

УДК 543.545:547.91

Т. И. Дьячук, С. К. Рудных, Е. К. Барнашова, Е. Д. Грибова**Разработка процесса выделения глиадины из зерновой культуры тритикале и способа идентификации образца методом капиллярного электрофореза**

Из зерновой культуры тритикале методом прямого помола получена мука. Для выделения из муки запасного белка растений – глиадины был применен модернизированный метод Осборна, заключающийся в постадийной отмывке фракций водой, спиртом, бензолом и этиловым эфиром. Полученный белок исследован методом капиллярного электрофореза. На электрофореграмме наблюдается ряд соединений, обладающих близкими значениями молекулярной массы.

Ключевые слова: тритикале, мука тритикале, идентификация белков, глиадин, капиллярный электрофорез

Об авторах

Дьячук Таисия Ивановна – д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории клеточной селекции федерального государственного учреждения «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока». *E-mail*: cell_selection@list.ru. 410010, г. Саратов, ул. Тулайкова, 7.

Рудных Сергей Константинович – аспирант кафедры химии, новых технологий и материалов государственного университета «Дубна».

Барнашова Екатерина Константиновна – к.с.-х.н., биолог лаборатории клеточной селекции федерального государственного учреждения «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока».

Грибова Елена Дмитриевна – к.х.н., доцент кафедры химии, новых технологий и материалов государственного университета «Дубна».

В последнее время в условиях современных требований к организации сельскохозяйственного производства происходит интенсификация процессов земледелия. В связи с этим происходит вовлечение в севооборот новых высокоэффективных культур и сортов, обеспечивающих гарантированную отдачу в процессе интенсивного земледелия [1]. Одной из перспективных зерновых культур является тритикале, надёжное использование которой осуществляется за счёт повышенной всхожести и зимостойкости растений в неблагоприятных погодных условиях, вызванных суровыми зимами и сухостью климата [3].

Впервые фертильный октоплоидный амфидиплоид тритикале в 1888 г. выявили из гибридной популяции – местная саксонская пшеница × рожь Шланштедская. В настоящее время тритикале считается самостоятельным ботаническим родом – Тритикале (*Triticosecale Wittmack ex A. Camus*) [10]. Три-

тикале, в сравнении с другими злаками, обладает впечатляющей экологической пластичностью в сочетании с продуктивностью. Интенсивно ведется селекция этой новой культуры. Появляются новые варианты использования зерна и зеленой массы. В мире площади посева ее превысили 3,5 млн гектар, в России – примерно 200–300 тысяч гектар [4]. В Госреестр России 2018 года уже включен 71 сорт зерновых тритикале для различного использования. Климат на Юго-Востоке России меняется в сторону усиления континентальности, засушливости. Поэтому на тритикале здесь возлагают большие надежды и как на сырье для сенажа, и как на зерно – источник белка и углеводов для различных видов производств. В последнее время климат характеризуется усилением варьирования абиотических лимитирующих факторов. Суровые зимы чередуются с мягкой погодой с длительными оттепелями и возобновлением вегетации озимых в январе-феврале с последующими возвратными морозами. Изменение климата обусловило заметные подвижки в ареалах распространения

ния болезней и вирусов, характере конкуренции среди видов и штаммов болезней, росте их вирулентности. Возросли потери от грызунов и насекомых. При таких погодных условиях отчетливо проявляется основное достоинство тритикале – более высокая устойчивость и конкурентоспособность в сравнении с другими злаками в условиях нарастания аридизации климата, усиления его континентальности. В зависимости от содержания белка, крахмала, реологических свойств теста продукцию зерновых тритикале предполагается использовать для хлебопечения, кондитерского, бродильного производств, изготовления круп. Комбикормовое направление особенно перспективно в связи с внедрением национальных проектов по животноводству, принятых в России и в Европе [2].

Основной отличительной чертой тритикале является высокое содержание белков в муке, превышающее их содержание в муке пшеницы и ржи. Белки необходимы для получения питательных пекарных продуктов: печенья, вафель, коржей, хлебцев, галет и т.п., поэтому оценка качества белкового состава тритикале является актуальной задачей.

