

УДК 575.113.2:577.112.82

СУЧАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКОСТІ ЗЕРНА ПШЕНИЦІ У СВІТІ: БІОСИНТЕЗ ТА НАКОПИЧЕННЯ ЗАПАСНИХ БІЛКІВ, СТРУКТУРА, АГРЕГАЦІЯ І РЕОЛОГІЯ У ЗВ'ЯЗКУ З ТЕХНОЛОГІЄЮ ЗЕРНОПРОДУКТІВ

О.І. РИБАЛКА¹, Б.В. МОРГУН², В.М. ПОЧИНОК³

¹Селекційно-генетичний інститут — Національний центр насіннезнавства та сортовивчення Національної академії аграрних наук України
65036 Одеса, Овідіопольська дорога, 3

²Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України

03143 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

³Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

Подано огляд результатів сучасних аналітичних і технологічних досліджень запасних білків зерна пшениці, виконаних у провідних лабораторіях світу. Висвітлено питання, пов'язані з механізмами біосинтезу запасних білків зерна, їх накопиченням у процесі розвитку й дозрівання зернівки, взаємодії білків та інших інгредієнтів зерна. Продемонстровано ефективність використання біотехнологічних методів у керуванні процесами біосинтезу білків зерна, поліпшення їх харчової цінності.

Ключові слова: білки клейковини, гліadini, глютеніни, антитіла, молекулярні маркери, реологія, глютенін-макрополімер, дисульфідні зв'язки.

Біосинтез запасних білків та інших компонентів зерна пшениці, їх накопичення, перерозподіл і локалізація у тканинах зернівки безпосередньо впливають на якість кінцевих зернопродуктів. Ця тема активно досліджується у провідних лабораторіях світу з використанням різних методичних прийомів. Основним завданням цих досліджень є спостереження за процесами синтезу окремих білків, транспортом певних поліпептидів, їх агрегацією й акумуляцією у тканинах зернівки.

Однак дослідження механізмів біосинтезу, шляхів метаболізму і транспорту гетерогенної маси білків зерна, які до того ж дуже подібні за первинною структурою (послідовність амінокислотних залишків), були істотно обмеженими перш за все через складнощі створення моноспецифічних антитіл до окремих білків і поліпептидів.

Однією з найуспішніших дослідницьких груп щодо створення моноклональних (mAb) антитіл до білків і полісахаридів зерна є лабораторія INRA з міста Нант (Франція). Співробітники цієї лабораторії створили і схарактеризували цілу колекцію як моно-, так і поліклональних антитіл до білків зерна гліадинів, глютенінів, головних полісахаридів стінок клітин ендосперму пшениці арабіно- й глюкуронооксиланів. У роботі для імунізації вони використовували високоочищені індивідуальні білки, їх фрагменти (поліпептиди), штучні поліпептиди [21].

Антитіла зв'язуються з певними доменами білків чи вуглеводів із короткими послідовностями (5–10 нмоль), які називають епітопами (epitope). Епітопи клейковинних білків налічують близько 5–7 амінокислотних залишків, характер зв'язку епітоп-антитіло великою мірою залежить від конформації епітопів протеїнів.

Проблема отримання моноклональних антитіл має очевидні перспективи успішного її вирішення після створення спеціальних ліній трансгенної пшениці з генами, що контролюють біосинтез білків зерна зі специфічними унікальними С-термінальними послідовностями (epitope tagged) амінокислотних залишків, за якими можна легко спостерігати у тканинах зернівки, що розвивається, за допомогою серії нових комерційних препаратів високоспецифічних антитіл проти унікальних С-термінальних сайтів [20]. Ці дослідження виконані спільно колективом учених з Великої Британії (Ротамстед) та Японії (Аграрний дослідний центр Хоккайдо, Аграрний університет Токіо).

Для дослідів було створено 10 генних конструкцій, що кодують певні білки клейковини — γ -гліадини, високомолекулярну субодиницю глютеніну 1Ах1, субодиниці В-типу низькомолекулярних глютенінів з унікальною С-термінальною послідовністю й промотором генів, що кодують високо- та низькомолекулярні глютеніни [18]. Генні конструкції трансформували у сорт хлібопекарської пшениці Cadenza бомбардуванням часточками (particle bombardment) із плазмідним вектором та 35S термінальною послідовністю.

Марковані С-термінальною послідовністю клейковинні білки специфічно зв'язують антитіла й відповідні їм флуорохромні барвники, тому можуть бути таким чином ідентифіковані та за допомогою імунної мікроскопії візуалізовані в тканинах зернівки, де вони локалізуються у процесі її формування й розвитку.

Розроблена авторами унікальна процедура імуномаркування окремих білків клейковини є дієвим інструментом для здійснення масштабних експериментів з метою спостереження за еволюцією трьох типів індивідуальних білків клейковини — їх синтезом, розподілом й локалізацією в окремих клітинах і тканинах зернівки, що розвивається.

У ході синтезу запасних білків у зернівці вони піддаються низці послідовних структурних модифікацій. Це явище називають «дозріванням» білка, або процесингом. Для його дослідження розроблено високотехнологічний процес із застосуванням унікальних складних лабораторних процедур. Розглянемо детальніше таке дослідження, виконане італійськими вченими з Університету Tuscia (Вітербо, Італія) на прикладі субодиниць низькомолекулярних глютенінів (LMW-GS).

Низькомолекулярні глютеніни вкрай важливі у детермінації хлібопекарської якості зерна. За ознакою електрофоретичної мобільності їх поділяють на три групи: В, С і D [6], а залежно від того, з якого амінокислотного залишку починається N-термінальний сегмент «дозрілого» поліпептиду — LMW-s (серин), LMW-m (метіонін), LMW-I (ізолейцин) — на підгрупи. Вміст глютенінів LMW-s і LMW-m у зернівці найвищий. Ці два класи сполук дуже подібні за первинною структурою і різняться лише за наявністю трьох додаткових N-термінальних амінокислот у глютенінів типу LMW-m. Така незначна відмінність у первинній структурі молекул LMW-GS глютенінів істотно ускладнює дослідження «дозрівання» цих білків у ході їх синтезу.

