

Двтор ер.

А 64

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО  
СПЕЦИАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ УССР

ОДЕССКИЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ  
ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ  
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

---

НА ПРАВАХ РУКОПИСИ

ЛИТВИНОВ  
АНАТОЛИЙ МАКАРОВИЧ

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ  
КЛЕЙКОВИННЫХ БЕЛКОВ ПШЕНИЦ  
РАЗНОГО КАЧЕСТВА**

Специальность 03.00.04—биохимия

Диссертация написана на русском языке

**АВТОРЕФЕРАТ**  
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ  
КАНДИДАТА ТЕХНИЧЕСКИХ НАУК

ОДЕССА—1973



МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
У С С Р

ОДЕССКИЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ  
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

ЛИТВИНОВ Анатолий Макарович

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕЙКОВИННЫХ  
БЕЛКОВ ПШЕНИЦ РАЗНОГО КАЧЕСТВА

Специальность 08.00.04 - биохимия

Диссертация написана на русском языке

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

Диссертации на соискание ученой степени  
кандидата технических наук

Одесса - 1973

012248

Одесский технологический  
институт пищевой промыш-  
ленности им. М.В. Ломоносова  
Б И Б Л И О Т Е К А

Принят 1973



Работа выполнена на кафедре технологии хранения пищевых продуктов и зерноведения Одесского технологического института пищевой промышленности имени М.В.Ломоносова.

Научные руководители :

доктор биологических наук, профессор! Н.В.Роменский ;  
кандидат технических наук, доцент В.А.Якованко ;  
доктор биологических наук, профессор Г.В.Троицкий.

Официальные оппоненты :

доктор биологических наук, профессор А.Б.Вакар ;  
доктор медицинских наук, профессор А.Я.Розанов ;  
кандидат технических наук, доцент А.Ф.Загибалов.

Ведущее учреждение - Всесоюзный селекционно-генетический институт.

Автореферат разослан " 11 " ноября 1973 г.  
Защита диссертации состоится " 21 " декабря 1973 г.  
на заседании совета Одесского технологического института пищевой промышленности имени М.В.Ломоносова.

Просим Ваши отзывы в двух экземплярах, заверенные печатью учреждения, направлять по адресу: г.Одесса, ГСП-510, ул.Свердлова, 112, Технологический институт пищевой промышленности имени М.В.Ломоносова.

УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ СОВЕТА

Л.А.ЗАПОРОЖЕЦ



## ВВЕДЕНИЕ

Большое значение сильных пшениц в хлебном балансе страны и на международном рынке вызывает необходимость увеличения производства высококачественного зерна. О важности осуществления этих мероприятий особо подчеркивается в Директивах XXIV съезда КПСС по развитию народного хозяйства на 1971-1975 годы.

Изучение природы качества клейковинного белка представляет интерес не только для теоретической биохимии растительных белков, но имеет важное прикладное значение. Прикладное значение изучаемого вопроса состоит в том, что качество белков эндосперма, по общему мнению, в значительной мере определяет "силу" муки, то есть ее хлебопекарные достоинства, и "силу" пшениц в понимании их смешительной ценности. (Ауэрман, 1941, 1956; Суворов, 1955; Кравцова, 1959; Кретьевич, 1971; Ковымина, 1959; Вакар, 1961, 1966; Любарский, 1961; *Dimler*, 1965; *Sullivan*, 1965; Куприц, 1959; Коньков, 1967; *Elton, Swart*, 1968; *Jankiewicz*, 1968; *Todon*, 1970; Казаков, 1970; Стрельникова, 1971 и др.).

Связь структуры клейковинных белков с их физико-химическими свойствами несомненна. Однако литературных сведений о структуре клейковинных белков совершенно недостаточно, чтобы выяснить при каких отличительных особенностях и на каком уровне молекулярной структуры проявляются свойства, определяющие качество клейковины.



Установление природы принципиальных отличий клейковинных белков разного качества важно не только в целях более глубокой разработки методов технологической оценки зерна, но и для изыскания способов устранения изменчивости сорта пшеницы в отношении его "силы".

Цель настоящего исследования – сравнительное изучение структуры клейковинных белков разного качества.

В соответствии с целью работы поставлены следующие задачи: 1. Исследовать, используя метод пептидных карт, крайние по свойствам растворимости фракции клейковинных белков разных по силе пшениц. 2. Изучить различия во вторичной структуре основных белковых составляющих клейковины сильных и слабых пшениц методом дисперсии оптического вращения. 3. Используя зерно, пораженное клопом-черепашкой, исследовать распад структур, который приводит к утере клейковиной присущих ей свойств. 4. Определить, какие свойства зерна, поврежденного клопом-черепашкой, могут быть положены в основу диагностики пораженности.

#### ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили клейковинные белки разных по "силе" пшениц и пшениц, пораженных клопом-черепашкой.

Белки здорового зерна, урожая 1969 г., выделяли из муки 70%-ного выхода. Исследуемые пшеницы: Саратовская 29 и Акмолинка I выращены в Саратовской области, Безостая I,



Одесская-26, Одесская-16, Одесская-3 и Восход - на полях Всесоюзного селекционно-генетического института.

Белки зерна, поврежденного клопом-черепашкой, исследовались на сортах ОД-16 и Безостая I, урожая 1971 г. Эти сорта выращивались на смежных участках, и, следовательно, в равных условиях подвергались нападению вредителей. Основное повреждение зерна нанесено в период его восковой спелости.

Образцы с различным процентом пораженных зерен готовили путем смешивания здоровых и пораженных зерновок. Из этих образцов получали муку 70 %-ного выхода при размоле их на мельнице Бюлера.

Технологическая оценка качества зерна производилась по методикам, представленным в литературе (Методы оценки технологических качеств зерна, 1971).

