

BÚZAFEHÉRJÉK GYORS MÓDSZEREKKEL TÖRTÉNŐ MEGHATÁROZÁSÁNAK TANULMÁNYOZÁSA

DR. KOVÁCS ERZSÉBET*—DR. LÁSZTITY RADOMIR**

A búzaliszt táplálkozáséletteni szempontból egyik legfontosabb komponense a fehérje, amelynek mennyisége és minősége döntő mértékben befolyásolja a liszt felhasználhatóságát. A fehérjetartalom tehát a búzaliszt fontos és jellemző adata.

A fehérjetartalom mennyiségi meghatározására szolgáló időigényes, klasszikus Kjeldahl-eljárással szemben egyre inkább tért hódítanak a gyors módszerek, különösen azok, amelyek alkalmasak arra, hogy automatikusan működő műszerek konstruálásához felhasználhatók. Erre a célra, mind a biuret, mind a Lowry-módszer alkalmas. Így fontos azon tényezőknek a vizsgálata, amely ezen módszerek gyakorlati alkalmazhatóságát, pontosságát befolyásolják. Ilyen tényező a gabonafehérje-meghatározás esetében a fehérje minőségi összetételében mutatkozó különbségek, pl. a különböző molekulásúlyú fehérjefrakciók.

Gabonafehérjefrakció mennyiségi meghatározására viszonylag kevés adat van az irodalomban. Noll, Simmonds és Bushuk alkalmazták fehérjefrakció mennyiségi meghatározására a biuret-eljárást. Az egyes frakciók színárnyalatában különbség mutatkozott. Ezt a jelenséget Johnson és Craney, Misra és munkatársai, valamint Greenaway is észlelték. Iennings utalt arra, hogy Lowry-eljárásnál a különböző típusú fehérjéknek különböző az abszorpciós koefficiense.

A biuret-eljárás esetében az irodalom az összefüggést a N-tartalom és az optikai sűrűség között lineárisnak tekinti, míg a Lowry-eljárásnál a lineáris összefüggéstől való eltérést bizonyos koncentrációtartományban figyelembe vették.

Vizsgálataink során különböző búzafajtákból módosított Osborne-módszerrel tiszta albumin-, globulin-, gliadin- és glutenin frakciókat állítottunk elő, amelyek fehérjetartalmának meghatározása a Lowry- és biuret-eljárásokat alkalmaztuk. Igyekeztünk feltárni a N-tartalom és az optikai sűrűség közötti lehetséges összefüggéseket regressziós elemzéssel és korrelációs számítás segítségével, valamint azonoságokat és különbségeket feltárni a fajták és frakciók között. Végül számításokkal igazolni az optikai sűrűségben lényeges változást eredményező tényezők hatását az összes fehérjetartalom meghatározására, illetve a módszer pontosságának növelési lehetőségeire.

* Élelmiszeripari Főiskola, Szeged;

** Budapesti Műszaki Egyetem, Biokémia és Élelmiszertechnológia Tanszék

KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

A vizsgálatokhoz Bezosztaja 1 és Tobári 66, valamint Penjamo 62 fajta-azonos búzamentákat használtunk. Az első kettőt a Gabonatermesztési Kutató Intézet bocsátotta rendelkezésünkre, az utóbbi Mexikóból származó minta volt. A vizsgálatokra LABORMÜHLE QUERUMAT SENIOR BRABENDER típusú laboratóriumi örlőberendezésen 150 μ -nál kisebb szemcseméretű őrleményt állítottunk elő.

Búzafehérje-frakciók előállításához a frakcionálás előtt petroléterrel; majd acetonnal zsirtalanítottuk és szárítottuk a mintákat.

Ezt követően módosított Osborne-módszerrel a búzalisztekből albumin-, globulin-, gliadin- és glutenin-frakciókat állítottunk elő. A minél tisztább frakciók kinyerése céljából egymást követő háromszori extrakciót alkalmaztunk Pruga és Šašek szerint.

Az albumin- és globulin-frakciókat dialízissel tisztítottuk 18–25 Å átlagos pórusméretű, 25 000 mólsúlyhatár átteresztőképeségű dializáló hártán.

A különböző fehérje preparátumokból 1 n NaOH-dal készítettünk oldatokat a Lowry- és biuret-eljárásokhoz az irodalomban leírtak szerint.

A fehérjeoldatokból Folin-reagenssel előállított szín intenzitását mértük 750 nm-nél, illetve a biuret reagenssel kifejlesztett szín intenzitását 550 nm-nél Spektromom 360-as fotométeren, 1 cm-es üvegküvetta alkalmazásával. Az összehasonlító Kjeldahl-eljárásnál a fehérjeoldatokból roncsolókeverék jelenlétében tömény kénsavval keletkezett ammónium-szulfát ammóniatartalmát Parnas-Wagner készülék segítségével határoztuk meg Tashiró indikátor jelenlétében.

KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

1. Regressziós elemzés és korrelációs számítás

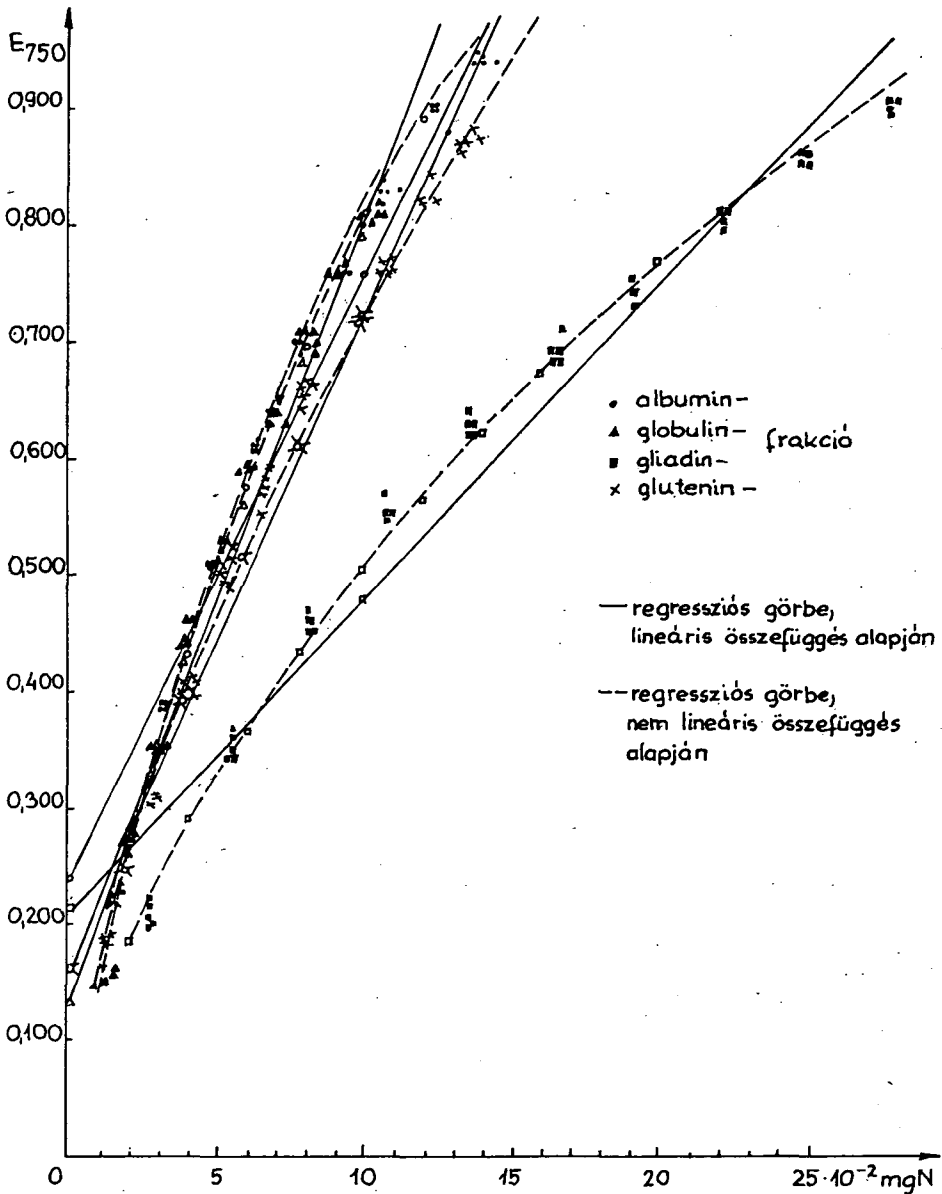
A búzafehérje-frakciók vizsgálatánál a Lowry- és biuret-eljárásnál kapott extinkció értékeket a Kjeldahl szerint N-tartalommal vetettük össze. A regressziós elemzésnél a N-tartalmat tekintettük független változónak és néztük, hogy milyen függvénnyel adható meg a függő változó, az extinkció értéke. A számolásokhoz a WANG SERIES 600 elektromos számológépet alkalmaztuk.

Az 1. ábra a Tobári 66 búzafajta különböző frakcióinál Lowry-módszerrel kapott eredményeket mutatja.

