na podstawie niektórych właściwości botanicznych, np. pokroju rośliny, uwłosienia liści czy barwy pylników jest zapewne metodą najobiektywniejszą, ale wymagającą od pracowników wielkiego doświadczenia i rutyny. W doświadczalnych szklarniach można też posłużyć się kryteriami fizjologicznymi, np. reakcją roślin na niektóre fungicydy. Laboratoryjne badania zarodków po wykiełkowaniu opierają się na takich szczególnych właściwościach, jak uwłosienie dwu pierwszych liści czy też zabarwienie koleoptylu w sztucznym świetle, które to zabarwienie obejmuje gamę od bezbarwności aż po purpurę.

Metody badania samego ziarna pszenicy wykorzystują niektóre właściwości morfologiczne i fizyczne: długość i szerokość ziarna, długość tarczki i bródki, barwę (czerwoną lub białą), strukturę (mączystą lub szklaną), twardość, masę 1000 ziarn. Wybarwienie ziarna fenolem pozwala na podział odmian na cztery kategorie (klasy), na podstawie zaobserwowanego zabarwienia: czarnego, ciemnobrunatnego, brązowego i jasnobrązowego. Metoda ta znajduje szerokie zastosowanie zwłaszcza do kontroli czystości odmianowej materiału siewnego.

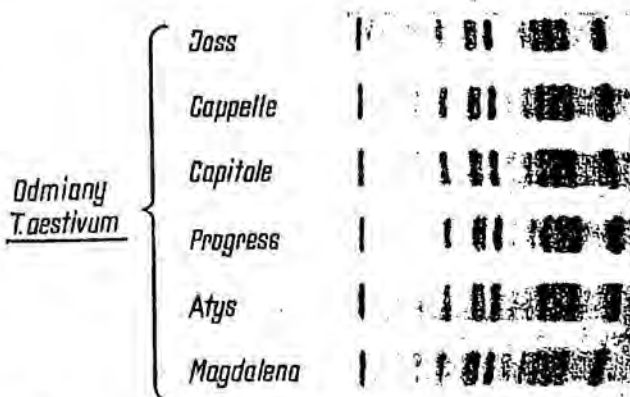
Wszystkie wymienione metody są czasochłonne. Niektóre spośród badanych cech i właściwości, a szczególnie

morfologiczne i fizyczne właściwości ziarna w wysokim stopniu zależą od czynników środowiskowych (agro-klimatycznych itd.). Ponadto, metody te pozwalają tylko na rozróżnienie klas (kategorii) odmian, stąd też ich specyficzność jest w wysokim stopniu ograniczona. Jest bowiem oczywiste, że cztery klasy, których rozróżnienie jest możliwe za pomocą testu fenolowego, nie pozwalają na rozpoznanie każdej spośród 80 odmian figurujących w rejestrze pszenic francuskich, a tym bardziej mieszanin odmianowych, z jakich składa się ogromna większość składowanych partii. Niedostateczna specyficzność tych testów sprawia, że dające wskazania pozostające wyłącznie w sferze przypuszczeń i zawsze pozbawione pewności wypowiedzi.

Rozpoznanie odmian nie jest zatem łatwym problemem do rozwiązania, ponieważ wymaga m. in. bardzo wysokiego poziomu specjalizacji; kryteriów do zastosowania i jednocześnie całkowitej niezależności od czynników środowiskowych. W tej sytuacji rozwiązania problemu wypadło szukać w składnikach ziarna o właściwościach fizykochemicznych genetycznie (przypuszczalnie) niezmiennych. Ze względu na złożoność chemiczną i strukturalną oraz na przenoszenie cech dziedzicznych, najpodatniejsze do tych celów wydały się być białka. Za ich wykorzystaniem przemawiała poza tym praktycznie nieograniczona możliwość rozmaitych kombinacji, jakie mogą tworzyć oraz ich rola jako znaczników genetycznych.