Вес 1000 зерен, натуральный вес, стекловидность, выход сырой и сухой клейковины, ее упругие свойства определяли (на приборе ПЭК-3А) по методикам государственного стандарта. Физические свойства теста - на альвеографе Шопена, фаринографе Брабендера, набухаемость муки с навеской 3,2 г. - по А.Я.Пумпянскому (Пумпянский, 1961).

Пробную выпечку проводили с обогащенной рецептурой теста: мука 100 г., сахар 4 г., соль 1,5 г., дрожжи сухие гведские 2 г., бромноватокислый калий 1 мг.

Препаративное выделение клейковинных белков. Учитывая трудность получения общепринятыми методами препаратов глиаина и глютенина, чистых от взаимного загрязнения друг



другом, выделяли белки, обладающие крайними свойствами по растворимости в растворах салицилата натрия с исключением части белковых фракций, имеющих промежуточную между ними растворимость. При разработке методики выбор растворителя основывался на способности салицилата натрия сохранять сортовые особенности клейковинного белка и, в меньшей степени, чем другие растворители, производить необратимые изменения в белке (Вакар, 1961).

Легкорастворимые белки извлекали на холоду из муки 4 %-ным раствором салицилата натрия, приготовленном на 10 %-ной сахарозе, (с целью защиты крахмала от растворения) и высаливали сернокислым магнием 20 % от насыщения.

Труднорастворимые — из осадка раствором 0,05N щелочи с предварительным извлечением промежуточной фракции 7%-ным раствором салицилата.

После диализа, лиофильной сушки, перерастворения в алюмолактатном буфере (рН 3,1) и многократной очистки на препаративном электрофоретическом приборе типа ЭФПБ-1 готовили лиофильновысушенные препараты. Препараты белков в виде блестящей белой массы имели волокнистое строение, один из них растворялся в 70 %-ном этаноле, и, следовательно, соответствовал глиадину, а другой — не растворялся в нем и поэтому соответствовал глютенину. Содержание белка в полученных препаратах ( $5,7 \times 10^{-4}$  белкового азота) составляет от 97,5 до 98 % сухого вещества.



Получение пептидных карт. Пептидные карты трип-  
тических гидролизатов белков получали по прописи  
(Ажицкий, Ромаскевич, 1972). Окраску пептидов производили  
реактивом Холмана (Байли, 1965).

Измерение дисперсии оптического вращения. Спектро-  
поляризметрические измерения проводили на фотоэлектрическом  
приборе (Троицкий, Кобозев, 1964) с поляризметрической  
трубкой длиной 5 см. Измерения оптической активности про-  
водили на следующих длинах волн: 579, 546, 436, 405, 365,  
334 и 313 мкм.

Белки исследовали при концентрации 0,3 % в 0,005 М  
алюмолактатном буфере, pH 3,1.

Из полученных данных определяли, путем графического  
решения, константы уравнений Друде, Моффита (Wines,  
Doty, 1961,) Троицкий Г.В., Окулов В.И., Кирюхин И.В.,  
1965)  $\lambda_c$ ,  $\alpha_0$ ,  $\beta_0$ .  $\lambda_0$  принималось равным 212 мкм.  
Расчет наличия  $\alpha$  - спиралей проводили по Моффиту  
/уравнение /1/ и на основании уравнения /2/, выведенного  
Троицким (Троицкий, 1965)

$$\alpha \% = \frac{100 \cdot \beta_0}{630}, \quad /1/$$

$$H \% = \frac{\alpha_0 - 2 \beta_0 + 650}{1910} \cdot 100, \quad /2/$$

Пример расчета  $\beta$  - структур произведен по формуле  
/3/ (Троицкий, 1965).

$$\beta \% = \frac{\beta_0 + 650 H}{420}, \quad /3/$$



Изучение белковых препаратов методами пептидных карт и дисперсии оптического вращения проведено в Крымском мединституте.

Сравнительное определение величины амидирования белков пшеничной муки. При сравнительном определении содержания амидов в белках муки пшениц разной "силы" использовали метод паровой дистилляции Коффрани / *Koffran*, 1950/, несколько видоизменив его для работы с белками муки. Этот метод основан на том, что в сильно щелочной среде из белка быстро выделяется аммиак из амидных групп глутаминовых и аспаргиновых аминокислотных остатков. В то же время аминокислотные группы, входящие в состав полипептидной цепи, аминокислотные группы свободных аминокислот отщепляются с трудом.

Фракционирование белков муки. Путем фракционирования клейковинных белков растворами салицилата натрия установлена связь между растворимостью белка и его молекулярным весом. Полученные фракции по седиментационным и диффузионным свойствам, распределялись таким образом, что средний молекулярный вес наиболее растворимой фракции составлял 44000, а наименее - 1.750.000 / *Mc Calla, Galen*, 1942/.

Растворимость белков пшеничной муки исследовали по разработанной нами методике. Выделяли три фракции белков, четвертую, наиболее труднорастворимую, не извлекали, а количественно определяли в остатке муки после экстракции.



Белковые фракции условно классифицировали:

- I - белки, перешедшие из муки в 1%-ный раствор салицилата натрия,
- II - белки, экстрагируемые 6%-ным раствором салицилата натрия, но не высаливаемые сернокислым магнием 0,18 от насыщения,
- III - высоленные белки из 6%-ного раствора салицилата,
- IV - нерастворившиеся белки муки.

Растворимость белка характеризовали условными коэффициентами  $K_1$  и  $K_2$ , которые показывают количественное отношение содержания менее растворимого белка к более растворимому.

Фракционирование белков муки из пшеницы, пораженной клопом-черепашкой, производили по общепринятой схеме в последовательности: вода, соль, спирт, щелочь. Извлечение азотистых веществ муки составляло от 89,5 до 96,0 %.

Электрофоретические исследования спирторастворимых белков проводили на полиакриламидном геле в уксусной кислоте с pH 3,1 по методике Катзимулса в модификации (Конарев, Гаврилюк, Губарева, 1970). Гелевая система содержала 7,5 % акриламид, 35 % уксусную кислоту и 5М мочевины.

