

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
T₂₇₅ i T₂₉₄. II. Rozdział gliadyn i glutenin w żelu poliakrylamidowym**

Сравнительный анализ белков пшеницы, ржи и двух сортов тритикале — T₂₇₅
и T₂₉₄. II. Раздел глиадинов и глютеинов в полиакриламидном геле

A Comparative Analysis of the Proteins of Wheat, Rye and Two Kinds of Triticale
T₂₇₅ and T₂₉₄. II. Separation of Gliadines and Glutenines in Polyacrylamide Gel

Białka glutenu rozdzielano metodą wolnej elektroforezy (9—11). Metoda ta posiada jednak ograniczone możliwości rozdzielcze. Pewien postęp w tej dziedzinie uzyskano przez zastosowanie elektroforezy w żelu skrobiowym (2, 4—7, 12, 16—17). Do rozdziału białek glutenu stosowano również elektroforezę bibułową (14) oraz immunoelektroforezę (15). Najbardziej selektywną techniką rozdzielczą jest wprowadzona elektroforeza w żelu poliakrylamidowym. Cluskey i wsp. (2) oraz Elton i Ewart (4—5) zastosowali elektroforezę w żelu poliakrylamidowym do rozdziału gliadyn pszenicy, uzyskując osiem podjednostek.

WU, Cluskey i Sexon (18) na podstawie zjawiska dysocjacji i agregacji gliadyn i glutenin w rozpuszczalnikach o różnej sile jonowej wysuwają hipotezę, że białka te są asocjatom podjednostek o zróżnicowanych masach cząsteczkowych. Podfrakcja gliadyn oznakowana przez Jonesa (9) jako α w buforze mleczanowym, zawierającym 3 M mocznik, ulegała rozbiciu na dwie, a podfrakcje β na cztery podjednostki (10).

Podjęte badania miały na celu przeprowadzenie rozdziału gliadyn i glutenin uzyskanych z glutenu pszenicy, żyta i dwóch odmian pszenżyta, T₂₇₅ i T₂₉₄. Porównano gliadyny i gluteniny różnego pochodzenia pod kątem występowania w nich analogicznych oraz różnych podjednostek białkowych. Podjęto także próbę określenia procentowego udziału podjednostek lekkich i ciężkich w molekułach gliadyn i glutenin analizowanych gatunków zbóż.

MATERIAŁ I METODY

Materiał doświadczalny stanowiły frakcje białkowe gliadyn i glutenin wyizolowanych z glutenu żyta, pszenicy i dwóch odmian pszenżyta, T₂₇₅ i T₂₉₄. Do elektroforezy w żelu poliakrylamidowym stosowano acrylamid KOCH-Light — Anglia,

N, N-metylenobisacrylamide KOCH-Light — Anglia. Badania elektroforetyczne gliadyn i glutenin w kwaśnym żelu poliakrylamidowym prowadzono stosując metodę opisaną przez Chena i Bushuka (1) z pewnymi modyfikacjami, a mianowicie: zastąpiono 7,5% żel 10% oraz zmieniając warunki prądowe z 4 do 3,5 mA na kolumnę. Elektroforezę w zasadowym żelu poliakrylamidowym przeprowadzono według Davisa (3). Procentową zawartość podjednostek w badanych białkach określono metodą densytometryczną, stosując aparat „Vitatron” firmy holenderskiej.

BADANIA WŁASNE

Metodyka rozdziału białek roślinnych za pomocą elektroforezy w kwaśnym żelu poliakrylamidowym według Chena i Bushuka (15) przebiegała przy pH żelu 3,8. Górny żel posiadał pH 5,8. Elektrolit stanowiły dwa bufor: górny o pH 4,0 i dolny o $pH=4,3$. Stosując 7,5% żel rozdziel gliadyn, a szczególnie gliadyn nie był zadowalający ze względu na małe wartości R_f podjednostek i na ich mało wyraźny rozdziel.

Drogą doświadczalną ustalono optymalne warunki rozdzielu glutenin i gliadyn, które sprowadzały się do zwiększenia stężenia żelu do 10% i zmniejszenia natężenia prądu z 4,5 do 3,5 mA na kolumnę. Poza tym przedłużono czas rozdzielu do 3 godz. Zastosowanie tych warunków pozwoliło na zadowalający rozdziel badanych białek roślinnych.

Rozdziel elektroforetyczny metodą Davisa (3) oparty był na zastosowaniu żelu poliakrylamidowego 7,5% o pH 8,9. Elektrolit stanowił bufor glicyna-Tris o pH 8,5. Stosowano natężenie prądu 4 mA na kolumnę. Do elektroforezy przygotowano 1% roztwory białka w odpowiednim buforze, zmieszanym z 40% roztworem sacharozy w stosunku 1:1.