Literatura ostatniego 15-lecia szeroko wymienia liczne prace poświęcone specyficzności genetycznej białka roślinnego, a szczególnie białek zbóż i pszenicy. Własne prace wykonane w tym samym okresie wykazały, że nie wszystkie białka pszenicy charakteryzują się tym samym poziomem specyficzności genetycznej.

Porównanie histonów wyizolowanych z zarodków rozmaitych odmian pszenicy miękkiej i poddanych frakcjonowaniu elektroforetycznemu, wykazało wielkie podobieństwo budowy (rys. 1) (Autran, Bourdet 1971). Nie stwierdza się też więcej



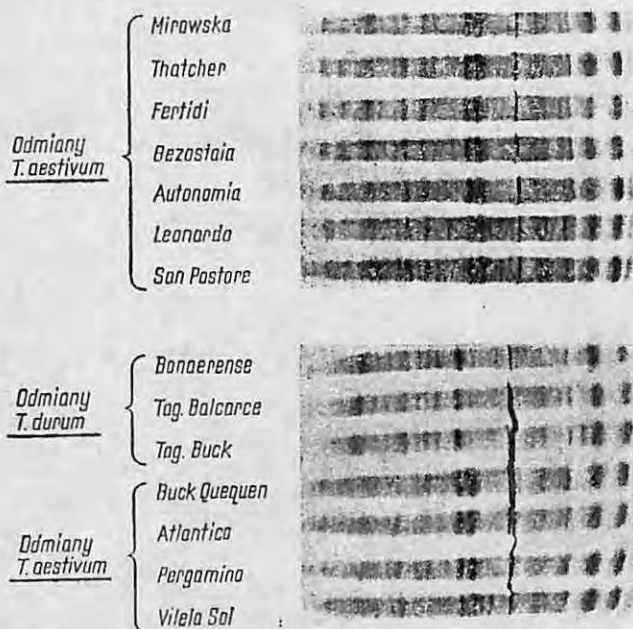
Rys. 1. Skład elektroforetyczny histonów zarodka pszenicy (żółty poliakrylamidowy, pH 3,2)

\*) Institut National de la Recherche Agronomique (Państwowy Instytut Badań Rolniczych). Laboratoire de Recherches sur la qualité des blés (Laboratorium badawcze jakości pszenic), Paryż

różnic znaczących, gdy porównuje się histony różnych pszenic twardych. Podobne stwierdzenia obserwuje się także u innych rodzajów *Triticum* (*T. compactum*) oraz u *Aegilops*, *Hordeum* i *Secale*. Świadczy to o całkowitym braku genetycznej specyficzności takich białek (Autran 1973).

Białka „rozpuszczalne” typu albumin i globulin również nie wykazują specyficzności odmianowej. Różne odmiany pszenicy miękkiej dają elektroforegramy całkowicie do siebie podobne (Feillet, Bourdet 1967). To samo podobieństwo obserwuje się także w przypadku pszenic twardych. Natomiast porównanie na tym samym elektroforegramie rozpuszczalnych białek pszenicy miękkiej i twardej wskazuje na różnice konstytucyjne między *T. aestivum* i *T. durum* (rys. 2). Na podstawie tych właśnie różnic niektórzy autorzy zaproponowali elektroforezę rozpuszczalnych białek do wykrywania obecności pszenic miękkich w partiach pszenicy twardej, przeznaczonej do produkcji kaszek makaronowych. Specyficzność genetyczna białek typu albumin i globulin w pszenicy ogranicza się więc wyłącznie do rodzajów.