В настоящее время имеется целый ряд разработанных технических условий на зерно, муку разных помолов, хлебопекарные изделия, комбикорма. Имеется достаточно много технологий изготовления этанола из зерна тритикале, рецептур выпечки хлеба, печенья, производства быстрых завтраков и макаронных изделий [5].

По внешнему виду зерно современных сортов тритикале трудно отличить от пшеничного. Преимущество аминокислотного состава белков тритикале делает возможным развитие направления по выделению белковых продуктов из муки, зерна и отрубей [6] для пищевых и кормовых целей, чтобы использовать их как функционально-технологические добавки или белковые обогатители.

Выделяются следующие основные направления использования зерна тритикале:

1) приготовление диетического хлеба из муки тритикале по ржаной и другим методикам (хлеб «Целебный» из обойной муки тритикале, КНИИСХ, 2003 г.; хлеб из 75% муки тритикале, Адыгея, 2005 г.; хлеб по техноло-

гии ЗАО «Русь» Буденовского района Ставропольского края и др.);

2) выпечка многокомпонентного хлеба из смеси тритикалевой, пшеничной, ржаной и другой муки в разных соотношениях – сорта с высоким или повышенным содержанием белка и клейковины (хлеб Степной, Воронежский ГАУ, 2004 г.; хлеб тритикально-пшеничный, Адыгея, 2005 г. и др.);

3) кондитерское производство – сорта со средним содержанием белка и низкими показателями силы муки (печенье, кексы, трюфеля, рулеты к чаю и др.);

4) бродильное производство – сорта с низким содержанием белка; повышенный выход спирта из зерна тритикале в сравнении с пшеничным; приготовление пива из смеси зерна тритикале и ячменя (Лидский пивзавод, Белоруссия);

5) комбикормовое производство – сорта со средним и высоким содержанием белка и не отмываемой клейковиной [7].

Зерно тритикале отличается повышенным содержанием глиадины по сравнению с пшеницей и кукурузой, а также имеет сопоставимые показатели по массовой доле белка с зерном ржи и пшеницы, в тоже время массовая доля свободных аминокислот в зерне тритикале больше чем в зерне пшеницы [9], т.е. композиция белков этих культур может привести к более сбалансированному составу незаменимых аминокислот, таких как изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин и треонин [8].

Характерной особенностью глиадины является плохая растворимость в воде, обусловленная наличием гидрофобных групп на поверхности молекулы белка. Для перевода его в раствор используют различные органические растворители. Однако они могут денатурировать белок, разрушая не только слабые водородные, но и более сильные ковалентные связи, такие как дисульфидные связи макромолекулы [13].

Глиадин хорошо растворяется в водно-спиртовых смесях, содержащих 60–70% спиртов: этанола, метанола и др. Именно на этом основании Осборн и выделил глиадин пшеницы и других культур в особую группу спирторастворимых белков – проламинов, наличие которых является признаком, отличающим

зерно злаковых культур от семян растений других семейств.

Методы извлечения глиаина и получения его чистых препаратов можно разделить на две группы:

- извлечение непосредственно из муки или размолотого зерна с использованием многократной экстракции водно-спиртовой смеси;
- извлечение белка из сырой или лиофилизированной клейковины, выделенной из зерна.

Разработка простого и эффективного способа качественной и количественной оценки белков, содержащихся в природных субстанциях, с дальнейшей процедурой их выделения и идентификации различными аналитическими методами является перспективным направлением исследования продукции сельскохозяйственного производства. В настоящее время для осуществления процедуры выделения глиаина применяется метод Осборна (непрерывная буферная система в однородном геле), разработанный и получивший широкое распространение в первой половине XIX в. В данном методе следует обратить особое внимание на подготовку белкового препарата. Сопоставлять молекулярные массы белков по скорости их миграции можно только в том случае, когда есть уверенность в полной денатурации белка при обработке его додецилсульфатом натрия. Для проведения исследований на современном уровне, с использованием эффективного аналитического оборудования, безусловно, требуется модернизация и усовершенствование указанного метода работы с материалами природного происхождения [12].