Определение сульфгидрильных групп и дисульфидных связей в клейковинных белках.  $SH$ - группы и  $SS$ -связи определяли в клейковине, отмытой согласно государственному стандарту из пшениц Од-16 и Безостая I с различным



процентом зерен, пораженных клопом-черепашкой. Использовали методику амперометрического титрования /Вакар с сотр. 1964, Вакар, 1968/.

Изучение ферментативной активности зерна пшеницы, поврежденных клопом-черепашкой. Активность липазы,  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилаз определяли по Ермакову /Ермаков с сотр., 1952/, протеолитическую активность белков — по кинетике автолиза белков муки. Накопление небелковых азотистых веществ определяли на спектрофотометре СФ-4А при 280 нм.

Определение пораженности пшеницы клопом-черепашкой с использованием прибора. Использование инфракрасных проходящих лучей позволяет осуществлять диагностику пораженности как стекловидных, так и мучнистых зерен /Борщова с сотр., 1971; Вилкова с сотр., 1971/.

С целью облегчения диагностики и ускорения процесса определения зерен, пораженных клопом-черепашкой, разработан методика инфракрасной дефектоскопии зерна и создан соответствующий прибор — ИК — дефектоскоп.

Прибор состоит из источника света, снабженного светофильтром, выделяющим ближнее ИК-излучение, подвижной кассеты на 100 зерен, смонтированной в направляющих на пути светового потока, оптической системы, в свою очередь состоящей из объектива, электронно-оптического преобразователя (ЭОПа) и окуляра. В общий корпус вмонтирован механический четырехклавишный счетчик.



Подсчет пораженных зерен с дифференциацией по степени поражения (величине поврежденной части зерновки—0,25; 0,5; 0,75; 1,0) производили с помощью счетчика.

Пораженность образца устанавливали из среднего арифметического результатов трех определений. Наряду с определением поврежденности пшеницы на приборе проводили определение процента поврежденных зерен согласно методике государственного стандарта /ГОСТ 10841-64/.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### I. Физико-химические особенности клейковинных белков разных по "силе" пшениц

Физико-технологическая характеристика шести сортов пшениц представлена в табл. I.

Из данных табл. I видна существенная разница физических свойств теста пшениц сортов Саратовская 29, Безостая I в сравнении с сортами Восход и Аниолинка I. Мука последних при замесе дает тесто малой устойчивости с относительно низкой валориметрической оценкой, характерной для теста со значительным разжижением.



Таблица I

ФИЗИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
СОРТОВ ПШЕНИЦ

| Сорт                   | Масса 1000 зерен | Натурный вес | Стекловидность | Содержание см-рой клейковины в муке | Удельная работа деформации теста W | Упругость теста P | Коэффициент кон-фигурации альвеограмм P/L | Число седиментации | Объемный выход хлеба | Пористость |
|------------------------|------------------|--------------|----------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------|--------------------|----------------------|------------|
|                        | г                | г/л          | %              |                                     | 10 <sup>-4</sup> Дж/мм             |                   |                                           | мл                 | см <sup>3</sup>      | %          |
| Сара-<br>товская<br>29 | 32,7             | 784          | 90             | 41,5                                | 424                                | 125               | 1,13                                      | 58                 | 500                  | 85         |
| Базос-<br>тая I        | 43,3             | 820          | 83             | 28,0                                | 285                                | 114               | 2,03                                      | 50                 | 550                  | 85         |
| Одес-<br>ская 26       | 40,5             | 810          | 61             | 31,5                                | 298                                | 115               | 1,74                                      | 54                 | 800                  | 95         |
| Одес-<br>ская 3        | 39,6             | 799          | 33             | 26,0                                | 117                                | 81                | 0,71                                      | 37                 | 690                  | 85         |
| Восход                 | 39,8             | 784          | 32             | 25,0                                | 75                                 | 37                | 0,60                                      | 17                 | 470                  | 50         |
| Акмо-<br>линка I       | 22,4             | 740          | 75             | 51,2                                | 202                                | 37                | 0,27                                      | 51                 | 590                  | 65         |

Сорта Саратовская 29 и Базостая I по альвеографической оценке значительно превосходят Восход и Акмолинка I, а пшеницы Од-26 и Од-3 занимают между ними промежуточное положение. Высокое содержание клейковины у пшеницы Акмолинка I



отражается на показателях альвеографической и хлебопекарной оценок. Однако, по высоте альвеограммы она соответствует сорту пшеницы Восход, а по сбалансированности высоты альвеограммы с длиной — ему уступает. Очевидно, альвеограмма более четко характеризует силу пшеницы и на ее показатели влияет не столько количество клейковины, сколько ее качество.

Изучение методом пептидных карт клейковинных белков.

Предпринятая попытка выявить различия в первичной структуре клейковинных белков проводилась на препаратах, выделенных растворами салицилата натрия из контрастных по силе пшениц: яровых — Акмолинка I, Саратовская 29 и озимых — Восход и Безостая I. С этой целью препараты белков, по своим свойствам условно названные глиадин и глютеин, подвергали воздействию трипсина и исследовали методом пептидных карт.

На всех пептидных картах насчитывалось по 42 пятна, из которых: 24 пептида имели положительный заряд, остальные — нейтральный. Следует отметить, что при смещении вправо старта гидролизата отрицательно заряженных пептидов не обнаружено.

Большое сходство пептидных карт исследуемых белков свидетельствует о наличии в них участков с одинаковой или близкой первичной структурой. Некоторые отличия касаются расположения трех пептидов 19, 20, 21. Расшифровка пептидов нами не производилась.



Однако следует отметить, что более существенные отличия в аминокислотном составе данных белков могут быть скрыты за счет того, что их составляющие имеют различное соотношение белковых фракций.

