

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXXIV, 38

SECTIO D

1979

Zakład Chemii Ogólnej. Instytut Chemii Podstawowych. Wydział Farmaceutyczny.

Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. Stanisław Biliński

Andrzej GÓRSKI, Jerzy ISKIERKO

**Porównawcza analiza białek pszenicy, żyta i dwóch odmian pszenżyta
 T_{275} i T_{294} . I. Podfrakcje gliadyn o różnych ciężarach cząsteczkowych**

Сравнительный анализ белков пшеницы, ржи и двух сортов тритикале — T_{275}
и T_{294} . I. Подфракции глиадинов о разных молекулярных весах

A Comparative Analysis of the Proteins of Wheat, Rye and Two Kinds of Triticale
 T_{275} and T_{294} . I. Subfraction of Gliadines of Various Molecular Weights

Gluten jest złożonym kompleksem białkowo-węglowodanowo-tłuszczowym i stanowi główny składnik mąki. Własności fizykochemiczne tego kompleksu decydują o jej wartości wypiekowej. Według różnych autorów (18, 22), gluten w przeliczeniu na suchą masę zawiera 72—90% białka, w tym 40—50% stanowią gliadyny i 35—40% gluteniny. Frakcjonowaniem białek glutenu zajmowało się wielu badaczy, a między innymi Lee i wsp. (16) oraz inni (21, 24). Stosowano różne metody, posługując się modyfikowaną celulozą (12, 16), elektroforezą w żelu skrobiowym (4, 7, 9, 10, 15), Jones i wsp. (11—14) rozdzielili gliadyny na bloku skrobiowym, uzyskując cztery podfrakcje. Podawane w piśmiennictwie ciężary cząsteczkowe frakcji gliadynowych i gluteninowych różnią się w zależności od zastosowanej metody ich oznaczania (1—2, 6, 25, 27).

Podjęte badania porównawcze gliadyn oraz glutenin izolowanych z glutenu mąki pszenicy, żyta i dwóch odmian pszenżyta miały na celu sprawdzenie, czy istnieje zależność między rodzajem zboża a własnościami fizykochemicznymi zasadniczych białek glutenu.

MATERIAŁ I METODY

Materiał doświadczalny stanowiły gliadyny izolowane z mąki żyta Dańkowskie Żłote, pszenicy Grana i dwóch odmian pszenżyta: T_{275} i T_{294} w oparciu o metodykę podaną przez Eltona i Ewarta (7). Białko całkowite oznaczano metodą Folina i Ciocafteau w modyfikacji Lowry (17). Nośnikiem chromatograficznym był Sephadex G-200 firmy Pharmacia Fine Chemicals Uppsala (Szwecja). Stosowano

następujące białka wzorcowe: cytochrom C-BDH (Anglia), mioglobinę — Calbiochem (Szwecja), albuminę wołową i hemoglobinę ludzką — firmy BDH (Anglia). Ciężary molekularne podfrakcji gliadyn oznaczano metodą sączenia molekularnego, używając Sephadex G-200, według Whitakera (23). Rozdział chromatograficzny białek gliadyn wykonano według metodyki podanej przez Chena i Bushuka (3).

Izolowanie gliadyn

Mąkę w ilości 120 g przerabiano na ciasto i przemywano 0,1% roztworem chlorku sodowego w celu pozbycia się globulin, albumin oraz skrobi. Przemywanie prowadzono aż do całkowitego usunięcia skrobi — otrzymując gluten. Mokry gluten zadano 120 g etanolu, co po uwzględnieniu zawartej w glutenie wody spowodowało, że stężenie użytego do ekstrakcji etanolu wynosiło w przybliżeniu 70%. Celem lepszej ekstrakcji gliadyn etanolem, gluten rozdrabniano przez intensywne mechaniczne mieszanie w ciągu 30 sek. Rozdrobniony gluten, zawieszony w 70% etanolu, mieszano powoli 4 godz. Następnie mieszaninę odwirowano na ultrawirówce przy 700 g w ciągu 40 min. Ekstrakt alkoholowy, zawierający frakcję gliadynową, dializowano przez 3 doby, aż do całkowitego usunięcia etanolu. Roztwór po dializie ultrawirowano przy 45 000 g przez 45 min. w celu usunięcia ewentualnych zanieczyszczeń w postaci niewielkiej ilości glutenin, które mogłyby się wyekstrahować razem z gliadynami. Roztwór po ultrawirowaniu zamrożono i liofilizowano, otrzymując białko gliadyn.