Порівнянням послідовності нуклеотидів ДНК генів, що кодують LMW-s та LMW-m субодиниці, з послідовністю амінокислотних залишків у їх молекулах виявлено, що процеси «дозрівання» згаданих білків значно відрізняються. Так, субодиниці LMW-s у позиції 23 від N-кінця молекули містять амінокислоту аспарагін, а субодиниці LMW-m — амінокислоту треонін. Це означає, що на відміну від LMW-m у ході процесингу субодиниць LMW-s фермент аспарагініллендопротеза може «відрізати» від молекул цих білків пептиди, різні за структурою та розміром. Для детального дослідження процесингу субодиниць LMW-s і LMW-m група італійських учених трансформувала гени цих субодиниць із використанням мутантної за послідовністю генетичної конструкції. В результаті аспарагін у 23-й позиції молекули було замінено на треонін і LMW-s та LMW-m за N-термінальною послідовністю стали ідентичними. Однак, щоб дискримінувати LMW-s і LMW-m під час дослідження процесингу, C-термінальну послідовність цих молекул модифікували балістичним трансформуванням різними за структурою пептидами. Так група італійських учених створила витончений модельний об'єкт для детального дослідження процесингу низькомолекулярних глютенінів пшениці [6].

У ході формування й наливання зерна в ньому синтезуються та акумулюються білки, розчинні у воді, кислих, сольових, лужних і буферних розчинах, етанолі. Однак певна частина білків зерна залишається нерозчинною навіть у таких сильних екстрагувальних розчинах, як оцтова кислота, SDS-фосфатний буфер. Частка цих нерозчинних білків доволі сильно позитивно впливає на технологічні властивості борошна. Отже, важливо знати, як саме формується і накопичується фракція нерозчинних білків у ході наливання зерна. В цьому контексті особливо важливою є функція глутатіону, який бере безпосередню участь у процесах полімеризації білків унаслідок утворення міжмолекулярних дисульфідних S—S-ковалентних зв'язків.

Глутатіон C-глутамілцистенінгліцин виявлено у багатьох рослин в основному як небілковий тіол. Він міститься у пшеничному борошні як у вільній формі, так і у формі глутатіонпротеїнових дисульфідних сумішей. Найвища його концентрація — у високополімерних фракціях білків зерна — глютенінах.

У процесі наливання зерна субодиниці глютенінів, особливо низькомолекулярних, які містять значну кількість вільних сульфгідрильних SH-груп, окиснюються з початком дегідратації зерна. Ця фаза в часі збігається з процесом формування нерозчинної фракції білків зерна. Однак упродовж цієї важливої фази розвитку зернівки, яка настає приблизно на 33-тю добу після колосіння, активність ферменту глутатіонредуктази знижується, а співвідношення $-S-S- : -SH$ і частка глутатіонпротеїнових комплексів — збільшуються. Близько 85 % цих комплексів представлено асоціаціями високополімерних білків із глутатіоном.

Формування комплексів білок-глутатіон досліджували французькі вчені на складному сучасному лазерному сканері в полі з асиметричним потоком фракціонувальним мультикутовим опромінювачем (AFFFF-MAALS — asymmetrical flow field flow fractionation-multi-angle laser light scattering) [1]. Вони встановили, що нерозчинні комплекси клейковинних білків формуються саме на початку зневоднювання зернівки, і глутатіон відіграє критичну роль у контролі ступеня полімеризації нерозчинних клейковинних білків, які істотно впливають на технологічні й хлібопекарські властивості зерна і борошна пшениці. Розчинність фрак-

ції глютенінів зерна великою мірою залежить від співвідношення високо- і низькомолекулярних глютенінів.

Клейковинні білки у процесі розвитку зернівки пшениці синтезуються за участю гліадин- та глютенінкодувальних локусів під контролем фактора транскрипції *Spa* (storage protein activator — активатор запасних білків), який вважають таким, що впливає на вміст і склад білків зернівки, й отже, на технологічні властивості борошна. Цей активатор є ключовим геном-активатором синтезу запасних білків зерна пшениці, який відповідно до геномного складу культури представлений трьома гомеологічними копіями геномів А, В і D.

Група французьких учених із Національного інституту агрономічних досліджень (INRA) дослідила поліморфізм *Spa* гомеологічних копій за послідовністю нуклеотидів у зв'язку з внеском цих генів в ознаку якості зерна: вміст у ньому білка, загальний вміст азоту в зернівці, твердість зерна, в'язкоеластичні параметри, такі як «сила» борошна, пружність та еластичність тіста, серед 372 сортів і ліній світової колекції пшениці [17].

У результаті встановлено високий рівень поліморфізму послідовностей ДНК усіх трьох копій фактора *Spa*, особливо в регіоні промотора. Трансляція кодувальних послідовностей показала високий рівень відповідності (>93 %) між білками кожного з трьох гомеологів і гаплотипів. Визначено поліморфізм двох основних гаплотипів для кожної копії *Spa*. Здійснено також генотипування одного маркера на ген *Spa* у загальній колекції досліджених сортів пшениці. А та D гомеологи були значною мірою асоційовані з показниками в'язкоеластичності тіста і твердості зернівки. За винятком гомеолога А установлені асоціації пояснюють відмінність за ознакою твердості зерна. Не виявлено залежності між *Spa* маркерами та масою сухої зернівки і вмістом у ній білка. Копія *Spa* геному А асоційована з показниками в'язкоеластичності тіста і може істотно впливати на якість кінцевого продукту внаслідок модифікації складу запасних білків та їх просторової конформації.

Стійкість тіста до замісу є важливою складовою технологічної якості пшениці. Цікаві дослідження з вивчення впливу температури навколишнього середовища на стійкість тіста до замісу виконані групою вчених із різних дослідних центрів Норвегії. Серією дослідів встановлено, що низька температура (12 °С) в період 4—12 діб після виколошування спричинювала зниження резистентності тіста до замісу, а висока (>23 °С) в період 1—33 діб після виколошування — сприяла істотному поліпшенню цього показника [16].

Сучасні лабораторні аналітичні процедури у сфері протеоміки, наприклад такі, як двовимірний (2D) електрофорез білків та мас-спектрометрія (MS), настільки досконалі, що дають змогу ідентифікувати практично будь-яку молекулу білка чи ферменту в складній гетерогенній суміші білків, які синтезуються у певних тканинах зернівки пшениці.