Lowry-módszernél lineáris regresszió ($Y=a \cdot x+b$) feltételezésével számított regressziós egyenes nem jól illeszkedik a kísérleti értékekre: a kisebb és nagyobb N-tartalomnál a mért értékek a számított regressziós egyenes alatt, illetve felett helyezkednek el, csak a görbe középső szakaszán használható jó közelítésre a lineáris összefüggés.

Légfeljebb egyezést nem lineáris regresszió feltételezésével kaptunk abban az esetben, ha a görbe $Y=a \cdot x^b$ típusú függvény. A Bezosztaja 1 és a Penjamo 62 búzafajtáknál teljesen hasonló ábrát kapunk.

Látható, hogy lineáris összefüggés feltételezésével adott búzafajtáknál a különböző frakciók esetében az e egyenes tengelymetszete (b) valamint az egyenes meredeksége (a) különböző, a különböző búzafajták azonos frakcióinál nincs jelentősebb eltérés. Az egyenesek jellemzői a frakcióra érzékenyebben változnak mint a búzafajtára.



1. ábra. Tobári 66 búzafajta különböző frakcióinak Lowry-módszerrel kapott eredmények

A nem lineáris ($Y = a \cdot x^b$) összefüggést vizsgálva a függvény a és b konstansaira ugyanezek a megállapítások érvényesek.

Az extinkció és a N-tartalom közötti összefüggés igen szorosnak mondható, mivel mind a lineáris, mind a nem lineáris függvénnyel való közelítésnél nagyobbak, mint 0,9000. A nem lineáris összefüggés esetében a korrelációs koefficiens értékei nagyobbak, mint a lineáris összefüggés alapján számoltak, és közel esnek egyhez.

1. TÁBLÁZAT

Különböző búzafajták és frakcióik Lowry-módszerrel mért adataiból nyert görbék egyenletei és a korrelációs koefficiensek értékei

Búza-fajta	Frakció	Egyenlet, lineáris $Y = a \cdot x + b$	Korr. koef. r	Egyenlet, nem lineáris $Y = a \cdot x^b$	Korr. koef. r
Bezostaja 1	albumin	$Y = 0,2952 + 3,9070 \cdot x$	$\pm 0,9843$	$Y = 2,6969 \cdot x^{0,5815}$	$\pm 0,9982$
	globulin	$Y = 0,1688 + 7,0188 \cdot x$	$\pm 0,9775$	$Y = 4,6061 \cdot x^{0,7127}$	$\pm 0,9952$
	gliadin	$Y = 0,2844 + 2,8172 \cdot x$	$\pm 0,9836$	$Y = 2,5550 \cdot x^{0,6822}$	$\pm 0,9958$
	glutenin	$Y = 0,1851 + 5,1919 \cdot x$	$\pm 0,9827$	$Y = 3,2720 \cdot x^{0,6524}$	$\pm 0,9967$
Tobári 66	albumin	$Y = 0,2400 + 5,2020 \cdot x$	$\pm 0,9787$	$Y = 3,5225 \cdot x^{0,6442}$	$\pm 0,9948$
	globulin	$Y = 0,1384 + 6,7520 \cdot x$	$\pm 0,9899$	$Y = 3,8394 \cdot x^{0,6882}$	$\pm 0,9981$
	gliadin	$Y = 0,2140 + 2,6666 \cdot x$	$\pm 0,9812$	$Y = 2,0346 \cdot x^{0,6088}$	$\pm 0,9970$
	glutenin	$Y = 0,1650 + 5,5679 \cdot x$	$\pm 0,9876$	$Y = 3,4230 \cdot x^{0,6726}$	$\pm 0,9981$
Penjamo 62	albumin	$Y = 0,2653 + 5,9382 \cdot x$	$\pm 0,9872$	$Y = 3,5917 \cdot x^{0,6168}$	$\pm 0,9926$
	globulin	$Y = 0,1383 + 5,9621 \cdot x$	$\pm 0,9893$	$Y = 3,5822 \cdot x^{0,6923}$	$\pm 0,9893$
	gliadin	$Y = 0,2152 + 2,9990 \cdot x$	$\pm 0,9820$	$Y = 2,1712 \cdot x^{0,6125}$	$\pm 0,9959$
	glutenin	$Y = 0,1359 + 5,0389 \cdot x$	$\pm 0,9896$	$Y = 3,5295 \cdot x^{0,7443}$	$\pm 0,9972$