Badanie niektórych białek enzymatycznych wykazało rozmaite poziomy specyficzności odmianowej. Frakcjonowanie elektroforetyczne esteraz ekstrahowanych z różnych odmian

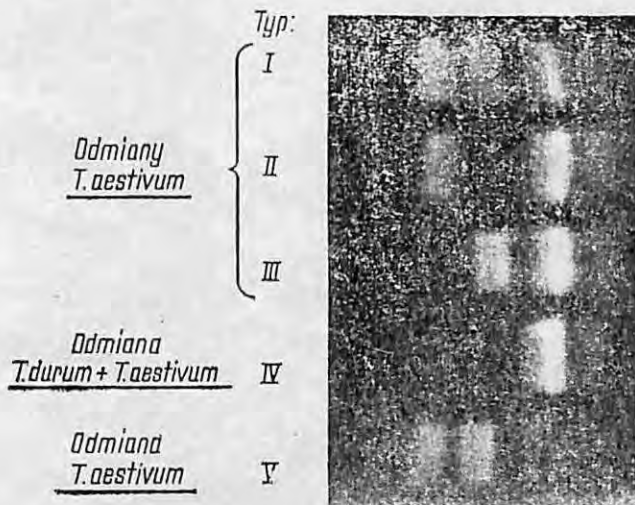


Rys. 2. Skład elektroforetyczny albumin i globulin pszenic miękkich i twardych (żel skrobiowy, pH 8,9)

doprowadziło do identycznych elektroforegramów. Peroksydazy kwasowe wykazały 7 odrębnych typów (Kobrehel, Coll 1974). Elektroforegramy β-amilaz pozwoliły rozróżnić 5 typów (Jourdrier 1974) (rys. 3). Wykorzystanie niektórych białek funkcjonalnych jako znaczników genetycznych prowadzi do specyficzności wysoce niewystarczającej — podobnie jak w przypadku fenolu — do indywidualnego rozpoznania poszczególnych odmian.

Na obecnym etapie znajomości zagadnienia wyłącznie gliadynowa frakcja białka ziarna wydaje się mieć specyficzność dostatecznie dużą do rozpoznawania i identyfikacji odmian. Pierwsze próby elektroforetycznego frakcjonowania gliadyn podjęliśmy ok. 1960 r. Posługiwaliśmy się wówczas bibułą, która pozwalała na scharakteryzowanie, nie bez trudu, 3 lub 4 pasm białkowych. Bibułę zastąpiliśmy szybko żelem skrobiowym, zaproponowanym ok. 1955 r. przez Smithies'a. Zastosowanie metody Smithies'a do gliadyn pszenicy było interesujące już na podstawie pierwszych prac angielskich

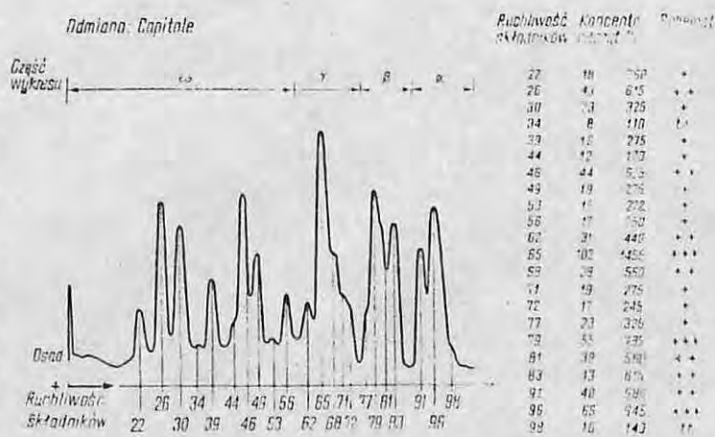
(Coulson i Sim 1961, Elton i Ewart 1962) i amerykańskich (Woychick i Coll 1961). Nasza pierwsza informacja (Bourdet i Coll) o elektroforetycznym zachowaniu się prolamin pszenicy na żelu skrobiowym została opublikowana w 1963 r., tj. w tym samym czasie, w którym australijczycy Lee i Wrigley ogłosili wyniki pierwszych prób na żelu poliakryloamidowym.