Методы исследования белков

Электрофорез занимает сейчас центральное место среди методов исследования белков и нуклеиновых кислот. В современной научной литературе редко можно встретить статью, в которой бы на той или иной стадии фракционирования или характеристики биополимеров не был использован электрофорез. Метод позволяет разделять биомолекулы, различающиеся по таким важнейшим параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, структура и электрический заряд, причем эти параметры могут выступать как порознь, так и в совокупности. Для анализа биомолекул используют

капиллярный электрофорез в вариантах капиллярного зонного электрофореза, где разделение происходит за счет различия в электрофоретических подвижностях компонентов анализируемой смеси, гель-электрофореза, где происходит разделение молекул по размерам, и вариант мицеллярной электрокинетической хроматографии, основанной на различном распределении аналитов между псевдостационарной мицеллярной фазой и раствором электролита.

Метод капиллярного электрофореза (КЭ) является наиболее простым вариантом и позволяет разделять заряженные частицы смеси в капилляре под действием приложенного электрического поля (напряжение до 30 кВ) в соответствии их электрофоретическими подвижностями. Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода. В зависимости от величины заряда и размеров молекулы двигаются с различными скоростями. К преимуществам метода КЭ относится высокая эффективность разделения (сотни тысяч теоретических тарелок), малая продолжительность времени анализа, простота аппаратного оформления. При этом важным является тот факт, что в КЭ, в отличие от ВЭЖХ, в качестве подвижных фаз используют биосовместимые водные среды вместо органических растворителей или водно-органических смесей. Варьирование в разумных пределах таких параметров, как pH, состав буферной системы, ионная сила раствора, температура, позволяет свести к минимуму влияние факторов, приводящих к изменению исходного распределения белков, что является залогом достоверности результатов анализа. Таким образом, КЭ удовлетворяет одному из основных требований анализа, связанному с сохранением неизменными химические формы компонентов объекта в процессе разделения и определения.

Целью работы является разработка эффективной системы выделения глиаина из зерна и его идентификации для оценки качества состава тритикале. В настоящем исследовании проведено изучение процесса выделения глиаина из помола тритикале и его определения методом КЭ.

Объект исследования

В данной работе объектом исследования является состав прямого помола, полученный из зерновой культуры тритикале, выращенной на экспериментальных площадках НИИ сельского хозяйства Юго-Востока в Саратовской области в 2020 г. Зерно обрабатывалось с использованием стандартных методов [11] и затем подвергалось помолу. Помол представляет собой однородную массу бледно-розового цвета. Для выделения белков к составу, полученному в результате помола, был применен модернизированный метод Осборна. При хранении в нормальных условиях состав не подвергается структурным изменениям; процессы гниения и деструкции не наблюдались. Для определения состава белков был использован капиллярный электрофорез.

Экспериментальная часть. Материалы, реактивы и оборудование

Зерно тритикале (НИИ с-х Юго-Востока, Саратовская обл.). Гидрофосфат натрия ч.д.а, Na_2HPO_4 (Химмед, Россия). Дигидрофосфат калия, KH_2PO_4 , 90,0% (Лабтех,

Россия). Этанол (Aldrich, Швейцария). Бензол (Aldrich, Швейцария).

Лиофильная сушка CHRIST Alpha 2-4 LPplus (Martin Christ, Германия), система капиллярного электрофореза Agilent 7100 (Agilent, США) снабженного диодно-матричным детектором, ротационный испаритель Hei-VAP Advantage фирмы "Heidolph". Система подготовки деионизированной воды Elix Advantage 5 с блоком E-POD (Millipore, USA).

Выделение глиадина из зерна тритикале

Для отработки методики выделения белков из состава прямого помола зерна тритикале была разработана последовательность операций выделения глиадина – белка, входящего в компонентный состав запасных белков растений.

Методика выделения глиадина из состава прямого помола зерна тритикале. Выделение глиадина происходило в несколько этапов в соответствии с представленной технологической блок-схемой (рис. 1).