Такі високоефективні методи використали американські вчені із Західного регіонального науково-дослідного центру Департаменту сільського господарства США (Албані, Каліфорнія) для дослідження складу білків зерна пшениці залежно від умов мінерального живлення в період після виколошування [5]. Цей період, як відомо, є особливо важливим для формування ознак якості зерна. Вивчено вплив мінеральних добрив (NPK), внесених після виколошування (сорт пшениці Butte 86), на кількісні зміни індивідуальних білків зерна (табл. 1). Методом 2D-електрофорезу екстракт загальних білків зерна було поділено на 369 ок-

СОВРЕМЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КАЧЕСТВА ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ

ТАБЛИЦЯ 1. Зміна кількості окремих індивідуальних білків у зерні пшениці під впливом NPK в період після виколювання [5]

Тип білка	Без NPK	За дії NPK після виколювання	Зміна кількості, %
	% загального вмісту білка в борошні		
Глютеніни			
HMW-GS	12,2	16,5	35,2
LMW-GS	16,7	13,0	-22,4
Гліадини та гліадиноподібні білки			
альфа-гліадини	13,7	17,1	24,6
гамма-гліадини	8,9	7,8	-13,3
омега-гліадини	3,9	9,3	140,3
змішані гліадини	9,5	10,7	12,4
Інші запасні білки			
авеніноподібні	0,9	0,5	-47,5
глобуліни	0,6	0,4	-33,1
серпіни	1,1	1,5	38,8
трितिцини	1,6	1,7	8,1
Ферменти та інгібітори			
альфа-амілаза, альфа-амілаза/трипсин інгібітори	9,4	4,1	-57,0
бета-амілаза	1,1	1,6	41,6
інші ферменти	1,8	1,3	-28,4
Неідентифіковані пептиди			
а	4,9	4,4	-11,3
б	4,3	2,3	-44,2
Загалом	90,6	92,3	0,52

ремим індивідуальних білків, з яких 188 (від 88 до 90 % загального вмісту білка в зерні) було ідентифіковано методом мас-спектрометрії з використанням сучасного мас-спектрометра QSTAR Pulsar (квадрупольний час-прольотний мас-спектрометр із джерелом наноелектропотуку). У цих досліджах гліадинові й глютенінові поліпептиди ідентифікували за допомогою гідролізу протеазами та поліпшеної процедури секвенування пептидів. Особливу увагу приділяли кількісним змінам поліпептидів, бідних і багатих на сірку. Останні, як відомо, відіграють особливу роль у формуванні якості клейковини, оскільки містять амінокислотний залишок цистеїн (SH-група).

Виявлено, що в борошні з підвищеним вмістом білка вміст багатих на сірку поліпептидів зменшувався, а вміст бідних — збільшувався. Істотні зміни спостерігали у складі глютенінів. Із підвищенням вмісту білка в зерні частка високомолекулярних глютенінів (HMW-GS) зростала, а низькомолекулярних (LMW-GS) — зменшувалась за їх співвідношенням від 1,4 до 0,8. Частка альфа-гліадинів збільшувалась від 14 до 17 %, омега-гліадинів — від 4 до 9 %, гамма-гліадинів — зменшувалась від 9 до 8 %. Вміст інгібіторів альфа-амілаз і протеаз знижувався від 9 до 4 %, бета-

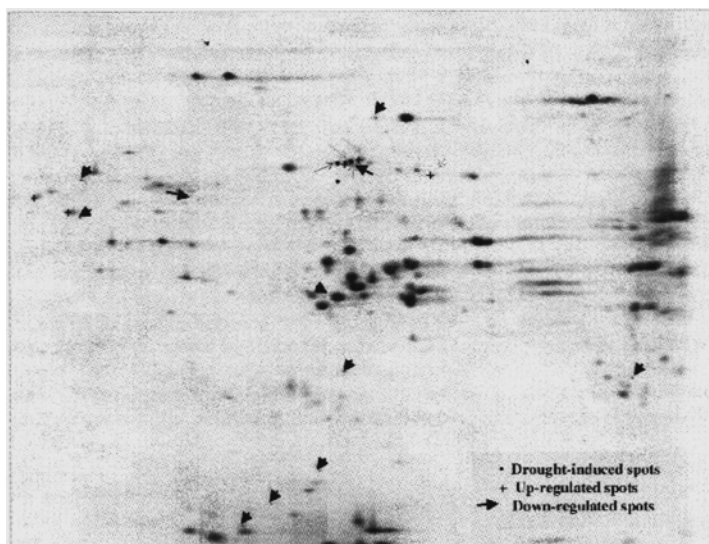


Рис. 1. Электрофореграма 2D-электрофорезу білків зерна пшениці. Стрілками позначено білки, індуковані водним стресом [15]

амілаз — підвищувався від 1,1 до 1,6 %. Кількість інших ферментів у зерні зменшувалась від 1,8 до 1,3 %. Вміст серпінів зростав від 1,1 до 1,5 %, тритицинів — залишався на рівні 1,6—1,7 %.

Аналогічні лабораторні дослідження застосували вчені з INRA (Франція) для вивчення реакції різних за толерантністю до посухи сортів пшениці в умовах штучного водного стресу [15]. Методом 2D-электрофорезу білки зерна двох сортів пшениці було розділено на 450 окремих індивідуальних пептидів. У результаті виявлено як кількісні, так і якісні зміни у 2D протеїновій карті двох різних за посухостійкістю сортів пшениці, індуковані водним стресом. Ідентифіковано конкретні індивідуальні протеїни, поява яких індукована саме зневодненням тканин зерна (рис. 1). У результаті водного стресу констатовано істотні кількісні зміни білків зерна, що належать до класу глютенінів, а також деяких ферментів.

Такі комбіновані дослідження білків зерна з використанням надсучасних лабораторних технологій зі сфери протеоміки уможливають вивчення найдрібніших деталей фундаментальних процесів синтезу й накопичення запасних білків у процесі розвитку зерна пшениці.