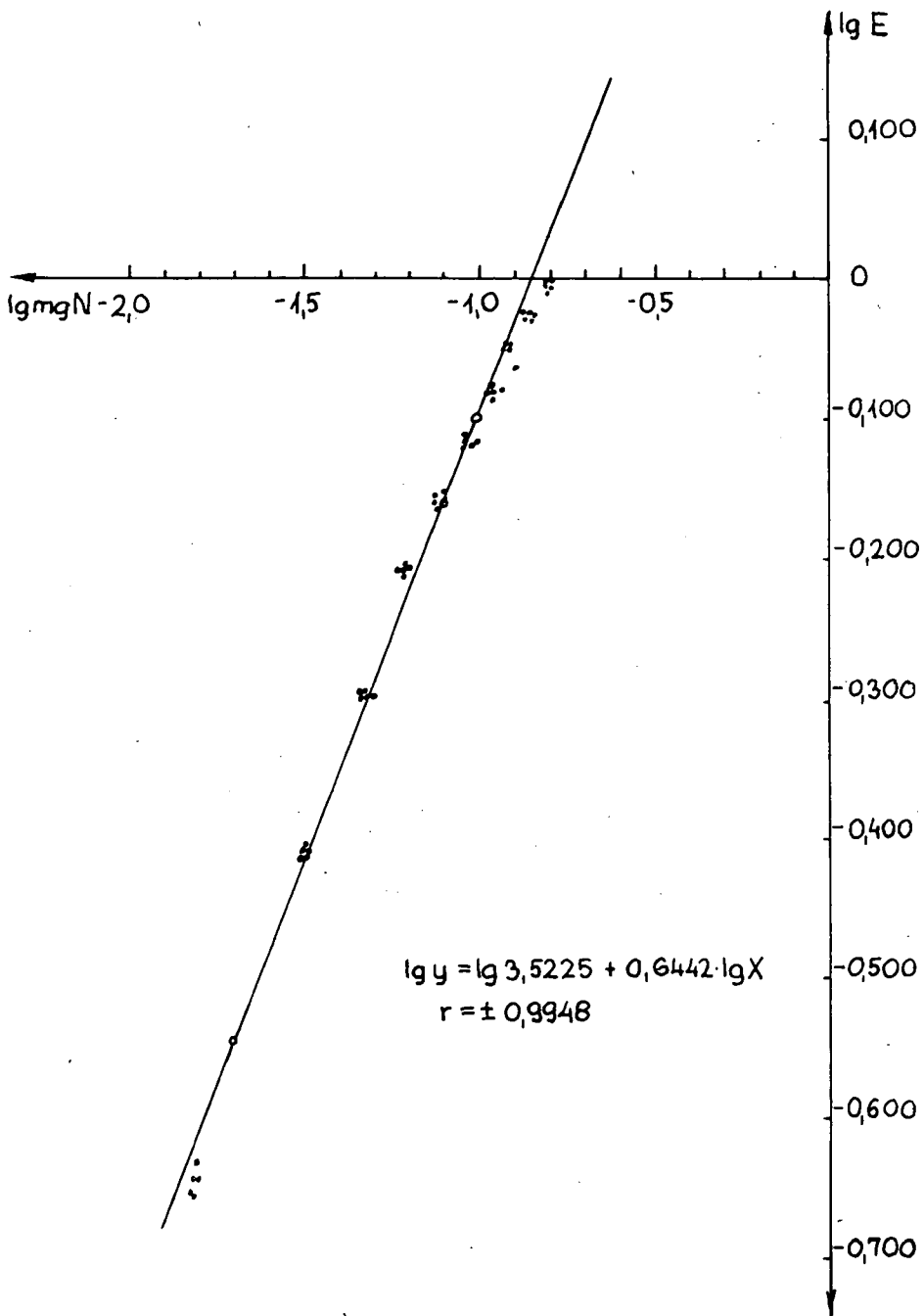
Ha az $Y = a \cdot x^b$ típusú függvénnyel közelítünk, akkor nehezebb a görbe grafikus szerkesztése és használata. Grafikus ábrázolásra kedvezőbb alakot kapunk, ha a függvény logaritmusát vesszük:

$$\lg Y = \lg a + b \cdot \lg x$$

2. TÁBLÁZAT

Különböző búzafajták és frakcióik biuret-módszerrel mért adataiból nyert görbék egyenletei és a korrelációs koefficiensek értékei