Tab. 1. Udział procentowy podjednostek białka gliadyn otrzymanych przez rozdziel w zasadowym żelu poliakrylamidowym dla trzech rodzajów zboż — Ż, P, T₂₇₅ i T₂₉₄
Per cent content of subunits of gliadine proteins determined with disc electrophoresis in basic polyacrylamide gel for three kinds of wheat, rye, and Triticale T₂₇₅ and T₂₉₄

$R_f \times 1000$	Ż	P	T ₂₇₅	T ₂₉₄	Ż	P	T ₂₇₅	P ₂₉₄
					Liczba podjednostek			
					10	9	10	8
					%	%	%	%
400	—	—	—	13	2,6	1,0	—	—
	—	—	—	12	4,7	1,3	2,1	—
	—	—	—	11	7,3	—	3,5	6,2
300	—	—	—	10	—	1,8	3,7	—
	—	—	—	9	4,7	1,8	6,0	7,1
	—	—	—	8	4,7	—	—	6,2
200	—	—	—	7	5,2	6,6	3,3	—
	—	—	—	6	8,7	—	8,8	8,8
	—	—	—	5	18,0	9,9	14,7	12,9
100	—	—	—	4	—	25,9	—	18,8
	—	—	—	3	23,5	28,2	19,3	19,6
	—	—	—	2	20,6	23,6	20,2	—
			—	1	—	—	18,4	20,0

Tab. 2. Udział procentowy podjednostek białka gliadyn otrzymanych przez rozdzielanie w kwaśnym żelu poliakrylamidowym dla trzech rodzajów zbóż — Ż, P, T₂₇₅ i T₂₉₄.
Per cent content of subunits of gliadine proteins determined with disc electrophoresis in acidic polyacrylamide gel for three kinds of wheat, rye and Triticale T₂₇₅ and T₂₉₄

R _f × 1000	Ż	P	T ₂₇₅	T ₂₉₄	Ż	P	T ₂₇₅	P ₂₉₄
					Liczba podjednostek			
					10	10	8	8
					%	%	%	%
600	—	—	—	12	13,4	11,0	—	—
	—	—	—	11	20,3	13,5	4,8	2,2
	—	—	—	10	11,6	14,8	11,3	4,9
500	—	—	—	9	—	—	17,9	13,6
400	—	—	—	8	0,9	1,6	4,4	5,9
	—	—	—	7	1,6	2,8	—	—
300	—	—	—	6	2,7	1,9	5,9	5,7
	—	—	—	5	—	1,6	0,9	—
200	—	—	—	4	12,7	13,2	—	4,4
	—	—	—	3	19,6	21,6	—	—
100	—	—	—	2	12,5	15,1	22,6	16,6
	—	—	—	1	4,5	—	32,2	46,7

Tab. 3. Udział procentowy podjednostek białka glutenin otrzymanych przez rozdzielanie w zasadowym żelu poliakrylamidowym dla trzech rodzajów zbóż — Ż, P, T₂₇₅ i T₂₉₄.
Per cent content of subunits of glutenine proteins determined with disc electrophoresis in basic polyacrylamide gel for three kinds of wheat, rye and Triticale T₂₇₅ and T₂₉₄

R _f × 1000	Ż	P	T ₂₇₅	T ₂₉₄	Ż	P	T ₂₇₅	P ₂₉₄
					Liczba podjednostek			
					8	9	7	7
					%	%	%	%
500	—	—	—	11	5,7	—	—	—
400	—	—	—	10	7,2	—	—	—
	—	—	—	9	7,4	7,9	—	5,8
	—	—	—	8	—	7,9	—	—
300	—	—	—	7	7,9	7,7	6,8	—
	—	—	—	6	16,2	7,2	11,4	10,6
200	—	—	—	5	—	9,2	10,1	9,4
	—	—	—	4	—	14,9	12,4	12,5
	—	—	—	3	22,0	21,3	17,9	17,0
100	—	—	—	2	22,2	14,4	20,7	22,2
	—	—	—	1	10,5	9,7	20,7	22,5

Barwienie elektroforegramów w obu metodach prowadzono 0,5% roztworem czerni amidowej w 7% kwasie octowym. Elektroforegramy wybarwiano 7% kwasem octowym.

Krzywe densytometryczne wykonano w aparacie „Vitatron”, stosując szybkość przesuwu elektroforegramu 3 cm/min., przy czułości 5,0; przesłonie 0,5 i szybkości przesuwu taśmy 10 cm/min. Pomiaru dokonywano bez filtra.