Клейковинні білки пшениці — унікальні за своєю природою. Одними з найважливіших їх особливостей є біохімічна гетерогенність (>500 індивідуальних білків), екстремальні склад амінокислот (глутамін + пролін > 50 моль %), та їх послідовність включно з численними повторами, складні міжмолекулярна і внутрішньомолекулярна взаємодії (ковалентні й нековалентні зв'язки), широкий розподіл за молекулярною масою (~ 300 000 — 100 000 000), висока водовбирна здатність (більш як удвічі від їх маси у клейковині), здатність формувати когезивну, в'язкоеластичну масу (гідратована клейковина) після добавляння води, утворювати плівчasto-фібрилярну структуру альвеол тіста й утримувати вуглекислий газ, а також їх роль преципітувального фактора як причини хвороби целиакії у чутливих до клейковини людей [24].

Кількість і якість клейковини істотно впливають на хлібопекарські якості борошна. І якщо кількість сирової клейковини можна прогнозувати

за вмістом білка або визначати прямими стандартними методами, то якість клейковини встановити незрівнянно складніше, оскільки вона залежить від різних чинників і параметрів: наявності (відсутності) певних білків (субодиниць), їх комбінації, кількості та співвідношення, складної взаємодії між ними тощо. Однак слід зазначити, що навіть знання кількості, якості та функціональності клейковинних білків замало для повного розуміння хлібопекарських властивостей борошна. Адже такі складники зерна, як крохмаль, арабіноксилани, ферменти, полярні ліпіди відіграють не менш важливу роль у визначенні хлібопекарської якості пшеничного борошна.

Сучасні дослідження властивостей пшеничного борошна і тіста поволі прогресують, поглиблюючи наше розуміння фундаментальних процесів і явищ, що лежать в основі формування й функціонування унікальної субстанції — пшеничного тіста.

Одним із найважливіших параметрів пшеничної клейковини є кількісні співвідношення різних типів білків у зерні. Вони не сталі, змінюються залежно від сорту пшениці, року, технології вирощування, істотно впливають на показники хлібопекарської якості борошна.

Згідно з даними табл. 2, кількісні співвідношення різних типів білків зерна доволі різняться залежно від сорту і виду пшениці [10]. Серед білків-гліадинів найбільше α - і γ -гліадинів, а ω -гліадинів — лише 6—15 % загального вмісту білка. Сорти пшениці з генетичним матеріалом жита (сорт Apollo) помітно вирізняються високим вмістом ω 1,2-гліадинів. Низькомолекулярних глютенінів у 2—4 рази більше, ніж високомолекулярних. Сорти хлібопекарської пшениці містять більше глютенінів і менше гліадинів порівняно з дикорослими видами-родичами. У сортів з високими показниками хлібопекарської якості співвідношення Gli/Glu нижче, ніж у сортів із низькою якістю.

Щодо структури клейковинних білків наявна інформація з різних джерел неповна. Особливо це стосується глютенінів. Саме через низьку розчинність клейковинних білків у водних розчинах і високу молекулярну масу полімерних глютенінів можливості звичайних методів дослідження структури білків обмежені. Органічні розчинники здатні

ТАБЛИЦЯ 2. Склад білків клейковини у різних сортах і видів пшениці (сумарний вміст загальних гліадинів і загальних глютенінів 100 %) [10]

Варіант	Вміст гліадинів, %					Вміст глютенінів, %			Gli/Glu
	Загалом	ω 5	ω 1,2	α	γ	Загалом	HMW	LMW	
Astron (A)	64	5	4	32	23	36	11	24	1,8
Ares (B)	69	8	5	34	22	31	9	21	2,2
Obelisk (C)	73	4	7	37	25	27	8	17	2,7
Apollo (R)	72	3	12	31	26	28	9	18	2,6
Spelt	75	4	6	36	29	25	7	18	3,0
Durum	75	3	3	39	30	25	5	19	3,0
Emmer	87	7	3	46	31	13	3	10	6,7
Eincorn	77	10	2	45	20	23	4	19	3,3

П р и м і т к а: А — висока, В — середня, С — низька хлібопекарська якість; R — 1RS.1BL житньо-пшенична транслокація; HMW — високомолекулярні глютеніни; LMW — низькомолекулярні глютеніни; Gli/Glu — співвідношення гліадини/глютеніни.

розчиняти клейковинні білки, але при цьому їх нативна структура дезагрегується.

Важливою особливістю структури клейковинних білків є наявність —S—S-зв'язків. Мономерні α - і γ -гліадини містять відповідно по три і по чотири внутрішньомолекулярні зв'язки, а полімерні низько- й високомолекулярні глютеніни — містять як внутрішньо-, так і міжмолекулярні зв'язки. Результатив експериментальних досліджень дисульфідних зв'язків, особливо в молекулах глютенінів, явно недостатньо, адже їх структура нестала і зазнає послідовних змін від дозрівання зерна до формування якості кінцевого продукту.

Дисульфідні зв'язки утворюються відразу після синтезу клейковинних білків, причому спочатку внутрішньомолекулярні, а потім міжмолекулярні [13]. Для формування міжмолекулярного —S—S-зв'язку й полімеризації білка потрібно щонайменше два залишки амінокислоти цистеїну. Ці вимоги задовольняє структура глютенінів. Невелика кількість гліадинів містить непарне число залишків цистеїну, які беруть участь в утворенні міжмолекулярних зв'язків, тому небагато ω -, α - і γ -гліадинів здатні агрегуватися з глютенінами.

Враховавши усі відомі дані хімічних, біохімічних, мікроскопічних та реологічних досліджень, різні автори запропонували чотири моделі структури клейковини.

Модель Вісера [23] передає структуру блока глютенінів із певним складом субодиниць і мол. м. 15 000 000 Д, враховує кількісні співвідношення між індивідуальними субодиницями глютенінів (рис. 2). В її основу покладено дисульфідні зв'язки між субодиницями.

В іншій моделі, запропонованій МакРічі [14], розглянуто нековалентну агрегацію субодиниць білків як основу еластичності та пружності тіста.

У моделі «ланцюга і петлі» Белтона [2] молекулярною основою еластичності тіста вважаються водневі зв'язки між багатими на глутамін доменами гліадинів і глютенінами (ланцюг) та між поліпептидними ланцюгами і водою (петля).