Сравнительная спектрополяриметрическая характеристика белков. В табл.2 приведена характеристика дисперсии оптического вращения глиадинов и глютелинов четырех сортов пшеницы в алюмолактатном 0,005М буфере при pH 3,1.

Анализ данных, приведенных в табл.2, показывает, что глиадин сильных пшениц имеет в два раза больше  $\alpha$  - спиральных участков по сравнению с глютелином.

Вместе с тем, нами обнаружена несколько иная закономерность во вторичной структуре белковых фракций слабых пшениц. Так, во вторичной структуре глиадина сорта Акмолинка I отсутствуют спиральные участки. По-видимому, вторичная структура данного белка представляет собой статистический клубок.

Проведенный расчет  $\beta$  - структур устанавливает наличие в глиадине пшеницы сорта Восход структуру типа  $\beta$  - складчатого слоя.



Таблица 2

СПЕКТРОПОЛЯРИМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛИАДИНА  
И ГЛЮТЕНИНА ЧЕТЫРЕХ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ

| С о р т        | Наименование фракций | $\lambda_{\alpha 1}$<br>546 | $\lambda_{\beta 1}$<br>313 | $\lambda_c$ | $-a_0$ | $-b_0$ | $\alpha\%$ | $H\%$ | $\beta\%$ |
|----------------|----------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------|--------|--------|------------|-------|-----------|
| Саратовская 29 | Глиадин              | 109,3                       | 605                        | 230         | 540    | 120    | 19         | 19    | 0         |
|                | Глютенин             | 114                         | 578                        | 220         | 576    | 44     | 7          | 9     | 3         |
| Безостая I     | Глиадин              | 128                         | 705                        | 230         | 637    | 132    | 21         | 20    | 1         |
|                | Глютенин             | 117,4                       | 613                        | 223         | 592    | 68     | 11         | 10    | -1        |
| Восход         | Глиадин              | 70,1                        | 349                        | 210         | 358    | 16     | 3          | 17    | 22        |
|                | Глютенин             | 114                         | 600                        | 220         | 572    | 76     | 12         | 12    | 0         |
| Акмолинка I    | Глиадин              | 133                         | 643                        | 220         | 683    | 0      | 0          | -2    | -3        |
|                | Глютенин             | 117                         | 622                        | 227         | 590    | 92     | 15         | 13    | -2        |

На основании существующих представлений, вторичная структура белков образуется за счет водородных и других связей. Эти связи в определенной степени могут влиять на создание различных структурных комбинаций. Можно предположить, что незначительные различия в структуре низших порядков по мере образования надмолекулярных структур создают различия во взаимодействии и перераспределении внутримолекулярных и межмолекулярных связей.

Величина амидирования белков пшениц разной силы.

Характерные свойства клейковинных белков объясняются присутствием в их составе большого числа амидных групп.

Содержание амидов в белках определяли, используя метод Коффрани, основанный на паровой дистилляции белка в сильно щелочной среде.



Таблица 3.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ АЗОТА АМИДНЫХ  
ГРУПП БЕЛКОВ ПШЕНИЦ ЧЕТЫРЕХ СОРТОВ

| С о р т        | Общий азот<br>муки, % СВ | Азот амидных групп     |          |                |
|----------------|--------------------------|------------------------|----------|----------------|
|                |                          | Белков муки            | Глиадины | Глюта-<br>нина |
|                |                          | % общего азота образца |          |                |
| Саратовская 29 | 2,82                     | 24,1                   | 23,8     | 21,2           |
| Безостая I     | 2,29                     | 22,1                   | 28,7     | 24,8           |
| Восход         | 1,97                     | 21,3                   | 26,7     | 19,8           |
| Акмолинка I    | 3,24                     | 22,5                   | 28,3     | 27,3           |

Из данных табл.3 следует, что степень амидирования белков пшеничной муки не является строго определенной величиной. Однако, связь качества белков муки со степенью их амидирования не выявлена.

Растворимость белков сильных и слабых пшениц в растворах салицилата натрия. Растворимость белков пшениц в растворах салицилата натрия зависит от их качества и приобретает особый интерес, если связывать ее с величиной молекулярного веса белка. Салицилат натрия обладает способностью комплексообразований с белком и вследствие высокой растворимости переводит последний в раствор.

Исследования проводили по разработанной нами методике. Количественно извлекали три фракции белков, четвертую,



наиболее труднорастворимую, не извлекали, а определяли по белку остатка.

Таблица 4

ПОКАЗАТЕЛИ РАСТВОРИМОСТИ БЕЛКОВ МУКИ  
В РАСТВОРАХ САЛИЦИЛАТА НАТРИЯ

| Сорт            | Азот! муки! |          |          | Содержание белковых фракций |      |      |      | Отношение фракций      |                        |
|-----------------|-------------|----------|----------|-----------------------------|------|------|------|------------------------|------------------------|
|                 | Об-щий      | Бел-ков. | Не-белк. | I                           | II   | III  | IV   | $K_1 = \frac{IV}{III}$ | $K_2 = \frac{III}{II}$ |
|                 | %           |          | СВ       | % к суммарн. белку          |      |      |      |                        |                        |
| Сара-товская 29 | 2,82        | 2,39     | 0,43     | 19,20                       | 35,3 | 13,0 | 32,6 | 2,50                   | 0,37                   |
| Безостая I      | 2,29        | 1,97     | 0,32     | 23,5                        | 28,5 | 17,0 | 31,0 | 1,82                   | 0,60                   |
| Одес-ская 26    | 2,41        | 1,96     | 0,45     | 20,0                        | 36,6 | 16,5 | 27,0 | 1,63                   | 0,45                   |
| Одес-ская 3     | 1,88        | 1,63     | 0,25     | 13,4                        | 29,0 | 25,3 | 32,3 | 1,27                   | 0,90                   |
| Восход          | 1,97        | 1,62     | 0,35     | 17,4                        | 31,0 | 26,6 | 25,0 | 0,94                   | 0,86                   |
| Акмолин-ка I    | 3,24        | 2,96     | 0,30     | 17,4                        | 33,0 | 33,0 | 17,9 | 0,54                   | 1,00                   |

Растворимость белка характеризовали условными коэффициентами  $K_1$  и  $K_2$ , которые показывают количественное отношение содержания менее растворимого белка к более растворимому.