Rys. 3. Typ polimorfizmu izoenzymów B-amilaz, obserwowany w pszenicach miękkich i twardych (żel poliakryloamidowy, pH 3,2)

W dalszym ciągu pozostawało do wykazania, że proteinogramy gliadyny były constans w odniesieniu do każdej odmiany i nie ulegały zmianom ani pod wpływem warunków agroklimatycznych (miejsce i rok uprawy), ani wskutek zabiegów uprawowych (nawożenie azotowe, gęstość siewu, zastosowanie fungicydów itd.). Wykresy gliadyn pozostawały wreszcie identyczne bez względu na histologiczne pochodzenie rozmaitych części ziarna (bielmo, łupina, zarodek) (Bourdet, Autran 1974).

Frakcjonowania uzyskane w ciągu minionych 10 lat przez różne zespoły amerykańskie, radzieckie, angielskie i holenderskie, ze zmiennymi zresztą wynikami co do rozdzielczości, wykorzystano przede wszystkim do badań podstawowych, z pominięciem wszelkiej aplikacji. Stwierdzono wprawdzie, że diagramy gliadyn są jakościowo różne w zależności od odmiany, napotkano jednak na trudności w wykorzystaniu ich do celów praktycznych. Poszukiwaniem możliwości takiego wykorzystania zajął się Autran w 1971 r.



Rys. 4. Densytometria elektroforegramu gliadyny i schematyzacja typowego wykresu

Przede wszystkim sprawdził on wszystkie parametry doświadczalne w celu ustalenia postępowania gwarantującego doskonałą powtarzalność metody. W dalszym ciągu dokonał on inwentaryzacji jakościowej pasm gliadyny spotykanych w bardzo zróżnicowanym zespole odmian (ponad 400 różnych próbek). W ten sposób udało mu się zinwentaryzować 43 składniki znacząco rozróżnialne dzięki ich ruchliwości.

Uzyskane dane jakościowe skwantyfikowano przez densytopetrię wykresów w celu określenia względnej koncentracji każdego ze składników. W ten sposób dla każdej z badanych odmian otrzymano typowy wykres gliadynowy, zdefiniowany ruchliwością i względnymi koncentracjami różnych składników. W następnym etapie wykres typowy uległ uproszczeniu przez zastosowanie skali oznaczeń ilościowych (rys. 4); inspiracją do tego uproszczenia był system Dedio i Coll'a (1969), stosowany do polifenolowych związków roślinnych.

Na podstawie wyłącznie zaobserwowanych różnic znaczących ustalono wreszcie system, zbudowany na wzór klucza botanicznego, pozwalający na jednoznaczne znalezienie nazwy odmiany tylko według wizualnej oceny otrzymanego wykresu. Dla wszystkich pszenic miękkich i twardych figurujących w rejestrze francuskim (89 odmian) sporządzono tabelę chemotaksonomiczną (Autran, Bourdet 1975). Tabelę taką sporządzono też dla głównych odmian (80) uprawianych w państwach wspólnoty gospodarczej (Autran 1975). Około 95% zbadanych odmian daje wykresy znacząco zróżnicowane; można je identyfikować na podstawie wyłącznie „próby gliadynowej”. Jest tylko kilka odmian rzadko występujących, genetycznie bardzo bliskich, których nie

można rozpoznać indywidualnie. Trzeba wreszcie dodać, że metodę można stosować do wszystkich pszenic będących w uprawie, zarówno miękkich, stosowanych w piekarstwie, jak i twardych przeznaczonych do produkcji makaronów (rys. 5). Metoda elektroforezy gliadyn, tak jak ją aktualnie się określa, pozwala na potwierdzenie identyczności oczekiwanej odmiany w partii jednolitej odmianowo, bądź na zidentyfikowanie nieznannej odmiany. Przedmiotem badania jest wówczas odpowiednia ilość ześrutowanego ziarna lub mąki.

W przypadku występowania mieszaniny o składzie odmianowo nieznanym, co jest powszechne w odniesieniu do partii składowanych po zbiorach, można zidentyfikować poszczególne odmiany występujące w partii oraz ich udział w mieszaninie. W tym celu należy pobrać reprezentatywną mikropóbkę i badać ją ziarno po ziarnie. Precyzja wyników takich określeń rośnie oczywiście z wielkością próbki (liczbą badanych ziarn). Jeżeli pragnie się wykryć w mieszaninie przynajmniej jedno ziarno odmiany najsłabiej reprezentowanej w partii (granica 5–6%) z prawdopodobieństwem 95%, przedmiotem badania musi być ok. 50 ziarn.