Búzafajta	Frakció	Egyenlet, lineáris $Y = a \cdot x + b$	Korrelációs koef. r
Bezostaja 1	albumin	$Y = 0,0319 + 0,2410 \cdot x$	$\pm 0,9986$
	globulin	$Y = 0,0230 + 0,3092 \cdot x$	$\pm 0,9883$
	gliadin	$Y = 0,0264 + 0,1935 \cdot x$	$\pm 0,9964$
	glutenin	$Y = 0,0590 + 0,2006 \cdot x$	$\pm 0,9890$
Tobári 66	albumin	$Y = 0,0856 + 0,2253 \cdot x$	$\pm 0,9856$
	globulin	$Y = 0,0188 + 0,2780 \cdot x$	$\pm 0,9975$
	gliadin	$Y = 0,0259 + 0,2038 \cdot x$	$\pm 0,9949$
	glutenin	$Y = 0,0518 + 0,2013 \cdot x$	$\pm 0,9926$
Penjamo 62	albumin	$Y = 0,0222 + 0,2082 \cdot x$	$\pm 0,9993$
	globulin	$Y = 0,0310 + 0,3134 \cdot x$	$\pm 0,9840$
	gliadin	$Y = 0,0264 + 0,2502 \cdot x$	$\pm 0,9917$
	glutenin	$Y = 0,1028 + 0,2197 \cdot x$	$\pm 0,9723$

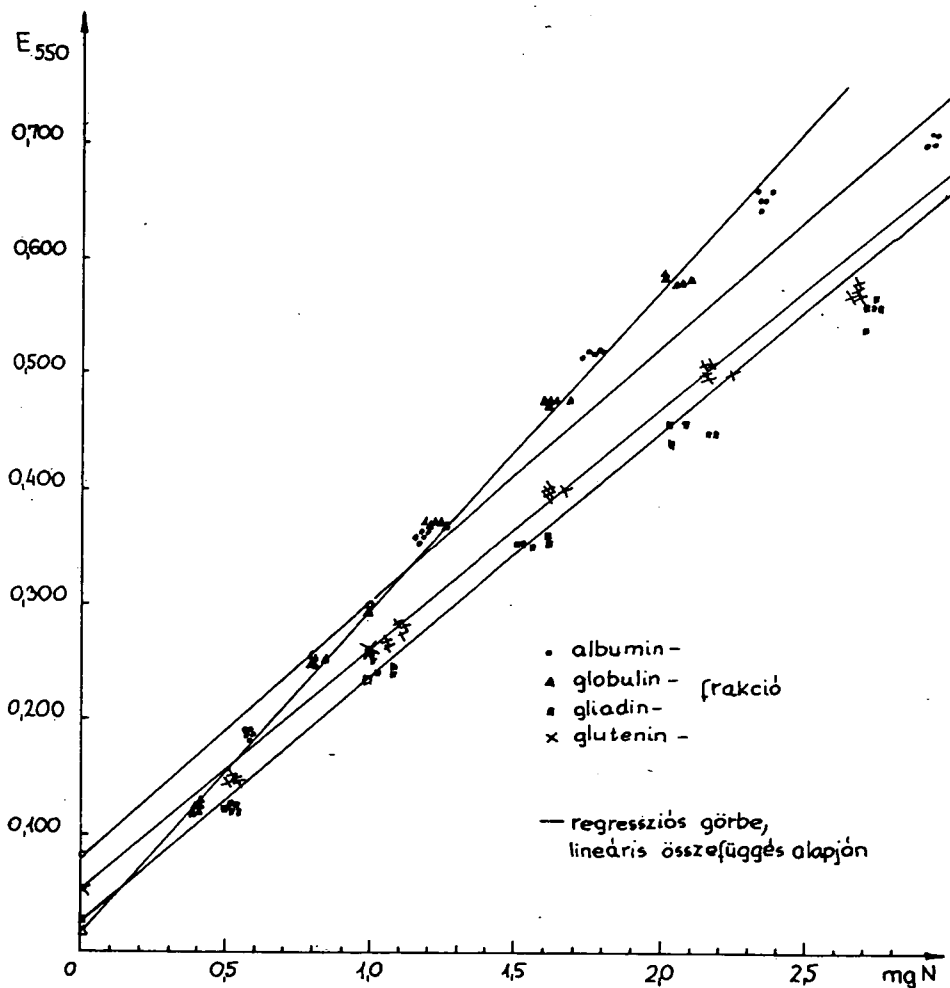


2. ábra. A N-tartalom és az extinkció közötti összefüggés logaritmikus ábrázolásban
Tobári 66 búzafajta albumin-frakciója esetében

Ekkor az extinkció logaritmususa és a N-tartalom logaritmususa közötti összefüggés lineáris. Néhány mérési pont elegendő a görbe szerkesztéséhez. Ezt mutatja a 2. ábra Tobári 66 búzafajta albumin-frakciója esetében.

A 3. ábra Tobári 66 búzafajta különböző frakciójánál biuret-módszerrel kapott eredményeket mutatja.

Látható, hogy biuret-eljárásnál a N-tartalom és extinkció közötti összefüggés lineáris.