Из полученных значений  $K_1$  следует, что в сильных пшеницах преобладают белки труднорастворимые, а в слабых -

VO12248



более растворимые. В отношении содержания белка, имеющего среднюю растворимость, наблюдается обратная зависимость: с увеличением "силы" пшеницы величина  $K_2$  уменьшается.

Если учесть, что труднорастворимая фракция представлена высокомолекулярными белками, то в сильных пшеницах их содержание выше, чем в слабых.

## 2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БЕЛКОВ ПШЕНИЦ, ПОВРЕЖДЕННЫХ КЛОПОМ-ЧЕРЕПАШКОЙ

Оценка конформационных изменений структуры белков пшениц, пораженных клопом-черепашкой, на основании определения системы  $SX$  - групп и  $S-S$  - связей важна в связи с тем значением в свойствах клейковины, которое принято им отводить.

Таблица 5.

### СОДЕРЖАНИЕ $SX$ -ГРУПП И $S-S$ -СВЯЗЕЙ В КЛЕЙКОВИНЕ ПШЕНИЦ, ПОВРЕЖДЕННЫХ КЛОПОМ-ЧЕРЕПАШКОЙ

| Количество пораженных зерен, % | Показание ПЭК-ЗА увл.ед. | Количество     |               | Отношение $S-S/SX$ |
|--------------------------------|--------------------------|----------------|---------------|--------------------|
|                                |                          | $SX$ -групп    | $S-S$ -связей |                    |
|                                |                          | мг-экв/г белка |               |                    |

#### Одесская 16

|    |           |      |       |      |
|----|-----------|------|-------|------|
| 0  | 95        | 3,43 | 63,07 | 18,9 |
| 3  | 110       | 3,54 | 70,20 | 19,8 |
| 5  | 115       | 3,50 | 75,90 | 21,7 |
| 7  | более 120 | 3,71 | 79,70 | 21,5 |
| 10 | -         | 3,69 | 79,60 | 21,6 |



| Количество пораженных зерен, % | Показание ПЭК-ЗА усл.ед. | Количество        |                    | Отношение $S\bar{S}/S\bar{H}$ |
|--------------------------------|--------------------------|-------------------|--------------------|-------------------------------|
|                                |                          | $S\bar{S}$ -групп | $S\bar{S}$ -связей |                               |
|                                |                          | мг-экв/г белка    |                    |                               |

## Безостая I

|    |     |      |       |      |
|----|-----|------|-------|------|
| 0  | 97  | 3,68 | 97,90 | 26,6 |
| 3  | 100 | 3,72 | 91,50 | 24,6 |
| 5  | 110 | 3,75 | 81,65 | 21,8 |
| 7  | 115 | 3,58 | 82,70 | 23,1 |
| 10 | 117 | 3,36 | 84,94 | 25,3 |

Из данных табл.5 видно, что по количеству дисульфидных связей в белках пшениц, пораженных вредной черепашкой, нельзя судить об упругих свойствах клейковины. Например, у пшеницы Од-16 снижение упругих свойств клейковины сопровождается повышением количества  $S\bar{S}$  - связей, а у Безостой I, наоборот, - сопровождается уменьшением количества  $S\bar{S}$  - связей. Однако, вне зависимости от прироста /Од-16/ или понижения /Безостая I/ количества дисульфидных связей, с увеличением пораженности пшеницы клопом-черепашкой, наблюдается тенденция снижения их реактивности. Так, с увеличением пораженности пшеницы Од-16 от 0 до 3 % прирост дисульфидных связей составляет 7,13 мг/экв/г белка, а при увеличении пораженности от 7 до 10 %, прирост - отрицательная величина порядка 0,1 мг-экв/г белка.



Дезагрегация клейковинных белков сопровождается изменением растворимости белка и перераспределением фракций. Так, в табл.6 приведены данные, из которых видно, что распад щелочерастворимых белков /пораженность зерна 3 %/ сопровождается увеличением водо-, соле- и спирторастворимых белков.

Таблица 6

АЗОТИСТЫЕ ВЕЩЕСТВА ЗДОРОВОГО И ПОВРЕЖДЕННОГО ЗЕРНА  
ПШЕНИЦЫ ОД-16 (в % от суммы извлеченного азота)

| Количество<br>пораженных<br>зерен, % | И з в л е ч е н и е |       |         |         |
|--------------------------------------|---------------------|-------|---------|---------|
|                                      | водой               | солью | спиртом | щелочью |
| 0                                    | 18,76               | 12,40 | 33,65   | 35,19   |
| 3                                    | 21,65               | 13,04 | 34,25   | 31,06   |
| 10                                   | 37,55               | 14,30 | 23,47   | 24,68   |
| 10                                   | -                   | 38,28 | 36,19   | 25,53   |

При увеличении содержания пораженных зерен до 10 % распад щелочерастворимых белков значительно возрос. Этот рост сопровождался значительным увеличением количества водорастворимых белков и уменьшением спирторастворимых. Параллельное фракционирование с исключением извлечения белков водой показало, что снижение содержания спирторастворимых белков - результат



растворимости глиаина в дистиллированной воде вследствие приобретения им меньшей связанности.

Таким образом, для пораженного зерна характерно увеличение растворимых и спирторастворимых белков в результате распада высокомолекулярного глютеина.