У моделі гіперагрегації часточок клейковини Хамера і Ван Вльє [9] фізичні й хімічні аспекти структури клейковини об'єднані в три рівні:

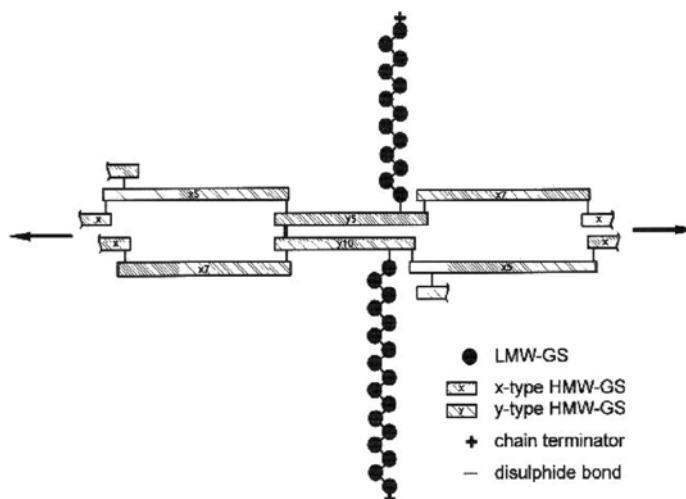


Рис. 2. Модель глютенінового блока з мол. м. 15 000 000 Д [10]

молекулярний, субмікроскопічний, мікроскопічний. Вона включає особливості структури клейковини, розглянуті в трьох інших моделях, наголошує на однаковій важливості для структури й функціональності клейковини як нековалентних, так і ковалентних (дисульфідних) зв'язків.

Модель клейковини та її технологічність тісно пов'язані між собою. Згідно з даними табл. 3, технологічні властивості клейковини визначаються дією різних білкових складників.

За впливом на хлібопекарські властивості найважливішими є макрополімери глютенінів і відношення Gli/Glu. Роль Gli/Glu істотна, оскільки функції гліадинів і глютенінів за впливом на якість тіста вельми різняться. Глютеніни як високополімерні білки формують основну молекулярну сітку, що забезпечує пружність та еластичність тіста. Гліадини — переважно мономерні білки, певною мірою є «пластифікаторами», що визначають розтяжність і в'язкість тіста. Відповідно для забезпечення оптимальних технологічних властивостей клейковини потрібен баланс між в'язкістю та еластичністю, й отже, між гліадинами і глютенінами.

Молекулярна маса білків також є критичним параметром, що впливає на технологічність тіста і клейковини. Найбільші макромолекулярні комплекси глютенінів клейковини називають глютеніном-макрополімером (glutenin macro polymer — GMP), або гель-протеїном, або нерозчинними полімерними протеїнами (unextractable polymeric protein — UPP).

GMP — не розчинний у 1,5 %-му розчині додецилсульфату натрію (SDS) комплекс білків клейковини. Це дуже важлива фракція білків зерна, що визначає хлібопекарську якість борошна, тому треба вміти знаходити її кількість у борошні. Зазвичай для цього знежирене борошно суспендують у 1,5 %-му розчині SDS і протягом 30 хв піддають послідовному ультрацентрифугуванню за 80 000 g і 20 °С. Після центрифугування надосадову рідину видаляють, отриманий осад і є гель-протеїном, (глютеніном-макрополімером, GMP).

GMP можна виділити з борошна і простішим способом. Наприклад, наважку знежиреного пшеничного борошна 0,1 г диспергують у 1,5 мл розчину SDS (1,5 % *m/V*) у мікропробірці Eppendorf, ретельно перемішують на вортексі і протягом 60 хв центрифугують за 40 000 g і сталої температури 20 °С. Після центрифугування вміст пробірки чітко розділяється на три шари: надосадова рідина, GMP-гель і крохмаль. Масу сирого GMP-гелю визначають відразу після видалення надосадової рідини.

Виявлено високу кореляційну залежність ($r = +0,85$) між вмістом GMP (20—40 мг/г) у борошні пшениці, «силою» борошна та об'ємом хліба (рис. 3). Формування GMP великою мірою визначається типом субодиниць глютенінів, які задіяні в його утворенні. Наприклад, висо-

ТАБЛИЦЯ 3. Вплив різних фракцій білків на технологічність клейковини

Технологічна властивість	Фракція білка (субодиниця)
Поглинання води	Гліадини, глютеніни
Когезивність	Глютеніни, гліадини
В'язкість	Гліадини
Еластичність	Глютеніни, HMW-GS
Пружність	Глютеніни
Хлібопекарська якість	Гліадини, глютеніни, макрополімери глютенінів, Gli/Glu

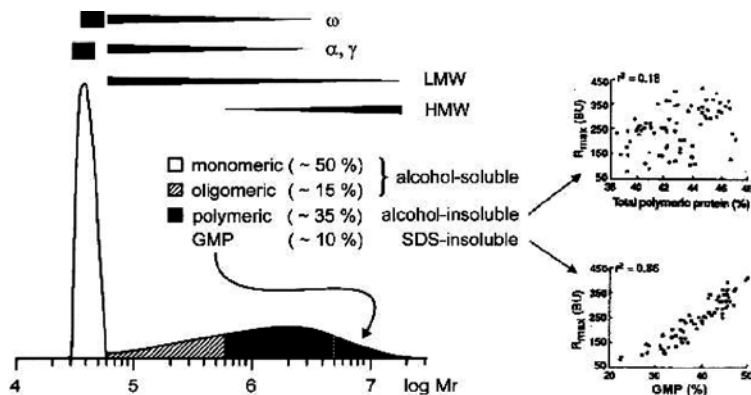


Рис. 3. Розподіл глютенінів за молекулярною масою та кореляція загального вмісту полімерних білків і глютенінових макрополімерів (GMP) із максимальною стійкістю клейковини до замісу (R_{\max}) [8]

кий вміст GMP спостерігається за специфічних комбінацій і концентрацій субодиниць високомолекулярних глютенінів. Для пояснення цього феномену припустили, що субодиниці HMW-GS α -типу є ланцюгуювальними, оскільки містять два або більше вільних залишків цистеїну, які беруть участь у полімеризації. І навпаки, субодиниці-термінатори ланцюга знижують вміст GMP у борошні. Такими є високо- або низькомолекулярні білки чи пептиди з одним залишком цистеїну в молекулі, які блокують полімеризацію. Отже, більшість авторитетних експертів сходиться на думці, що вміст GMP безпосередньо впливає на хлібопекарські властивості пшеничного борошна.