3. ábra. Tobári 66 búzafajta különböző frakciójánál biuret módszerrel kapott eredmények

Adott búzafajták különböző frakciójánál a tengelymetszet (b), valamint az iránytangens (a) értékei eltérőek. A különböző búzafajták azonos frakciójánál nagy a különbség a regressziós egyenes konstansai között nem tapasztalható.

Az összefüggés foka igen szoros az extinkció és a N-tartalom között, a korrelációs koefficiens értéke nagyobb mint 0,9000.

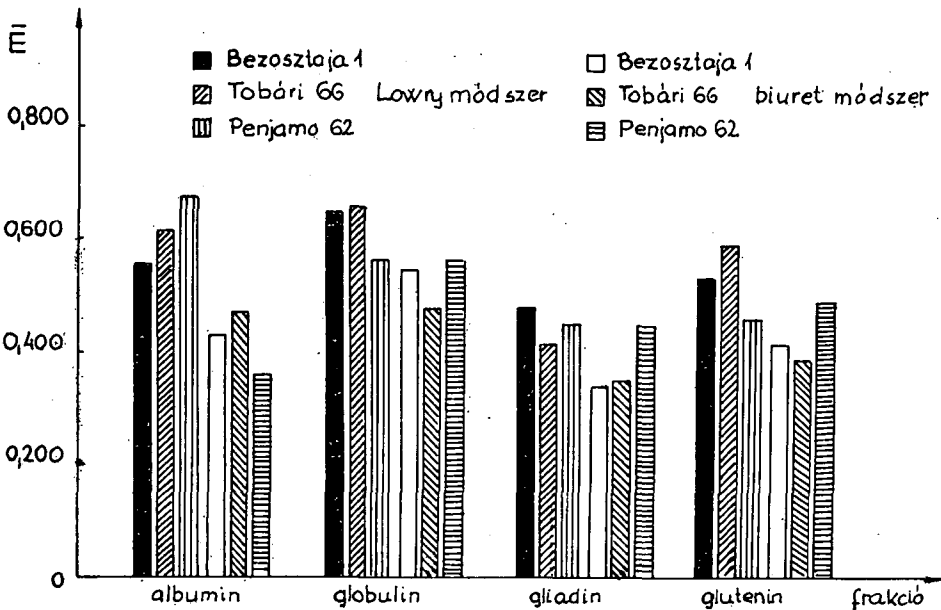
2. Szóráselmzés variancia analízissel

Variancia analízist alkalmaztunk annak a megvilágítására, hogy az egyes búzafajták és azok frakciói a N-tartalom és az extinkció értékek összefüggését Lowry- és biuret módszer esetében hogyan befolyásolják.

A szóráselmzést kétfaktoros — búzafajta és frakció — több ismétléses kísérlet szóráselmzési sémája szerint végeztük mindkét módszer esetében.

A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a Lowry- és biuret-eljárásnál adott fehérjekoncentráció mellett az extinkció értékek alakulására a fehérjefrakciók erősen szignifikáns hatással vannak, a búzafajták nem okoznak lényeges eltérést. A két faktor kölcsönhatása az extinkciók alakulását mindkét eljárásnál szignifikánsan befolyásolja.

A szignifikánsnak bizonyuló faktorok hatását tovább vizsgáltuk az egyes faktorok adott szintjeinek összehasonlításával t-eloszlás alapján.

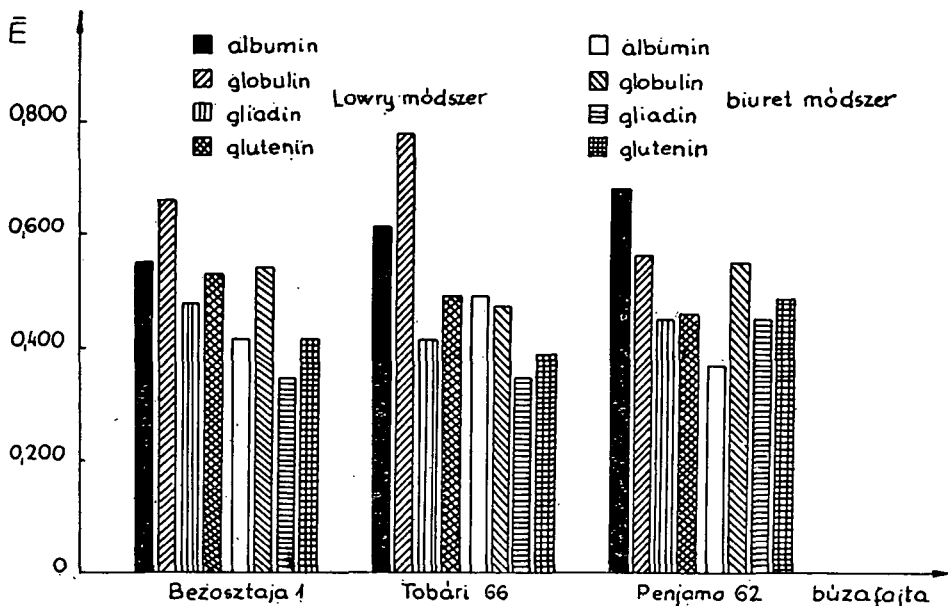


4. ábra. Extinkció átlagértékek alakulása a frakciók függvényében Lowry- és biuret-módszernél