W obecnej fazie zastosowań laboratoryjnych wyniki za pomocą opisanej metody otrzymuje się po 24...36 godzinach. W ciągu takiego czasu można zbadać do 48 próbek odmianowo jednolitych. W tym samym czasie możliwe jest zbadanie jednej próbki 48-ziarnowej lub 6 próbek 8-ziarnowych z partii mieszanych; wielkość badanych próbek zależy wyłącznie od żądanej, z góry założonej precyzji.

Koszt wyposażenia laboratorium w sprzęt do analizy odmian jest skromny i zamyka się kwotą ok. 10 000 F (ok. 2000 \$). Liczba zatrudnionych i związane z tym koszty, zależne są od liczby analiz i częstości ich wykonywania.

Według posiadanych informacji, w chwili obecnej wyłącznie australijskie prace CIRO w North Ryde są potraktowane podobnie praktycznie jak i francuskie i są przedmiotem upowszechnienia (Wrigley, Baxter 1974).

Projekty automatyzacji, będące w chwili obecnej przedmiotem rozważań wspólnych z firmą TECHNICON, zakładają skrócenie operacji i dwudziestokrotne zwiększenie aktualnych możliwości.

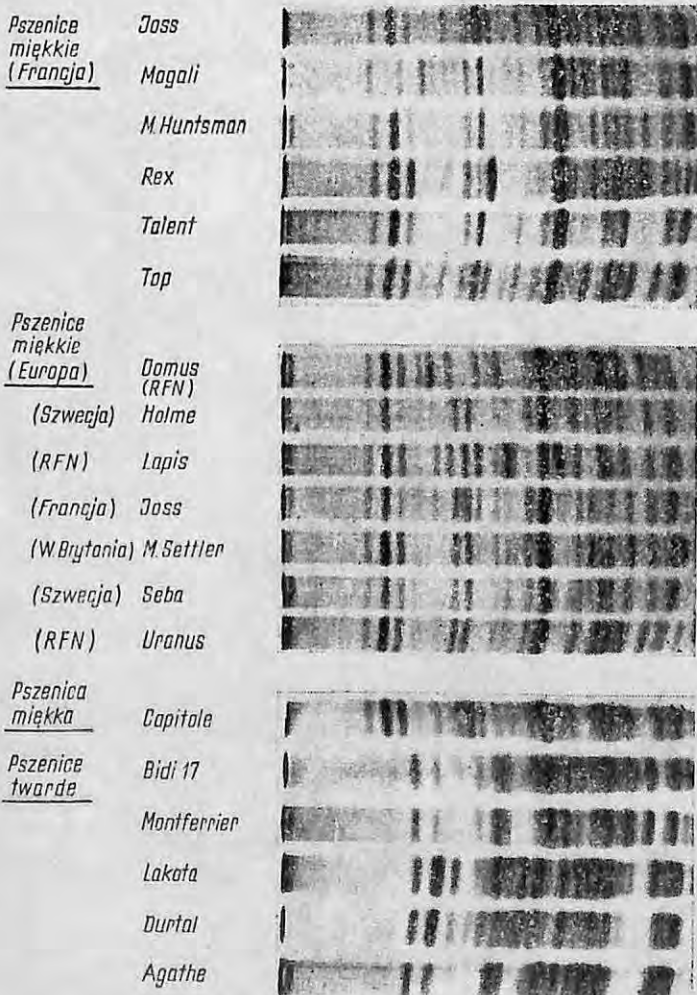
Trzeba wszakże podkreślić, że sama zasada niniejszej metody i pewne nakazy wynikające z zastosowanej techniki, nie pozwalają na błyskawiczną kontrolę odmian w momencie dostaw ziarna do przechowalni. Metodę można zatem traktować wyłącznie jako sposób badania *a posteriori*.