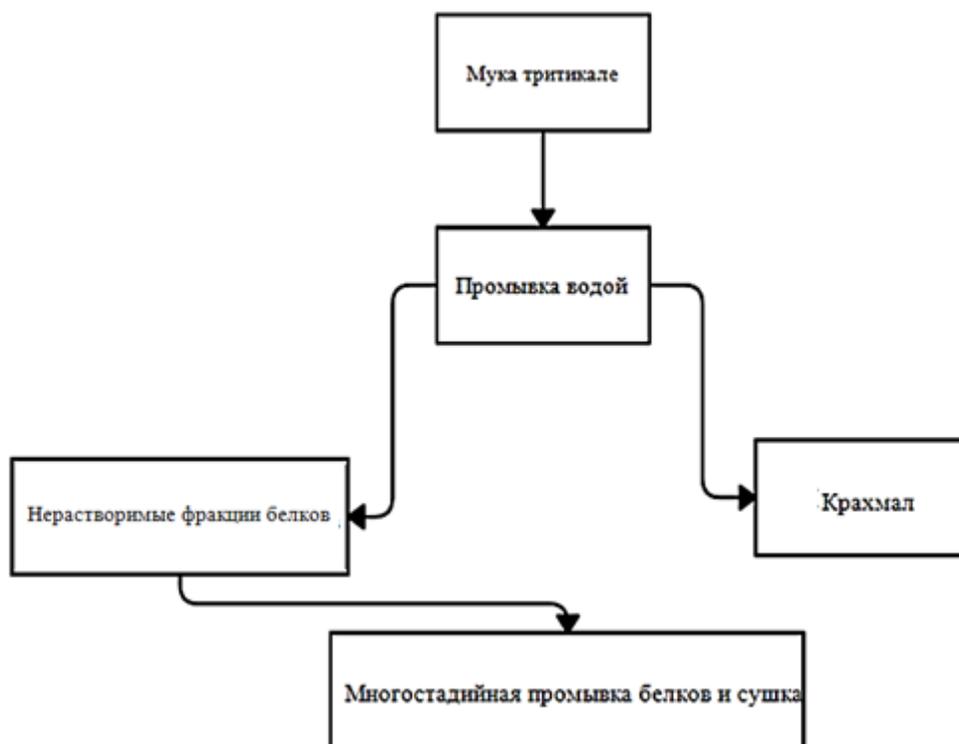


Рис. 1. Блок-схема извлечения белка глиадина из зерна тритикале

На первом этапе выделения белков из зерна тритикале проводят отделение крахмала.

Для этого в стеклянный стакан объёмом 1 литр отбирают навеску молотого зерна тритикале прямого помола массой 100,0 г. Заливают 500 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают в течение 2,5 минут. Водный слой становится мутным за счёт перехода крахмала, содержащегося в частицах помола зёрен тритикале, в водную фазу. Не давая взвеси осесть, водный слой отделяют декантацией. К осадку в стакане добавляют новую порцию 500 мл дистиллированной воды. И повторяют операцию отмывки измельченных зёрен от крахмала не менее 5 раз до получения почти прозрачной водной фазы.

На второй стадии проводят очистку и выделение гидрофобных белков. Для этого, после отделения последнего промывного слоя воды, осадок в стакане заливают 600 мл водно-спиртового раствора, содержащего 75% масс. этанола. Содержимое стакана тщательно перемешивают и оставляют на 20 часов, периодически перемешивая. Затем осадок отфильтровывают на фильтре Шотта с использованием вакуума, отделяя жидкую фракцию. Осадок на фильтре дважды промывают порциями водно-спиртового раствора по 50 мл. Полученные экстракты объединяют.

Третьим этапом выделения является упаривание на ротационном испарителе экстракта и удаление остаточной влаги из образца с использованием различных растворителей.

Упаривание на ротационном испарителе проводят при следующих параметрах: остаточное давление – 100 мБар; температура 32,5°C. Упаривание растворителя проводят в течение 2 часов, до удаления основной массы водно-спиртового азеотропа. Затем к остатку добавляют порциями 50 мл бензола, не содержащего воды, и упаривают до полного удаления жидкой фракции. К содержимому колбы добавляют 50 мл абсолютного этанола и перемешивают при комнатной температуре в течение 10 минут, спирт отгоняют. Операцию повторяют дважды. Далее к содержимому колбы добавляют 50 мл абсолютного этилового эфира и перемешивают при комнатной температуре в течение 10 минут, затем отгоняют эфир. Операцию повторяют дважды. На заключительном этапе выделения образец

лиофилизуют, для чего образовавшийся в колбе осадок переносят в чашку Петри и помещают в лиофильную сушилку CHRIST Alpha 2-4 LPplus, где образец выдерживают при комнатной температуре и остаточном давлении – 0,1 мБар в течение 16 часов.