Tab. 4. Udział procentowy podjednostek białka glutenin otrzymanych przez rozdział w kwaśnym żelu poliakrylamidowym dla trzech rodzajów zbóż — Ż, P, T₂₇₅ i T₂₉₄.
Per cent content of subunits of glutenine proteins determined with disc electrophoresis in acidic polyacrylamide gel for three kinds of wheat, rye and Triticale T₂₇₅ and T₂₉₄

R _f × 1000	Ż	P	T ₂₇₅	T ₂₉₄	Ż	P	T ₂₇₅	P ₂₉₄
					Liczba podjednostek			
					8	10	12	13
					%	%	%	%
800	—	—	—	19	—	—	—	1,3
				18	7,1	—	—	—
				17	—	—	—	2,8
700	—	—	—	16	—	—	—	5,1
				15	17,2	—	1,0	2,8
				14	—	2,2	1,8	—
600	—	—	—	13	19,6	—	—	4,6
				12	—	4,2	3,7	1,7
				11	9,5	—	1,8	—
500	—	—	—	10	8,1	3,6	7,8	—
				9	—	1,8	—	—
				8	—	4,7	1,3	13,1
400	—	—	—	7	—	2,5	—	—
				6	—	25,3	10,7	21,0
				5	—	—	14,2	12,4
300	—	—	—	4	23,6	23,3	24,3	12,7
				3	—	24,1	11,5	17,1
				2	10,8	7,6	9,9	3,3
200	—	—	—	1	4,1	—	12,8	1,6
				—	—	—	—	—
				—	—	—	—	—

Wartości R_f dla poszczególnych podjednostek oraz ilościowy ich udział w danej frakcji białkowej gliadyn i glutenin obliczono z krzywych densytometrycznych. Użyte wyniki zestawiono w tab. 1—4.

Dzieląc podjednostki gliadyn i glutenin na dwie grupy o niskich wartościach R_f od 0—200 (R_f × 1000), czyli o większych ciężarach oraz na szybko wędrujące o R_f powyżej 200, a więc o średnich i niższych ciężarach określono w wyżej omówionych białkach procentową zawartość podjednostek cięższych i pozostałych (średnich i lżejszych). Wyniki zestawiono w tab. 5 i 6.

Tab. 5. Udział procentowy podjednostek o R_f od 0 do 200 oraz powyżej 200 w gluteninach i gliadynach rozdzielanych elektroforetycznie w kwaśnym żelu poliakrylamidowym

Per cent content of subunits R_f 0—200 and above 200 in glutenines and gliadines determined with disc electrophoresis in acidic polyacrylamide gel

R _f × 1000	Gluteniny				Gliadyny			
	Ż	P	T ₂₇₅	T ₂₉₄	Ż	P	T ₂₇₅	T ₂₉₄
0—200	38,5	55,0	72,7	47,0	49,3	49,9	54,8	67,6
Powyżej 200	61,5	44,8	28,1	52,4	49,6	47,2	45,2	32,3

Tab. 6. Udział procentowy podjednostek o R_f od 0 do 200 oraz powyżej 200 w gluteninach i gliadynach rozdzielanych elektroforetycznie w zasadowym żelu poliakrylamidowym

Per cent content of subunits R_f 0—200 and above 200 in glutenines and gliadines determininal with disc electrophoresis in basic polyacrylamide gel

$R_f \times 1000$	Gluteniny				Gliadyny			
	Ż	P	T ₂₇₅	T ₂₉₄	Ż	P	T ₂₇₅	T ₂₉₄
0—200	54,7	60,3	71,7	74,2	70,8	87,6	81,4	80,1
Powyżej 200	45,4	39,9	28,3	25,8	29,2	12,5	18,6	19,4

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Porównując uzyskane wyniki rozdziału poszczególnych gliadyn i glutenin w kwaśnym i zasadowym żelu poliakrylamidowym metodą elektroforezy zaobserwowano występowanie w nich różnej liczby podjednostek. Podjednostki te różniły się ruchliwością elektroforetyczną określoną za pomocą $R_f \times 1000$. W gliadynach żyta, zarówno w kwaśnych, jak i zasadowych żelach, występowała taka sama liczba podjednostek — 10, a w gluteninach żyta — 8 podjednostek. Gliadyny pszenicy wykazywały różną ilość podjednostek w zależności od pH żelu. W żelu zasadowym wykazano obecność 9, a w kwaśnym — 10 podjednostek. Natomiast gluteniny pszenicy w środowisku zasadowym rozdzielały się na 9, a w kwaśnym na 10 podjednostek. Różnica w liczbie podjednostek wchodzących w skład białka gliadyn i glutenin uwidaczniały się pomiędzy dwiema odmianami pszenżyta: T₂₇₅ i T₂₉₄. W żelu zasadowym gliadyny T₂₇₅ rozdzieliły się na 10, a T₂₉₄ na 8 podjednostek. Natomiast w gluteninach T₂₇₅ w żelu kwaśnym wykazano obecność 12, a w T₂₉₄ aż 13 podjednostek. Białka glutenin T₂₇₅ i T₂₉₄ rozdzielały się w żelu zasadowym tylko na 7 podjednostek. Na podstawie opisanych obserwacji można stwierdzić, że na rozdział frakcji białkowych gliadyn i glutenin metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym ma wpływ pH środowiska.