A 4. ábra a biuret- és Lowry-módszerekkel, számolással kapott extinkció átlagértékeket mutatja a frakciók függvényében. Az általunk vizsgált búzafajtáknál Lowry-eljárásnál a gliadin-frakciónál az extinkcióértékekre nincs szignifikáns hatással a búzafajta változása. A biuret-eljárásnál ez a globulin-frakciókra állapítható meg. A többi esetben felváltva okoznak szignifikáns, illetve nem szignifikáns változást.

Az 5. ábra mutatja a Lowry- és biuret-módszerekkel számolással kapott extinkció átlagértékeket a búzafajták függvényében.

Mindkét módszernél a frakciók felváltva okoznak szignifikáns és nem szignifikáns változást.



5. ábra. Extinkció átlagértékek alakulása a búzafajták függvényében Lowry- és biuret-módszernél

Lowry-eljárásnál a gliadin-frakciók adják a legkisebb extinkció értékeket, biuret-nél a globulinok pedig a legnagyobbakat.

3. Gyakorlat számára levonható tapasztalatok

A búzafehérje frakciókra felvett N-tartalom, extinkció görbékből a frakciók átlagos molekulásúlyát figyelembe véve kiszámolhatók az egyes frakciók moláris extinkciós koefficiensei. Így átlagos frakció eloszlást feltételezve kiszámítható adott fehérjetartalmú búzafajtára a várható extinkció értéke. Ennek segítségével eldönthető, hogy adott esetben a lineáris vagy nem lineáris összefüggés használható nagyobb pontossággal.

A Lowry-módszerrel nyert extinkció értékekből kiszámoltuk a fehérjetartalom értékét, amely lineáris regresszió esetén 2,80% eltérést mutat a Kjeldahl-eljárással szemben, míg nem lineáris regressziót feltételezve az eltérés 1,20%. A nem lineáris összefüggés jobb eredményt ad, a lineáris kisebb pontossággal használható.

A fehérjefrakciók eloszlása megváltozásával Lowry-módszernél nem lineáris összefüggéssel számolva 1,4% eltérés mutatkozik a fehérjetartalomban.

Biuret-módszerrel dolgozva, átlagos frakcióeloszlás esetében a lineáris összefüggés alapján az extinkcióból számított fehérjetartalom 1,20%-os eltérést ad a Kjeldahl-eljárással kapott értékekhez képest. A frakció eloszlás változásából adódó eltérés itt 0,20%.

Lowry-eljárásnál ajánlatos a búzafajtára külön kalibrációs görbét felvenni, míg a biuret eljárással a frakciók eloszlásának a változásából adódó hatás csekély, tehát ezen változásokra a módszer kevésbé érzékeny.

IRODALOM

1. Pinckney, A. J.: Cereal Chem. 38, 501, (1961).
2. Jennings, A. C.: Cereal Chem. 38, 467, (1961).
3. Williams, P. C.: J. Sci. Food Agric. 12, 58, (1961).
4. Mitanda, H.—Mitsunaga, T.: J. Agr. Biol. Chem. 38, 1949, (1974).
5. Johnson, R. M.—Craney, C. E.: Cereal Chem. 48, 276, (1971).
6. Noll, J. S.—Simmonds, D. H.—Bushuk, W.: Cereal Chem. 51, 610, (1974).
7. Misra, P. S.—Barba, H. O. R.—Mertz, E. T.: Cereal Chem. 50, 184, (1973).
8. Greenaway, W. T.: Cereal Chem. 49, 609, (1972).
9. Lowry, O. H.—Rosebrough, N. J.—Farr, A. L.—Rendall, R. J.: J. Biol. Chem. 193, 265, (1951).
10. Lásztity R.—Törley D.—Nedelkovits J.—Őrsi F.—Varga J.: Élelmészeti Ipar, 28, 129, (1974).
11. Huemer, R. P.—Lee, K. D.: Anal. Biochem. 37, 149, (1970).
12. Törley D.—Nedelkovits J.—Őrsi F.—Gy. Vadon E.: Élelmiszervizsgálati közl. 18, 179, (1972).
13. Lásztity R.—Törley D.: Élelmiszerkémia és technológiai gyakorlatok, Tankönyvkiadó, Budapest, 1971.
14. Pruga, J.—Šašek, A.: Getreide und Mehl, 20, 98, (1968).
15. Karácsonyi L.: Gabona-, liszt-, sütő- és tésztaipari vizsgálati módszerek, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1970.
16. Bálint P.: Klinikai laboratóriumi diagnosztika, Medicina, Budapest, 1962.
17. Sváb J.: Biometriai módszerek a kutatásban, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1973.
18. Felix M.—Blaha K.: Matematikai statisztika a vegyiparban, Műszaki Könyvkiadó, Budapest 1964.
19. Lelley, J.—Mándy Gy.: A búza, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1963.