Полученный образец представляет собой кристаллический порошок светло-желтого цвета.

Полученный образец был проанализирован методом капиллярного электрофореза. Анализ глиаина проводили с использованием системы капиллярного электрофореза Agilent 7100 (Agilent, США), снабженного диодно-матричным детектором с кварцевым капилляром следующей геометрии: $L_{эф}/L_{общ}$ 50/58,5 мм, диаметр 50 мкм. Ввод пробы – гидродинамический. В качестве фонового электролита применяли боратный буферный раствор (pH = 9,2). Пики регистрировали при рабочей длине волны $\lambda = 220$ нм, напряжение приложенного электрического поля 25 кВ. Между анализами капилляр кондиционировали в течение 10 мин фоновым электролитом. Перед началом работы электрод промывают 1 М NaOH (5 мин), деионизированной водой (5 мин) и фоновым электролитом (10 мин).

Результаты и их обсуждения

Предложенный комбинированный метод выделения глиаина из зерна тритикале позволяет увеличить выход и улучшить качество выделяемого белка. Для анализа выделенной белковой фракции был выбран КЗЭ, с использованием в качестве фонового электролита боратного буфера с pH = 9,2, т.к. при этом pH белки имеют положительный заряд и минимизируется их сорбция на стенках капилляра.

На рис. 2 представлена полученная электрофореграмма белковой фракции, выделенной из зерна тритикале.

По представленным результатам можно заметить, что выделенный образец глиаина не является однородным. На электрофореграмме наблюдается ряд белков, обладающих близкими значениями молекулярной массы. Наиболее интенсивным является пик с временем миграции 4,15 мин.

Таким образом, на основе реализации методики выделения глиаина с применением современного лабораторного оборудования

и использования для анализа белковой фракции высокоэффективного аналитического метода КЭ было установлено, что глиадиновая

фракция образца прямого помола тритикале представляет собой смесь гидрофобных белков с различной молекулярной массой.

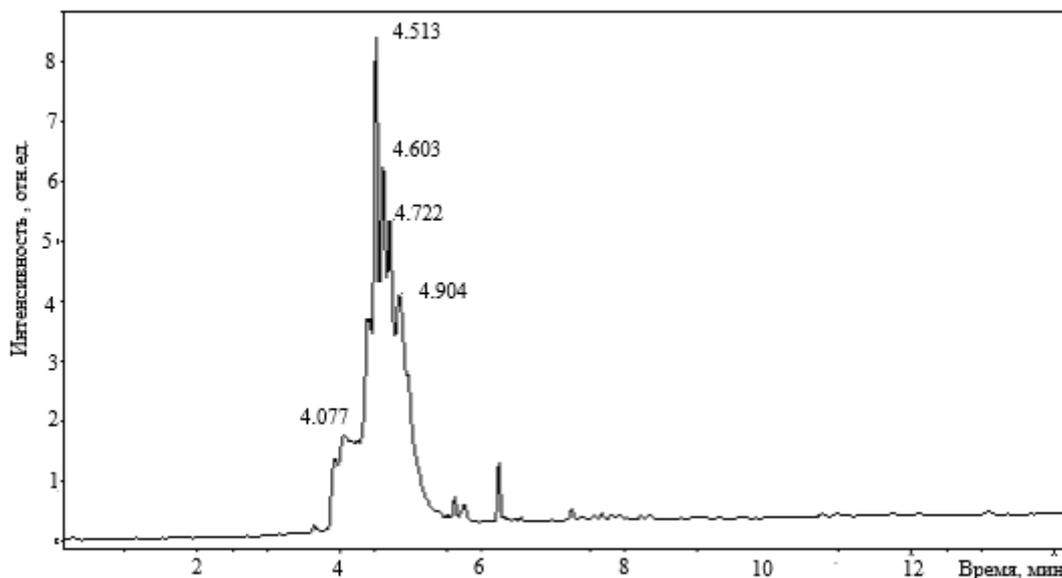


Рис. 2. Электрофореграмма белка глиадина

Заключение

В последнее время для выделения белков из зерновых культур широко используется метод Осборна. Достоинствами этого метода является низкая стоимость, простота, экологичность, но в тоже время для работы с современным аналитическим оборудованием требуется его модернизация.