Na podkreślenie zasługuje spostrzeżenie, że gliadyny izolowane z różnych zbóż poza wspólnymi podjednostkami o analogicznej ruchliwości elektroforetycznej posiadały charakterystyczne podjednostki występujące tylko w gliadynach jednego gatunku zboża. Spostrzeżenie to odnosi się również do frakcji glutenin. Poza tym w gliadynach oraz gluteninach pszenicy, żyta i dwóch odmian pszenżyta występowała różna procentowa zawartość tak zwanych podjednostek lżejszych, o wysokich i średnich R_f , oraz podjednostek ciężkich, o niskich R_f . Wyniki zestawiono w tab. 5 i 6. Procentowy udział podjednostek cięższych jest największy w gliadynach pszenicy, a najniższy w gliadynach żyta. Dwie odmiany pszenżyta zaj-

mują pozycję pośrednią i posiadają mniej podjednostek cięższych niż gliadyny pszenicy, a więcej niż gliadyny żyta.

Najwyższą procentową zawartość podjednostek ciężkich zaobserwowano w gluteninach dwóch odmian pszenżyta, a najniższą w gluteninach żyta. Istnieje pogląd, że przewaga podjednostek cięższych nad lżejszymi i właściwy ich stosunek ilościowy w gliadynach i gluteninach ma dodatni wpływ na własności strukturotwórcze i plastyczność glutenu (8). Przeprowadzone badania dowodzą zmienności gliadyn i glutenin analizowanych zbóż oraz złożonego charakteru tych białek, będących połączeniem podjednostek o różnych ciężarach cząsteczkowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Chen C. H., Bushuk W.: *Can. J. Plant. Sci.* **60**, 15—24, 1970.
2. Cluskey J. E., Taylor N. W., Charley H., Senti F. R.: *Cereal Chem.* **38**, 325—335, 1961.
3. Davis B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404—427, 1964.
4. Elton G. A. M., Ewart J. A. D.: *J. Sci. Food Agric.* **13**, 62—67, 1962.
5. Elton G. A. M., Ewart J. A. D.: *J. Sci. Food Agric.* **15**, 119—121, 1964.
6. Graham J. S. D.: *Austral. J. Biol. Sci.* **16**, 342—349, 1963.
7. Graham J. S. D., Morton R. K.: *Austral. J. Biol. Sci.* **16**, 356—357, 1963.
8. Hess K.: *Kolloid Ztschr.* **141**, 19—22, 1955.
9. Jones R. W., Taylor N. W., Senti F. R.: *Arch. Biochem. Biophys.* **84**, 363—376, 1959.
10. Jones R. W., Babcock G. E.: *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 483—485, 1968.
11. Jones R. W., Dimler R. J.: *Cereal Chem.* **39**, 336—341, 1962.
12. Kamiński E.: *J. Sci. Food Agric.* **13**, 603—615, 1962.
13. Lee J. W., Tracey M., Winsor D. J.: *Austral. J. Biol. Sci.* **16**, 717—726, 1963.
14. Padmoyo M., Högl O.: *Mitt Lebensm., Hyg. Bern.* **53**, 290—320, 1962.
15. Pence J. W., Nimmo C. C.: *Backer's Digest* **38**, 38—41, 1964.
16. Woychik J. H., Boundy J. A., Joyce A., Dimler R. J.: *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 477—482, 1961.
17. Wright W. B., Brown P. J., Bell A. W.: *J. Sci. Food Agric.* **15**, 56—62, 1964.
18. WU Y. V., Cluskey J. E., Sexon K. R.: *Biochim. Biophys. Acta* **133**, 83—90, 1967.

Otrzymano 23 XI 1978.

РЕЗЮМЕ

Проведенные исследования доказали большую гетерогенность белка глиадина и глютеина выделенного из пшеницы, ржи и двух сортов пшенжита. Методом электрофореза в геле полиакриламида обнаружено, что вышеупомянутые белки состоят из ряда подединиц с разной электрофоретической подвижностью.

Между глиадинами так же, как и глюteniнами исследуемых хлебов выступили разницы в их структуре, выражающиеся как в количестве, так и в электрофоретической подвижности выступающих в них подединицах.

S U M M A R Y

Investigations carried out proved a high heterogeneity of gliadins and glutenins proteins isolated from wheat, rye and two Triticale varieties. By using the electrophoresis in polyacrylamide gel method it was shown that the above mentioned proteins consist of many subunits of various electrophoretic mobility. Some differences in structure among gliadins and among glutenins of the analysed corn were observed. These differences were shown in the amount and electrophoretic mobility of subunits found in them.