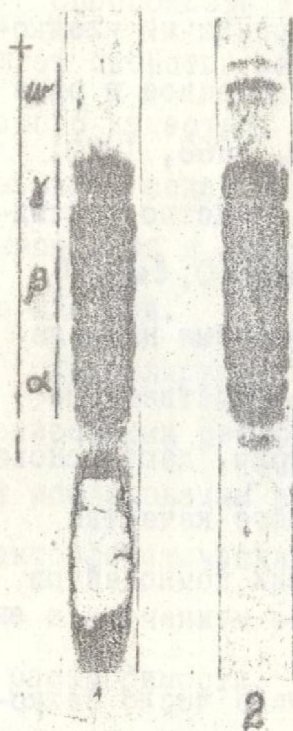


Рис. I. Электрофореграммы спирторастворимых белков участков зерна пшеницы: 1 - пораженных клопом-черепашкой, 2 - непораженных.

Электрофоретические исследования в полиакриламидном геле дают более четкую картину фракционных изменений в белках. Глиадин, выделенный из поврежденных участков пшеницы, пораженной клопом-черепашкой, отличается от глиаина нормального зерна отсутствием в электрофоретическом спектре

наиболее высокомолекулярных компонентов глиаина

$w$  - глиаина/. Наряду с этим, как видно из рис. I  $\alpha$ ,  $\beta$ - и  $\gamma$  - электрофоретические компоненты глиаина, выделенного из поврежденных участков зерна, не отличаются от здорового зерна, что свидетельствует о высокой устойчивости низкомолекулярных фракций клейковинных белков по



отношению к воздействию ферментов клопа-черепашки.

# ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ. НЕКОТОРЫЕ ГИПОТЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЯХ КЛЕЙКОВИНЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ЕЕ КАЧЕСТВО

Отсутствие заметных аминокислотных различий клейковинных белков разных по "силе" пшениц, отмеченное в ряде работ /Стрельникова с сотр., 1964, Вакар, 1968, 1972, Созинов, Попереля, 1969 и др./, большое сходство пептидных карт названных белков *Rohrlich, Schulz* 1960, *Ewart*,

1966/ и аналогичные результаты, полученные нами на фракциях клейковинных белков с крайними свойствами по растворимости в растворах салицилата натрия, дают основание считать, что клейковинные белки разного качества построены из одинаковых или весьма близких компонентов /Вакар, с сотр., 1972/.

Однако, следует учитывать, что большое число белковых фракций с близким аминокислотным составом вследствие определенных количественных сочетаний, может служить причиной тех отличий, которые с увеличением уровня молекулярной структуры проявляются как существенные. Так, на уровне вторичной структуры белка выявлено отсутствие

$\alpha$  - спиральных участков в глиздине пшениц сортов Акмолинка I и Восход. Кроме того, в глиздине пшеницы Восход расчет показывает наличие  $\beta$  - структур.



В глиадине сильных сортов Саратовская 29 и Безостая I содержание упорядоченных участков в два раза выше, чем в глютенине. Меньшую упорядоченность вторичной структуры глютенина можем объяснить взаимным влиянием его первичной и четвертичной структур.

Способность амидов изменять заряд белка еще не определяет свойства растворимости клейковинных белков пшениц разного качества. Здесь большее влияние на растворимость оказывает содержание высокомолекулярных компонентов. Таким компонентом в белках сильных пшениц больше по сравнению со слабыми.

Превалирующая роль высокомолекулярного глютенина в формировании реологических свойств клейковины проявляется при исследовании зерна, пораженного клопом-черепашкой. Электрофоретическим исследованием белков в полиакриламидном геле и изучением распределения белков пораженного зерна по растворимости, установлена высокая устойчивость глиадинов по отношению к воздействию ферментов клопа-черепашки. При этом снижение упругих свойств клейковины сопровождалось распадом глютенина, уменьшением его молекулярного веса.

Определенный для каждого сорта пшениц генетически обусловленный спектр глиадина остается неизменным и для зерна, полностью пораженного клопом-черепашкой. Резкие колебания качества белков зерна одного сорта, выращенного в разных условиях, дают основание считать, что влияние фракционного состава белков на качество зерна косвенно,



Неблагоприятные погодные условия, заболевания, поражение вредителями и другие воздействия среды сказываются на ферментативных процессах в растительном организме и синтезе высокомолекулярных белков /Благовещенский, 1966/.

Напряженность ферментативных процессов, связанных взаимопревращениями аскорбиновой кислоты и ее дегидроформы, в сильных пшеницах может быть источником дополнительной энергии для синтеза более высокомолекулярных веществ. (Стрельникова, 1964, 1971).

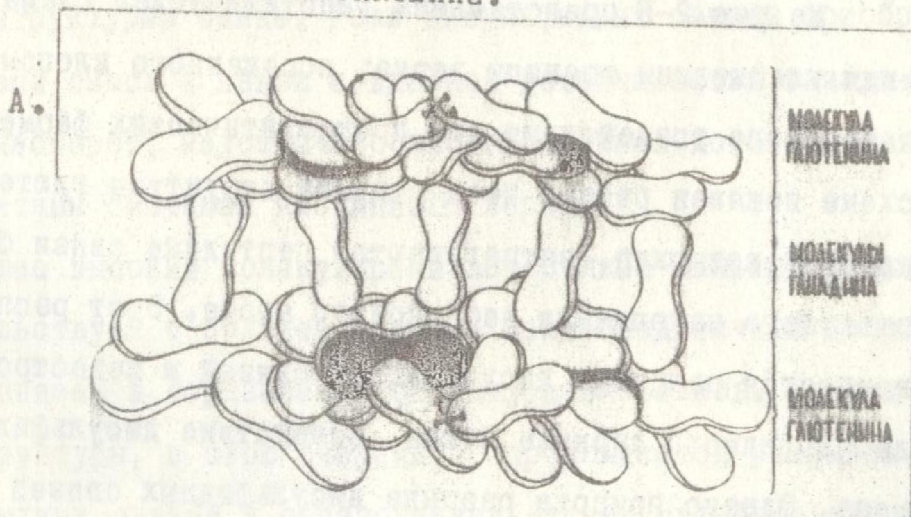
Считаем, что в реологических свойствах клейковины особая роль принадлежит глютенину. Без глютеина, как и без глиадина, нет клейковины. Однако следует попытаться конкретизировать роль каждого вида перечисленных белков в проявляемых свойствах клейковины. Предполагаем на основе взаимной комплементарности поверхностей молекул глиадина и глютеина, в результате молекулярной дисперсности последнего возникновение различий в межмолекулярном взаимодействии клейковинных белков. При таком взаимодействии молекулы глиадина выполняют роль связывающего звена.