В результате экспериментального исследования перспективной зерновой культуры – тритикале – была проведена модернизация методики выделения глиадина с использованием современного лабораторного оборудования. Полученный образец описан и проанализирован с применением высокоэффективного химико-аналитического метода – капиллярного электрофореза. Результаты анализа показали, что выделенные из пшеничной муки образцы глиадина не являются однородным белком, как в свое время предполагал Осборн. Глиадин, содержащийся в образце прямого помола тритикале, представляет со-

бой смесь белков с близкими молекулярными массами.

Библиографический список

1. Бутковский В.А., Мельников Е.М. Технология мукомольного, крупяного и комбикормового производства. М.: Агропромиздат, 1989. 464 с.
2. Витол И.С., Карпиленко Г.П., Кандроков Р.Х., Стариченков А.А., Коваль А.И., Жильцова Н.С. Белково-протеиназный комплекс зерна тритикале // Хранение и переработка сельхозсырья. 2015. № 8. С. 36–39.
3. Леонова С.А., Погонец Е.В. Технология крупы из пророщенного зерна тритикале // Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов. 2016. № 1(36). С. 30–33.
4. Погонец Е.В., Леонова С.А. Характеристика технологических свойств тритикале сорта Башкирская короткостебельная // Зерновое хозяйство России. 2011. № 3. С. 63–67.
5. Чумикина Л.В., Арапова Л.И., Колпакова В.В., Топунов А.Ф. Активность ферментов обмена глутамина в прорастающем зерне тритикале // Фи-

зиология растений и генетика. 2013. Т. 45, № 5. С. 390–398.

6. Aprodu I., Banu I. Comparative analyses of physicochemical and technological properties of triticale, rye and wheat // *Annals of the University Dunarea De Jos of Galati, Fascicle Vi-Food Technology*. 2016. Т. 40, № 2. С. 31–39.

7. Bellil I., Bouguennec A., Khelifi D. Diversity of Seven Glutenin and Secalin Loci within Triticale Cultivars Grown in France // *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2010. Т. 38, № 2. С. 48–55.

8. Jiang Q.T., Wei Y.M., Andre L., Lu Z.X., Pu Z.E., Peng Y.Y., Zheng Y.L. Characterization of omega-secalin genes from rye, triticale, and a wheat 1BL/1RS translocation line // *Journal of Applied Genetics*. 2010. Т. 51, № 4. С. 403–411.

9. Lopez A.M.M., Ohm J.-B., Manthey F.A., Rao J., Simsek S. Gluten extraction from deoxyniva-

lenol contaminated wheat by wet milling // *Food Control*. 2021. Т. 120. С. 2.

10. Mehanna M.M., Mneimneh A.T. Updated but not outdated «Gliadin»: A plant protein in advanced pharmaceutical nanotechnologies // *International Journal of Pharmaceutics*. 2020. Т. 587. С. 34.

11. Munoz-Insa A., Gastl M., Becker T. Influence of Malting on the Protein Composition of Triticale (x Triticosecale Wittmack) 'Trigold' // *Cereal Chemistry*. 2016. Т. 93, № 1. С. 10–19.

12. Prabucka B., Drzymała A., Grabowska A. Molecular cloning and expression analysis of the main gliadin-degrading cysteine endopeptidase EP8 from triticale // *Journal of Cereal Science*. 2013. Т. 58, № 2. С. 284–289.

13. Salmanowicz B.P., Nowak J. Diversity of Monomeric Prolamins in Triticale Cultivars Determined by Capillary Zone Electrophoresis // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009. Т. 57, № 6. С. 2119–2125.

*Поступила в редакцию
27.11.2020*