Izolowanie glutenin

Pozostałość po ekstrakcji etanolem przemywano trzykrotnie 200 ml 70% etanolu przez kilka godzin i ekstrakty alkoholowe odrzucano. Pozostałość zadano 200 ml 0,05 N kwasu octowego, mieszano 1 godz. i wirowano przy 3000 obr./min. Otrzymany klarowny ekstrakt dializowano jak podano wyżej, zamrożono, a następnie liofilizowano, otrzymując białko glutenin.

We frakcjach białkowych gliadyn oraz glutenin pszenicy, żyta i dwóch odmian pszenżyta oznaczano białko całkowite metodą Folina i Ciocalteu w modyfikacji Lowry (17) — tab. 1.

Tab. 1. Zawartość procentowa białka w gliadynach i gluteninach
Per cent content of protein in gliadines and glutenines

Zboża	Gliadyny %	Gluteniny %
Ż	86,2	57,7
P	94,4	76,6
T _{27%}	91,6	69,8
T _{29%}	90,2	73,0

ROZDZIAŁ CHROMATOGRAFICZNY BIAŁEK GLIADYN

Sephadex G-200 poddano pęcznieniu w 1 M roztworze dwumetyloformamidu w 0,05 M kwasie octowym w czasie 80 godz. Roztwór znad żelu zlewano przez dekantację w celu pozbycia się pyłu dekstranowego, na-

stępnie przemywano pięciokrotnie oraz po odpowietrzeniu наносzono na kolumnę. Po upakowaniu kolumny przepuszczano przez żel roztwór 1 M dwumetyloformamidu w 0,05 M kwasie octowym w ilości pięciokrotnie większej od pojemności kolumny, której wymiary wynosiły 46×2,3 cm. Białko gliadyn poszczególnych zbóż w ilości 60 mg rozpuszczano w 5 ml roztworu 2 M dwumetyloformamidu w 0,05 M kwasie octowym i наносzono na kolumnę, a następnie eluowano 1 M dwumetyloformamidem w 0,05 M kwasie octowym. Szybkość wycieku z kolumny ustalono w ilości 0,2 ml/min. i zbierano w probówkach porcje 3 ml. Wyciek z kolumny spektrofotometrowano przy 280 nm. W wyniku sączenia uzyskano 4 podfrakcje gliadyn. Procentowy udział podfrakcji w gliadynach poszczególnych zbóż określono na podstawie pomiaru powierzchni pików.

Oznaczono ciężary cząsteczkowe podfrakcji białkowych gliadyn metodą sączenia na żelu Sephadex G-200. W metodzie tej wykorzystano zależność V_e/V_0 od $\lg M$, gdzie V_0 jest objętością zerową kolumny, a V_e — objętością elucyjną dla danego białka. Na przygotowaną kolumnę o wymiarach 46×2,3 cm, wypełnioną żelem Sephadex G-200, наносzono roztwory białek wzorcowych o stężeniu 15 mg/ml (tab. 2).

Znalezione objętości elucyjne V_e (l) pozwoliły na określenie krzywej regresji i wyznaczenie współczynników kierunkowych. Następnie uzyskane na drodze sączenia podfrakcje gliadyn pszenicy, żyta i obu odmian pszenżyta наносzono na kolumnę i eluowano podobnie jak białka wzorcowe roztworem 1 M dwumetyloformamidu w 0,05 M kwasie octowym. Wyciek z kolumny w porcjach o objętości 2 ml spektrofotometrowano przy 280 nm. Znalezione objętości elucyjne V_e (l) dla poszczególnych podfrakcji pozwoliły w oparciu o wzór $y = A + Bx$ (gdzie $y = V_e$ (l), a $x = \lg M$, natomiast A i B współczynniki kierunkowe) określić ich ciężary cząsteczkowe (tab. 3).