На рис.2-4 представлена гипотетическая схема строения клейковины. На схеме изображены две молекулы глютеина, связанные между собой ориентированными молекулами глиадина. При изображении четвертичной структуры глютеина нами учтено, что глютеин не является самостоятельным индивидуальным белком, и представляет собой высокомолекулярное образование глиадина и растворимых белков.



Если предполагаемое нами строение клейковины имеет смысл, то, например, две молекулы глютенина могут быть связаны между собой молекулами глиадина. Звеньев глиадина будет тем больше, чем большей величины связываемые молекулы глютенина. Очевидно, в присутствии самых мелких молекул глютенина такой комплекс состоит из одной молекулы глиадина и двух молекул глютенина.

Таким образом, суть качества клейковины, по нашим представлениям, при примерно равном весовом соотношении белков глиадин-глютенин определяется величиной молекулярного отношения глиадин: глютенин. Чем больше содержится молекул глютенина высокого молекулярного веса в клейковине, тем больше глиадиновых звеньев будет участвовать в их взаимодействии и тем, следовательно, более упругими свойствами будет отличаться клейковина.





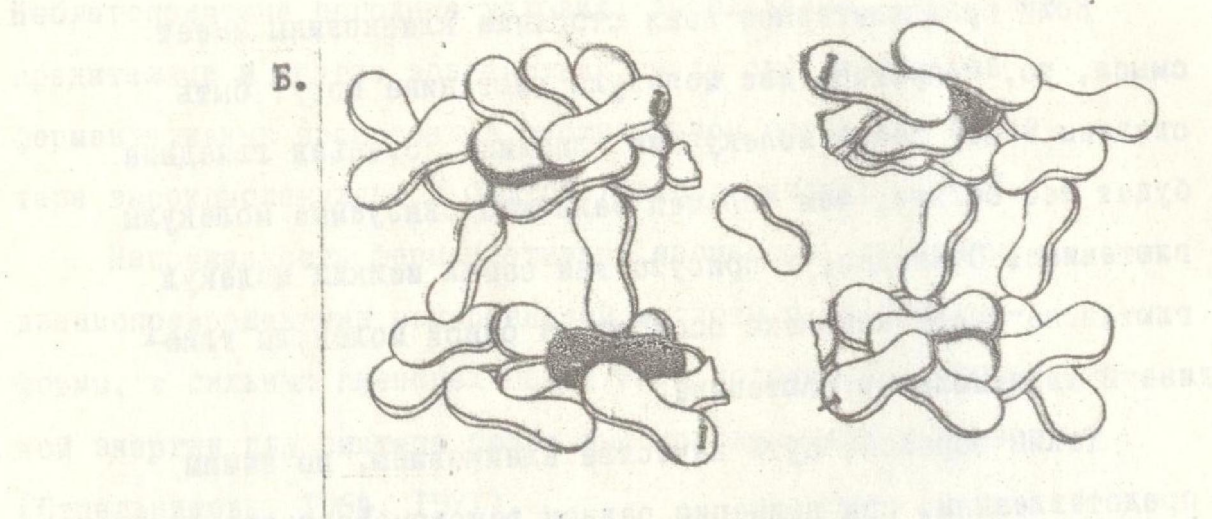


Рис.2. Гипотетическая схема строения  
клейковины пшеницы:

А - нормального зерна, Б - зерна, пораженного  
клопом-черепашкой, после воздействия  
протеолитических ферментов.

На рис.2-Б представлена гипотетическая схема строения клейковины пшеницы зерна, пораженного клопом-черепашкой, после воздействия его протеолитических ферментов. На схеме показан распад четвертичной структуры глютеина, при котором, возможно, затрагиваются пептидные связи без существенного накопления небелкового азота. Этот распад сопровождается разрывом дисульфидных связей и перестройкой дисульфидного каркаса белка, вследствие дисульфидного обмена. Однако природа разрыва дисульфидных связей еще не ясна.



Вредность воздействия поражения клопа-черепашки на пшеницу состоит в том, что белки вредителя разрушают главным образом молекулы глютенина, что выражается в дезагрегации клейковины. Вместе с тем, возможно, распад глютенина сопровождается увеличением общей поверхности белковых молекул, повышает их гидрофильность, а уменьшение молекулярного веса глютенина — снижает межмолекулярное взаимодействие в белке и повышает его растворимость.

Подобное строение клейковинного белка объясняет роль всех существующих межмолекулярных связей /водородные, дисульфидные, гидрофобные и др./ в изменчивости свойств клейковины.

Касаясь вопроса межмолекулярных и внутримолекулярных связей в клейковине, особенно таких, как дисульфидные, следует учитывать их принадлежность к третичной и четвертичной структурам белка. Роль дисульфидных связей приобретает новый смысл в связи с высокой устойчивостью глиадинов, и наоборот, неустойчивостью глютенинов по отношению к ферментным системам клопинного зерна.

Более высокий молекулярный вес белков сильных пшениц свидетельствует о большем участии межсубъединичных дисульфидных связей в образовании структуры их белков. Распад этой структуры, в свою очередь, сопровождается разрывом дисульфидных связей и образованием из них сульфгидрильных групп, которые вследствие дисульфидного обмена образуют новые, вероятно, менее реакционноспособные внутрисубъединичные дисульфидные связи. Поэтому, как показывают наши



исследования, с увеличением пораженности пшеницы и ослаблением клейковины количество дисульфидных связей снижается. Наряду с этим на основании изучения дисульфидных и водородных связей делается вывод, что физические свойства клейковины определяются третичной и четвертичной структурой белка, количеством и прочностью внутри- и межмолекулярных связей /Вакар, 1964, 1965; 1968/.