Під час фізичного процесу замісу тіста відбуваються як міжмолекулярні взаємодії між білками, так і суто фізико-механічні явища. У зв'язку з цим для розуміння теорії тіста важливо знати частку участі кожної з цих двох важливих складових, сфокусованих на фракцію глютенінів як домінуючу фракцію білків за її значенням у поведженні тіста.

Численними дослідженнями встановлено, що під час утворення тіста неодмінно відбуваються два фундаментальні процеси: а) розчинність фракції глютенінів підвищується; б) число дисульфідних зв'язків глютенінів зменшується. Тиолреактивні агенти, такі як цистеїн, NEMІ, пришвидшують утворення тіста, тоді як окиснювальні агенти, навпаки, подовжують час його утворення. Прийнято вважати, що в процесі утворення тіста обов'язково руйнуються дисульфідні зв'язки. Загалом ці реакції модифікують та переформовують глютенінополімери й утворюють характерний в'язкоеластичний каркас клейковини.

Звідси впливає значення такого окисника, як кисень повітря, в середовищі якого замішують тісто. Гравеланд (Голландія) спостерігав, що під час замісу тіста в середовищі азоту розчинність фракції GMP не підвищується [7].

Інший голландський учений Дон методом лазерної дифракції для сканування водної суспензії GMP виявив, що на мезоскопічному рівні глютенін-макрополімерна фракція містить часточки глютенінів розміром 1—100 мкм [4], причому характерна пружність GMP-гелю пов'язана із середнім розміром часточок. Від початкового середнього розміру часточок GMP залежать величина механічної енергії замісу та оптимальне утворення тіста. Встановлено також, що мезоскопічна агрегатна часточкова структура глютенінів змінюється в процесі замісу тіста. Звідси зроблено

важливий висновок, що механічна енергія замісу є домінуючим чинником утворення тіста.

Він був експериментально обґрунтований у подальших дослідженнях голландських учених. Наприклад, у дослідах із додаванням цистеїну не помічено жодного впливу тіолреактивного агента на час утворення тіста, коли заміс проводили в середовищі азоту.

В умовах замісу тіста у звичайному повітряному середовищі близько 80 % дисульфідних зв'язків GMP були інтактними, а в середовищі азоту — майже всі вони (96 %) залишалися недоторканими. Втім спостерігалася чітко виражена деструкція часточок GMP не лише під час замісу на повітрі, а й у середовищі азоту. Цим було переконливо доведено, що для деструкції часточок GMP при замісі руйнування дисульфідних зв'язків не є обов'язковим.

У разі замісу тіста в середовищі азоту деструкції зазнавали 40 % часточок GMP, на повітрі — 54 %. Розрахунки параметрів деструкції часточок GMP у процесі замісу тіста вказують на те, що вона приблизно на 75 % відбувається під впливом фізико-механічної дії, а не є результатом руйнування головної дисульфідних зв'язків [3].

Прийнято вважати, що наслідком руйнування дисульфідних зв'язків у процесі замісу є зниження еластичності тіста, тоді як окиснення дисульфідних груп, що супроводжується утворенням нових дисульфідних зв'язків під час відстоювання тіста, підвищує його еластичність.

Однак, незважаючи на поширеність, ця думка не отримала експериментального підтвердження в дослідах голландських учених, які вивчали процес відновлення в'язкоеластичних властивостей тіста, замішаного за наявності тіолового блокатора NEMІ та без нього. Наявність тіолового блокатора у тісті, що відстоюється, передбачала блокування SH-груп, нездатність їх до окиснення й утворення дисульфідних зв'язків, а отже, блокування відновлення еластичності тіста згідно з поширеними поглядами. Однак у дослідах авторів в'язкоеластичні властивості як високо-, так і низькобілкового тіста відновлювались навіть за наявності тіолового блокатора NEMІ. Ці факти, за висновками голландських учених, підтвердили справедливості моделі структури клейковини як гіперагрегації часточок Хамера і Ван Вльє, яка відводить домінуючу роль у процесах утворення тіста при замісі фізико-механічній дії.

Функціональність клейковинних білків і клейковини досліджують сучасними методами на різних рівнях, включаючи генно-інженерний. Щоб визначити роль конкретних білків, наприклад субодиноць високомолекулярних глютенінів, за їх впливом на реологічні властивості тіста, розроблено оригінальну процедуру блокування (інтерференції РНК) експресії окремих генів (gene silencing — «мовчання генів»), що кодують індивідуальні субодиноці високомолекулярних глютенінів.

Група китайських учених із Державної лабораторії клітинної біології і хромосомної інженерії та з Інституту генетики і біології розвитку Академії наук Китаю (Пекін) методом «мовчання генів» створила генетичні лінії (так звані нокаут-мутантні лінії), в яких блоковано синтез критичної для хлібопекарської якості пшениці субодиноці глютеніну 1D × 5 та субодиноці 1В × 14 [22].

Як результат відсутності субодиноці 1D × 5 у мутантних ліній спостерігали значне зниження показників «сила борошна», седиментації за Зелені та індексу клейковини. У мутантних ліній майже в 5 разів скорочувався час утворення тіста та стабільності клейковини. Відсутність суб-

одиниці 1В × 14 призводила до значного зниження розтяжності тіста, але не впливала на час утворення тіста та його стабільність. Взагалі методом «мовчання генів» можна блокувати практично будь-який ген, що кодує глютенін чи гліадин, і таким чином досліджувати вплив кожного конкретного гена на хлібопекарські якості пшениці. Ця технологія відкриває широкі перспективи створення вільних від клейковини продуктів на зерновій основі для харчування осіб, патологічно чутливих до білкових компонентів клейковини (целиакія).

Складні процеси утворення білкових комплексів клейковини під час формування тіста досліджують на сучасному рівні не лише на нативному борошні, а й з використанням для дослідів штучного, або модельного, тіста з білково-крохмальної суміші за певного співвідношення компонентів. Це дає змогу вивчати взаємодію наперед відомих компонентів і чинників у процесі утворення тіста.

Такий цікавий дослід виконано у бельгійській лабораторії харчової хімії і біохімії Науково-дослідного центру харчових продуктів. Крохмально-клейковинна суміш для дослідів була складена з розрахунку 16 % клейковини і 84 % крохмалю. Вивчали кінетику взаємодії гліадин/глютенін у процесі замісу та випічки хліба з модельної суміші. Визначальним критерієм обрано розчинність білкового комплексу як характеристику стану міжмолекулярної агрегації білків клейковини. Модельний білковий комплекс досліджували сучасними вискоефективними методами рідинної SE-HPLC і RP-HPLC хроматографії.