Tab. 2. Objętości elucyjne V_e dla białek wzorcowych

Retention volumes V_e for standard proteins

Białka wzorcowe	M	V_e (l)
Albumina wołowa	69 000	0,061
Hemoglobina	40 000	0,095
Mioglobina	17 000	0,147
Cytochrom C	12 000	0,167

Tab. 3. Objętości elucyjne oraz ciężary cząsteczkowe podfrakcji gliadyn

Podfrakcje gliadyn	V_e (l)	M
I	0,047	90 000
II	0,083	49 500
III	0,115	30 800
IV	0,146	17 600
V	0,167	12 100

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wygląd zewnętrzny i własności fizyczne oczyszczonych, zliofilizowanych białek gliadyn i glutenin były zróżnicowane. Gluteniny występowały w postaci białego, silnie elektryzującego się proszku, gliadyny natomiast przypominały białą, ciągliwą pajęczynę. W przeliczeniu na suchą masę gliadyny wykazywały wyższą zawartość białka niż gluteniny. Dla gliadyn wynosiła ona w zależności od zboża 86,2—94,4%; a dla glutenin — 57,7—76,6%. Uzyskane wyniki odbiegają nieco od danych z piśmiennictwa. P e n c e (19) podaje, że zawartość białka w gliadynach różnych zbóż waha się w granicach 90,2—95,4%, a w gluteninach — 67,6—75,4%. Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, że największa zawartość białka charakteryzowała gluteniny pszenicy, zaś najniższa — gluteniny żyta, natomiast obie odmiany pszenżyta posiadały zawartość białka zbliżoną do glutenin pszenicy. Gliadyny pszenicy posiadały również najwyższą zawartość białka, a żyta — najniższą. Jeśli chodzi o zawartość białka, to gliadyny obu odmian pszenżyta wykazywały pośrednie wartości, mieszczące się pomiędzy wartościami dla żyta i pszenicy.

Gliadyny analizowanych zbóż rozdzielane na żelu Sephadex G-200 dawały pięć podfrakcji o różnych ciężarach cząsteczkowych: I — 90 000, II — 50 000, III — 30 000, IV — 18 000, V — 12 000 (tab. 4). B i e t z i W a l l (1) podali odmienne ciężary molekularne dla podfrakcji gliadyn, które według cytowanych autorów zawierały się w granicach 11 400—42 200. Analogiczne podfrakcje wykazano w gliadynach pszenicy i jednej z odmian pszenżyta, T₂₉₄. Natomiast gliadyny żyta posiadały analogiczne podfrakcje z drugą odmianą pszenżyta, T₂₇₅. Gliadyny pszenicy i żyta róż-

Tab. 4. Procentowy udział podfrakcji o określonych ciężarach cząsteczkowych w gliadynach

Per cent content of subfractions with given molecular weights in gliadine proteins

Zboża	I %	II %	III %	IV %	V
Ż	30	—	50	13	7
P	40	9	38	13	—
T ₂₇₅	16	—	60	18	6
T ₂₉₄	18	52	21	9	—

niły podfrakcje. Gliadyny pszenicy posiadały podfrakcję o ciężarze 50 000, która nie występowała w gliadynach żyta, gliadyny żyta natomiast posiadały podfrakcję o ciężarze 12 000, której nie znaleziono w gliadynach pszenicy. Poza tym należy podkreślić, że w gliadynach różnych zbóż występowała inna procentowa zawartość podfrakcji o tych samych ciężarach cząsteczkowych. Może to wskazywać na różnice gliadyn izolowanych

z glutenu badanych trzech rodzajów zbóż. Na podstawie przeprowadzonych badań wydaje się, że gliadyny pszenżyta T₂₉₄ wykazują większe podobieństwo chemiczne do gliadyn pszenicy niż do gliadyn żyta. Natomiast gliadyny pszenżyta T₂₇₅ ze względu na budowę chemiczną są bardziej zbliżone do gliadyn żyta. Oznaczony średni ciężar cząsteczkowy gliadyn metodą sączenia molekularnego wynosi ok. 42 000, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi przez Jonesa i wsp. (11—13). Cole (6) podaje 44 000 jako średni ciężar molekularny dla gliadyn, natomiast Bietz i Wall (1) — 43 000.