STUDY OF THE DETERMINATION OF WHEAT PROTEINS WITH FAST METHODS

E. Kovács and R. Lásztity

A modified Osborne method was used to prepare pure albumin, globulin, gliadin and glutenin fractions from various wheat varieties. The protein contents of the pure fractions were determined with the Lowry and biuret methods.

The correlation between the N content and the optical density was examined by the methods of regression analysis and correlation calculation, with the aid of an electric computer.

In the biuret procedure the correlation is linear; in the case of the Lowry method, the non-linear correlation $Y = a \cdot x^b$ is better than a linear one. The values of the correlation coefficients are higher than $\pm 0,9000$.

On the basis of variance analysis, it can be stated that, at a given protein concentration in the Lowry and biuret procedures, the protein fractions have a strongly significant effect on the development of the extinction values; the wheat varieties do not cause a significant change.

The Lowry procedure is recommended for the concentration range 0,10—2,50 mg N/100 ml, and the biuret procedure for 7,00—60,0 mg N/100 ml.

STUDIUM DER BESTIMMUNG DER WEIZENPROTEINE MIT SCHNELLMETHODEN

E. Kovács—R. Lásztity

Die Verfasser haben mit der modifizierten Osborne-schen Methode aus verschiedenen Weizensorten reine Albumin-, Globulin-, Gliadin- und Gluteninfraktionen hergestellt. Zur Bestimmung des Eiweißgehaltes der reinen Fraktionen fanden die Lowry und die Biuret-Methode Anwendung.

Die Korrelation zwischen N-Gehalt und optischer Dichte wurde unter Benutzung einer elektronischen Rechenmaschine mit der Methode der Regressionsanalyse und Korrelationsberechnung untersucht.

Bei dem Biuret-Verfahren ist der Zusammenhang ein linearer; im Falle der Lowry-Methode ist besser als der lineare Zusammenhang der nichtlineare — $Y = a \cdot x^b$ — Zusammenhang brauchbar. Die Werte der Korrelationskoeffizienten sind grösser als $\pm 0,9000$.

Aufgrund der Varianzanalyse ist festzustellen, dass beim Lowry- and Biuret-Verfahren bei gegebener Eiweisskonzentration die Eiweissfraktionen von strak signifikantem Einfluss auf die Gestaltung der Extinktionswerte sind; die Weizensorten verursachen keine wesentliche Abweichung.

Das Lowry-Verfahren wird am besten im Konzentrationsbereich von 0,10—2,50 mg N/100 ml und das Biuret-Verfahren im Bereich von 7,00—60,0 mg N/100 ml angewandt.

ИЗУЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ ПШЕНИЦЫ, ПРОИЗВОДИМОГО БЫСТРЫМИ МЕТОДАМИ

Е. Ковач—Р. Ластути

С помощью несколько изменённого метода Осборна авторы выделяли из различных сортов пшеницы чистые фракции альбумина, глобулина, глиадина и глютенина. Для определения содержания белка в чистых фракциях применяли бюретный метод Lowry. Зависимость между содержанием азота и оптической плотностью исследовали методом регрессионного анализа и корреляционного расчёта с применением ЭВМ.

При бюретном методе зависимость линейная, при методе Lowry лучше использовать не линейную зависимость, а зависимость $Y = a \cdot x^b$. Показатели корреляционных коэффициентов выше, чем $\pm 0,9000$. На основе вариационного анализа можно установить, что при методе Lowry и бюретном методе на формирование показателей экстинкции при данной концентрации белков белковые фракции оказывают значительное влияние, существенных отклонений между отдельными сортами не наблюдается.

Метод Lowry рекомендуется применять при концентрациях в пределах 0,10—2,50 mg N/100 ml а бюретный метод — при концентрации в 7,00—60,0 mg N/100 ml.