Встановлено, що ω -гліадини не реагують з іншими білками клейковини, оскільки в їхніх молекулах відсутні SH-групи і вони нездатні до утворення ковалентних —S—S-зв'язків з іншими білками. На відміну від ω -гліадинів α - і γ -гліадини, які містять інтрамолекулярні дисульфідні містки, реагують з глютенінами за механізмом SH—SS-взаємодії як реакцією першого порядку з певною швидкістю за підвищення температури м'якуша хліба в процесі випічки до 100 °С. Розчинність гліадинів клейковини модельного тіста повністю відповідала кінетиці реакції агрегації білків клейковини за підвищення температури м'якуша [12].

Одним із важливих питань хлібопечення є відновлення хлібопекарських властивостей тіста зі слабкою або пошкодженою певними екстремальними денатуруючими чинниками (висока температура, клоп-черепашка) клейковиною.

Нативну структуру клейковини можна відновити бактеріальним ферментом трансглютаміназою (глутаміцилпептидамін- γ -глутамілтрансфераза КФ 2.3.2.13), яка каталізує реакцію ацилювання між γ -карбоксамідною групою амінокислоти глутаміну (Gln) та ε -аміногрупою амінокислоти лізину (Lys), унаслідок чого між молекулами білків типу ε -(γ -Gln)-Lys утворюються ковалентні зв'язки. Тобто фермент трансглютаміназа здатний відновлювати зруйновані (денатуровані) білки клейковини, й отже, реологічні властивості тіста.

Одним із прикладів є використання ферменту трансглютамінази у дослідях лабораторії університету Нової Англії (Австралія), в ході яких за концентрації 0,5 % він повністю відновлював властивості слабкої клейковини твердої пшениці при виготовленні макаронних виробів [19].

За останні 10 років серед споживачів ЄС та інших розвинених країн набуває популярності пшениця спельта (полба), яку вирощують в умовах органічного землеробства. Це древній злак, стійкий до жорстких абіотичних умов вирощування, з високими вмістом і харчовою цінністю

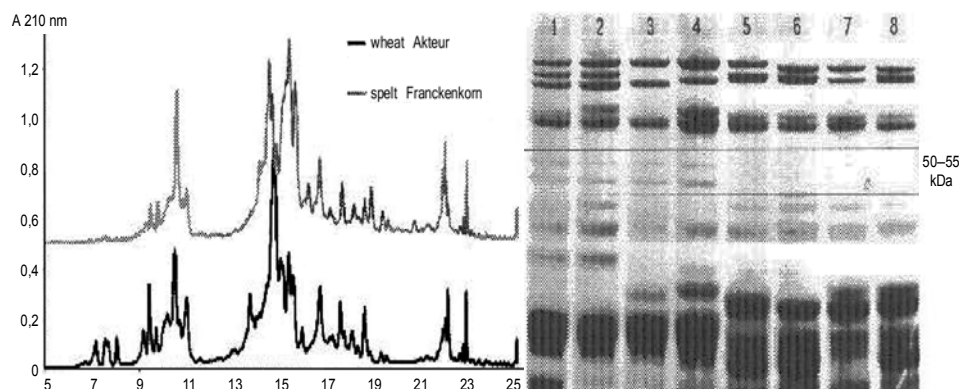


Рис. 4. RP-HPLC хроматограми (зліва) та електрофореграми SDS-електрофорезу (справа) зразків борошна хлібопекарської пшениці (1–4) та полби (5–8) [11]

білка, зниженою токсичністю клейковини для позитивних на целиацію осіб, високими смаковими характеристиками хліба й перетравлюваністю білків.

Технологам і споживачам продуктів із зерна полби часто потрібні надійні критерії ідентифікації борошна полби щодо можливості змішування його з борошном звичайної хлібопекарської пшениці. Це технологічно важливе завдання спробували вирішити біохіміки з Науково-дослідного центру харчової хімії Німеччини — країни, де полба особливо популярна.

Виявлено істотну відмінність між хлібопекарською пшеницею і полбою за кількісним співвідношенням гліадин/глютенін, яке для полби становило 3,5, а для звичайної хлібопекарської пшениці — лише 2,0. Іще надійнішим критерієм диференціації звичайної пшениці і полби є маркерні білки, які виявляли хроматографуванням (RP-HPLC) фракції відновлених гліадинів. У хроматограмах гліадинів полби ідентифіковано 1–3 специфічні для неї піки, які були відсутні у сортів хлібопекарської пшениці. Після аналізу цих піків зразки полби були поділені на 5 різних груп.

Крім того, у хроматограмах глютенінів і SDS-електрофореграмах полби не виявлено характерних для сортів хлібопекарської пшениці так званих ω -зв'язаних гліадинів — мінорної фракції ω -гліадинів з молекулярною масою 50 — 55 кД, які містяться у глютеніновій фракції, через наявність у їх молекулах залишку амінокислоти цистеїну (рис. 4).

Як бачимо, на хроматограмах RP-HPLC полб відсутні три характерні піки, на SDS-електрофореграмах — дві маркерні субоднини 50—55 кД ω -зв'язаних гліадинів порівняно із сортами хлібопекарської пшениці. Ця група білків може слугувати надійним маркером наявності домішки борошна звичайної пшениці у борошні полби при атестуванні партій борошна [11].

З викладених матеріалів досліджень якості зерна, виконаних у провідних лабораторіях світу, стає очевидним, наскільки складними є біохімічні процеси, що лежать в основі формування якості пшеничного хліба, починаючи від генетичних факторів контролю біосинтезу білків і ферментів зерна й закінчуючи властивостями готового продукту. Огляд досліджень дає також достатню уяву про широкі можливості сучасних методів біотехнології та генної інженерії у вивченні еволюції чинників

якості зерна. Прикро, що всі ці високотехнологічні наукові дослідження виконані за межами України, що свідчить про суттєве відставання вітчизняних наукових лабораторій від світового рівня досліджень у стратегічно важливій галузі якості зерна.