PIŚMIENNICTWO

1. Bietz J. A., Wall J. S.: *Cereal Chem.* **49**, 416—423, 1972.
2. Burk N. F.: *J. Biol. Chem.* **124**, 49—52, 1938.
3. Chen C. H., Bushuk W.: *Can. J. Plant. Sci.* **50**, 15—24, 1970.
4. Cluskey J. E., Taylor N. W., Charley H., Senti F. R.: *Cereal Chem.* **38**, 325—335, 1961.
5. Coates J. H., Simmonds D. H.: *Cereal Chem.* **38**, 256—272, 1961.
6. Cole E. W., NG H., Mecham D. K.: *Cereal Chem.* **50**, 336—342, 1973.
7. Elton G. A. M., Ewart J. A. D.: *J. Sci. Food Agric.* **13**, 62—67, 1962.
8. Elton G. A. M., Ewart J. A. D.: *J. Sci. Food Agric.* **17**, 34—38, 1966.
9. Graham J. S. D., Morton R. K., Simmonds D. H.: *Austral. J. Biol. Sci.* **16**, 350—356, 1963.
10. Graham J. S. D.: *Austral. J. Biol. Sci.* **16**, 342—349, 1963.
11. Jones R. W., Taylor N. W., Senti F. R.: *Arch. Biochem. Biophys.* **84**, 363—376, 1959.
12. Jones R. W., Babcock G. E., Taylor N. W., Senti F. R.: *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 483—485, 1961.
13. Jones R. W., Dimler R. J.: *Cereal Chem.* **39**, 336—341, 1962.
14. Jones R. W., Babcock G. E., Taylor N. W., Dimler R. J.: *Cereal Chem.* **40**, 409—414, 1963.
15. Kamiński E.: *J. Sci. Food Agric.* **13**, 603—615, 1962.
16. Lee J. W., Tracey M., Winzor D. J.: *Austral. J. Biol. Sci.* **16**, 717—726, 1963.
17. Lowry O. H., Rosenbrought N. J., Farr A. L.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265—267, 1951.
18. Osborne T. B.: *Inst. Wash. Publ. Nr 88*, 1907.
19. Pence J. W., Mecham D. K., Elder A. H.: *Cereal Chem.* **27**, 335—341, 1950.
20. Simmonds D. H.: *Cereal Chem.* **40**, 110—126, 1963.
21. Sisakjan N. M., Markosjan L. S.: *Biochimija* **24**, 1094—1095, 1959.
22. Wakar A. B.: *Klejkowina pszenicy*. Izd. Akad. Nauk SSSR, Moskwa 1961.
23. Whitaker J. R.: *Analyt. Chem.* **35**, 1950—1953, 1963.
24. Woychik J. H., Boundy J. A., Dimler R. J.: *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 477—481, 1961.
25. Woychik J. H., Huebner F. R., Dimler R. J.: *Arch. Biochem. Biophys.* **105**, 151—155, 1964.

26. Wright W. B., Brown P. J., Bell A. W.: *J. Sci. Food Agric.* **15**, 56—62, 1964.
27. WU Y. V., Cluskey J. E., Sexon K. R.: *Biochim. Biophys. Acta* **133**, 83—90, 1967.

Otrzymano 23 XI 1978.

РЕЗЮМЕ

В представленной работе обнаружены физико-химические различия между глинами отдельных сортов хлебов. Различия выступили также между глюteniнами пшеницы, ржи и двух сортов пшенжита. Процентное содержание подфракций глиаина пшенжита T_{294} было более сближенным к глиадину ржи нежели к глиадину пшеницы. Глиадин пшенжита T_{275} выказал большее сходство с глиадином пшеницы. Содержание абсолютного белка в глюteniнах пшенжита было более сходным с глюteniном пшеницы нежели ржи.

SUMMARY

This paper presents the physical and chemical differences between gliadins of particular corn varieties. The differences were also visible between glutenins of wheat, rye and Triticale varieties. The percentage content of gliadin subfractions of Triticale T_{275} was more similar to rye gliadin rather than to wheat gliadins. However, gliadins of Triticale T_{275} showed greater similarity to Triticale gliadins. The content of the whole protein in glutenins of Triticale was closer to wheat glutenins rather than to rye glutenins.