На основании физико-химических и биохимических исследований установлено, что вредоносность поврежденного зерна клопом-черепашкой является результатом наличия в пораженном зерне остатков активных ферментов. Ферментная активность пораженного зерна зависит от трех факторов: количества пораженных зерен, степени поражения и сортовых особенностей белков пшеницы, т.е. большей или меньшей их атакуемостью протеолитическими ферментами клопа. Сортвые особенности пшеничных белков сохраняются даже для зерна со 100 процентной пораженностью. Общая ферментная активность зерна может свидетельствовать о пораженности зерна, однако истинная величина поражения замаскирована сортовыми особенностями клейковинных белков. Вредоносность воздействия белковых веществ вредителя выражается распадом главным образом глютенина и как следствие этого распада - дезагрегацией клейковины.

Использование в качестве критерия пораженности зерна физико-химических свойств клейковинного белка либо его ферментативной активности связано самым тесным образом



о сортовых особенностях белков зерна и со значительными затратами времени на инкубирование веществ муки перед их анализом.

Паталогические процессы, обнаруженные в поврежденном черепашкой зерне — результат экстраинтестинальной переработки пищи насекомым. Об интенсивности этих процессов можно косвенно судить по тем результатам, которые характеризуют анатомию поврежденной зерновки. Просмотр пшеничного зерна в ИК-лучах позволяет легко и быстро выявить процент поврежденных зерен с дифференциацией их по степени повреждения /величине поврежденной части зерновки/. Нами разработан и изготовлен экспериментальный образец прибора, в основу работы которого положен принцип инфракрасной диагностики зерна. Предлагаемый прибор может найти широкое применение в системе Министерства сельского хозяйства и заготовок.

### В Ы В О Д Ы:

1. Разработан метод фракционирования и выделения высокоочищенных препаратов белковых элементов клейковины, пригодных для их исследования оптическими методами.
2. В формировании качества клейковины важная роль принадлежит труднорастворимым белкам.
3. Степень амидирования клейковинных белков /глютина и глютелина/ не является постоянной. Она не определяет растворимости клейковинных белков и качества клейковины.



4. Большое сходство пептидных карт глиаина и глютенина, выделенных из пшениц разного качества, свидетельствует о наличии в белках участков с близкой первичной структурой.

5. Спектрополяриметрический анализ белков сильных пшениц показал, что глиаин этих белков имеет в два раза больше спиральных участков по сравнению с глютенином. В глиаине слабой пшеницы обнаружено отсутствие  $\alpha$ -спиралей и наличие  $\beta$ -структур.

6. Разработан метод инфракрасной дефектоскопии зерна, поврежденного клопом-черепашкой, и создан соответствующий прибор - ИК-дефектоскоп. Прибор и метод рекомендован для экспрессной диагностики поврежденности пшеницы клопом-черепашкой.

7. Глиаин, выделенный из зерна, пораженного клопом-черепашкой, не отличается от глиаина нормального зерна по  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -электрофоретическим компонентам. В то же время наблюдается распад  $\omega$ -компонентов и появление высокоподвижной фракции впереди  $\alpha$ -глиаинов.

8. Снижение упругих свойств клейковины пшениц, пораженных клопом-черепашкой, сопровождается распадом глютенина, снижением его молекулярного веса.

9. Снижение упругих свойств клейковины с увеличением поврежденности пшеницы не всегда сопровождается снижением количества дисульфидных связей, однако при этом сохраняется тенденция уменьшения их реактивности.



10. Общая ферментативная активность зерна, поврежденного клопом-черепашкой, зависит не только от процента повреждения зерен, но и от сортовых особенностей пшеницы /атакуемости составляющих субстратов/.

11. Физические свойства клейковинных белков определяются величиной молекул глютенина. Крепкая клейковина отличается от слабой большей величиной молекулярного отношения белков глиадин: глютенин.

12. Предложена схема структурных изменений клейковины при ее дезагрегации в зерне, поврежденном клопом-черепашкой.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. О растворимости белков "сильных" и "слабых" пшениц (в соавторстве В.А.Яковенко, Г.А.Ставицкая). Пищевая технология № 5, 1971.

2. Сравнительная характеристика белковых веществ "сильных" и "слабых" пшениц методами пептидных карт и дисперсии оптического вращения (в соавторстве В.А.Яковенко, Г.Ю.Ажицкий). Прикладная биохимия и микробиология № 6, 1971.

3. Электрофоретическая характеристика белков пшеницы, пораженной клопом-черепашкой (в соавторстве В.А.Яковенко, И.П.Гаврилюк). Пищевая технология № 3, 1973.



4. Особенности клейковинного белка пшеницы, пораженной клопом-черепашкой (в соавторстве В.А.Яковенко, А.А.Стойнова)  
Пищевая технология № 4, 1973.

МАТЕРИАЛЫ ДИССЕРТАЦИИ ДОЛОЖЕНЫ на:

1. XXXII научной конференции ОТИП им.М.В.Ломоносова, 1971.
2. Заседании Одесского отделения Всесоюзного биохимического общества, 1971.
3. XXXIII научной конференции ОТИП им.М.В.Ломоносова, 1972.
4. Всесоюзном симпозиуме "Растительные белки и их биосинтез". Москва, январь, 1973.

БР II483 02.II.73 г.Формат 60 x 84 I/I6.

Объем 2 п.л.Заказ 2645 Тираж 180

Городская типография управления по делам издательств, полиграфии и книжной торговли Одесского облисполкома.

г.Одесса, Ленина, 49