W miarę wprowadzania kontroli odmian bezpośrednio na obszarach uprawnych elektroforeza gliadyn oddziaływać będzie w sposób zapewne dostatecznie przekonujący, by już w trakcie skupu oddzielać odmiany przeznaczone na mąki dla piekarstwa, od odmian do skarmienia zwierzętami.

Przed mniej więcej 20 laty wykorzystano w medycynie elektroforezę w celu wykrywania — drogą badania białek — zmian różnych środowisk biologicznych, wywołanych przez rozmaite choroby. Zastosowanie elektroforezy do badania pszenic jest osiągnięciem także wielkiej miary. Pozwala ono bowiem wykluczyć z przetwórstwa ziarno nieodpowiedniej jakości, z którego mąka nie nadaje się do produkcji pieczywa, a tym samym nie dopuścić do pogorszenia jakości jednego z najważniejszych artykułów żywnościowych.

## LITERATURA

- Autran J. C.: Les désoxyribonucléoprotéines et les histones du grain de blé. Praca doktorska. Université de Paris VI, czerwiec 1973.
- Autran J. C.: Bull. Anc. Et. E.F.M. 1975, 270, 3–11
- Autran J. C., Bourdet A.: C.R. Acad. Sc, Paris 1971, 272, 2732–2735
- Autran J. C., Bourdet A.: Ann. Amélior. Plantes 1975 a, 25 (3), 277–301



Rys. 5. Skład elektroforetyczny gliadyn różnych odmian pszenic miękkich i twardych (żel skrobiowy, pH 3,2)

Autran J. C., Bourdet A.: C.R. Acad. Agric. 1975 b (w druku); Techn. Ind. Céréal. 1975, 150, 7-13

Bourdet A., Fellet P., Meltavant F.: C.R. Acad. Sc. Paris 1963, 256, 4517-4520

Bourdet A., Autran J. C.: Proteins and nucleic acids in the wheat grain, its milled products and germs. IV Int. Congress Food Sc. Technol., Madrid 1974, S-1C

Coulson C. B., Sim A. K.: Biochem. J. 1961, 80, 46-47

Dedio W., Kaltsikes P. J., Larter E. N.: Canad. J. Bot. 1969, 47, 1175-1180

Elton G. A. H., Ewart J. A. D.: J. Sc. Food Agric. 1962, 13, (1), 62-72

Fellet P., Bourdet A.: Bull. Soc. Chim. Biol. 1967, 49, (10), 1273-1283

Joublier P.: C.R. Acad. Sc. Paris 1971, 278, 1777-1780

Kobrehel K., Vicedo S., Fellet P.: Variabilité de la composition en peroxydases et en phosphatases acides des blés et espèces voisines. Symposium franco-soviétique. Montpellier 1974, 30-34

Lee J. W., Wrigley C. W.: Austr. J. Expt. Agr. Anim. Husb. 1963, 3 (9), 85-88

Woychick J. H., Boundy J. A., Dimler R. J.: Arch. Biochem. Biophys. 1961, 94, 477-482

Wrigley C. W., Baxter R. I.: Austr. J. Expt. Agr. Husb. 1974, 14, 805-810

Spolszczył i opracował A. Hanftwurcel

## z pracowni naukowych

# Badania nad ustaleniem warunków otrzymywania mąk wysokobiałkowych z grochu metodą suchą

TADEUSZ JAKUBCZYK, RYSZARD SMERECZYŃSKI  
HENRYK PIESIEWICZ, ZOFIA CZARNECKA  
Instytut Technologii Żywności SGGW-AR  
Warszawa

Jedną z podstawowych dróg wyrównania niedoboru białka w wielu rejonach świata jest racjonalne wykorzystanie surowców roślinnych jako źródła białka. Na szczególną uwagę jako potencjalne źródło białka roślinnego zasługują w klimacie umiarkowanym zboża oraz rośliny strączkowe jadalne. Spośród roślin strączkowych mało uwagi poświęcono dotychczas nasionom grochu.

Uprawiane obecnie odmiany grochu zawierają 22-26% białka i plonują na poziomie 20-30 q/ha. Na wysoką przydatność grochu do celów żywieniowych składa się ponadto znaczna ilość w białku tych nasion aminokwasów egzogennych, ustępująca spośród roślin uprawnych tylko białku soi<sup>1</sup>. Do czynników ograniczających dotychczasowe spożycie grochu należy stosunkowo wysoka zawartość błonnika, pentozanów i hemiceluloz oraz obecność węglowodanów powodujących zaburzenia jelitowe.

Wzrost spożycia grochu jest możliwy m. in. w przypadku takiego przerobu, który pozwoliłby na otrzymanie produktu o wyższej zawartości białka i o niższej zawartości składników niepożądanych. Jedną z możliwości jest otrzymywanie koncentratów białkowych z grochu m. in. na drodze suchej. Pierwsze prace z tego zakresu przeprowadził Hess<sup>7,8</sup> w latach 1951-52

rozdrabniając groch w młynie udarowym lub kulowym, a następnie frakcjonując mlewo za pomocą pneumatycznego sortownika. Na podstawie tych badań ustalono, że tą metodą łatwiej jest wyodrębnić białko z nasion roślin motylkowych niż z ziarna zbóż, m. in. ze względu na:

- wyższą zawartość białka,
- grubsze elementy anatomiczne białka,

- większy stosunek białka wypełniającego do białka przylegającego.

Rezultatami badań Hessa zainteresowali się w pierwszej kolejności specjaliści z przemysłu zbożowo-młynarskiego, w związku z wykazaniem przez niego, że na drodze suchej separacji mąki pszennej można uzyskać żądane cechy technologiczne produktu, nawet z surowca o niskiej wartości użytkowej. Do dzisiaj wykonano dziesiątki prac z zakresu powietrznej segregacji mąki pszennej<sup>2,3,4,6,9,10,13,11,18</sup>, których tematyka koncentrowała się głównie wokół następujących zagadnień:

- oceny przydatności różnych młynów i separatorów pneumatycznych do produkcji mąk nisko- i wysokobiałkowych,
- mechaniki sortowania mąki pszennej na frakcje nisko- i wysokobiałkowe,

- oceny różnych odmian pszenicy jako surowca do produkcji mąk wysokobiałkowych,

- ustalenie sposobów otrzymywania mąk wysoko- i niskobiałkowych w warunkach tradycyjnego przemiału i transportu mąki,

- analizy wartości odżywczej mąk uzyskiwanych na drodze pneumatycznej separacji,

- zastosowania mąk wysokobiałkowych w przemyśle spożywczym.

Próby pneumatycznego sortowania mąki grochowej w skali większej niż laboratoryjna podjęto dopiero kilka lat temu<sup>19,17</sup>. Istotne rezultaty w tej dziedzinie osiągnął ośrodek National Research Council w Kanadzie<sup>17</sup>. Metoda sucha, opracowana przez ww ośrodek, polega na rozdrabnianiu grochu w młynie bijakowym, a następnie na sortowaniu uzyskanego mlewa na 2 frakcje w sortowniku pneumatycznym. Frakcję skrobiową (której uzyskano ok. 75%) o zawartości białka ok. 8% ponownie rozdrabniano i sortowano. Ostatecznie uzyskiwano w ten sposób 35% koncentratu białkowego o zawartości 50-60% białka i 65% koncentratu skrobiowego o zawartości 2,5% białka. Do otrzymywania ww produktów na skalę przemysłową wykorzystywano urządzenia produkowane przez firmę Alpine American Corporation.

Czynione są także próby otrzymywania koncentratów białkowych na drodze suchej z wielu innych surowców roślinnych. Tookey i współprac.<sup>16</sup>, prowadząc badania nad możliwością otrzy-