1. *Aussenac T., Rhazy L.* Accumulation of polymeric proteins in developing grains of hexaploid wheats in relation with changes in glutathione thiol-disulphide status // Proc. of the 10th Int. Gluten Workshop, Clermont-Ferrand, France, 2009. — Clermont-Ferrand, 2009. — P. 26—27.
2. *Belton P.* On the elasticity of wheat gluten // J. Cereal Sci. — 1999. — **29**. — P. 103—107.
3. *Don C.* Gluten network formation, dough development and the mechanism underlying glutenin particle disruption // Proc. of the 10th Int. Gluten Workshop, Clermont-Ferrand, France, 2009. — Clermont-Ferrand, 2009. — P. 90—94.
4. *Don C., Lichtendonk W., Plijter J., Hamer R.* Glutenin macro polymer: a gel formed by glutenin particles // J. Cereal Sci. — 2003. — **37**. — P. 1—7.
5. *Dupont F., Horkman W., Vensel W., Chan R.* Differential accumulation of sulfur-rich and sulfur-poor wheat flour proteins is affected by temperature and mineral nutrition during grain development // Ibid. — 2006. — **44**. — P. 101—112.
6. *Egidi E., Janni M., Sestili F. et al.* Characterization of transgenic durum wheat lines transformed with mutated m- and s-type LMW-GS. // Proc. of the 10th Int. Gluten Workshop, Clermont-Ferrand, France, 2009. — Clermont-Ferrand, 2009. — P. 55—58.
7. *Graveland A., Bosveld P., Lichtendonk W., Moonen J.* Superoxide involvement in the reduction of disulphide bonds of wheat gel proteins // Biochem. Biophys. Res. Com. — 1980. — **93**. — P. 1189—1195.
8. *Gupta R., Khan K., MacRitchie F.* Biochemical basis of flour properties in bread wheat. 1. Effects of variation in the quantity and size distribution of polymeric protein // J. Cereal Sci. — 1993. — **18**. — P. 23—41.
9. *Hamer R., Van Viet T.* Understanding the structure and properties of gluten: an overview // Special Publ. — Royal Society of Chemistry 261 (Wheat Gluten), 2000. — P. 125—131.
10. *Koehler P.* Structure and functionality of gluten proteins: an overview // Proc. of the 10th Int. Gluten Workshop, Clermont-Ferrand, France, 2009. — Clermont-Ferrand, 2009. — P. 84—88.
11. *Koenig A., Wieser H., Koehler P.* Distinguishing wheat and spelt using typical protein markers // Ibid. — P. 142—145.
12. *Lagrain B., Brus K., Delcour J.* Reaction kinetics of gliadin-glutenin cross-linking in bread making // Ibid. — P. 120—123.
13. *Lagrain B., Thewissen B., Brijis K., Delcour J.* Mechanism of gliadin-glutenin cross-linking during hydrothermal treatment // Food Chem. — 2008. — **107**. — P. 753—760.
14. *MacRitchie F.* Wheat proteins: characterization and role in flour functionality // Cereal Foods World. — 1999. — **44**. — P. 188—193.
15. *Majoul T., Bancel E., Triboi E., Branlard G.* Effect of water stress on the protein patterns of two Tunisian bread cultivars differing in drought tolerance // Proc. of the 10th Int. Gluten Workshop, Clermont-Ferrand, France, 2009. — Clermont-Ferrand, 2009. — P. 68—71.
16. *Moldestad A., Faergestad E., Hoel B., Uhlen A.* Effect of temperature conditions during grain development on wheat gluten resistance // Ibid. — P. 42—44.
17. *Romeuf I., Dardevet M., El-Malki R. et al.* Variations in polymorphism within genes coding for the transcriptional factor SPA might influence wheat storage proteins and quality // Ibid. — P. 33—37.
18. *Shewry P., Tosi P., Jones D. et al.* Using epitope tagging to explore the trafficking, location and functional properties of wheat gluten protein // Gluten Proteins, 2006 / G.L. Lookhart, P.W. Ng eds. — 2007. — P. 112—116, AACC Int., St. Paul.
19. *Sissons M., Aravind N., Fellows C.* Quality of durum wheat spaghetti with added microbial transglutaminase. Can this enzyme restore product quality in spaghetti with added fibre? // Proc. of the 10th Int. Gluten Workshop, Clermont-Ferrand, France, 2009. — Clermont-Ferrand, 2009. — P. 124—128.
20. *Tosi P., Gritsch C., Freeman J. et al.* Studying the pattern of synthesis, deposition and tissue location of gluten proteins by epitope tagging // Ibid. — P. 17—20.
21. *Tranquet O., Echasserieau V., Legoux M.-A., Denery S.* Wheat antibody collection // Ibid. — P. 76—79.
22. *Wang D., Li Y., Guo X. et al.* Functional difference of high molecular weight glutenin subunits in controlling the bread making quality in common wheat // Ibid. — P. 113—114.
23. *Weiser H., Bushuk W., MacRitchie F.* The polymeric glutenins // Gliadin and glutenin. The unique balance of wheat quality / Ed. C. Wrigley et al. AACC Int. St. Paul, MN. — 2006. — P. 213—240.

24. Wieser H., Koehler P. The biochemical basis of celiac disease // *Cereal Chem.* — 2008. — 85. — P. 1—13.

Отримано 28.09.2011

СОВРЕМЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КАЧЕСТВА ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ В МИРЕ:
БИОСИНТЕЗ И НАКОПЛЕНИЕ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ, СТРУКТУРА, АГРЕГАЦИЯ И
РЕОЛОГИЯ В СВЯЗИ С ТЕХНОЛОГИЕЙ ЗЕРНОПРОДУКТОВ

А.И. Рыбалка,¹ Б.В. Моргун,² В.М. Починок³

¹Селекционно-генетический институт — Национальный центр семеноведения и сортоизучения Национальной академии аграрных наук Украины, Одесса

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, Киев

³Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Представлен обзор результатов современных аналитических и технологических исследований, выполненных в ведущих лабораториях мира. Освещены вопросы, связанные с механизмами биосинтеза запасных белков зерна, их накоплением в процессе развития и созревания зерновки, взаимодействием белков и других ингредиентов зерна. Продемонстрирована эффективность использования биотехнологических методов в управлении процессами биосинтеза белков зерна, улучшения их пищевой ценности.

RECENT RESEARCH OF WHEAT GRAIN QUALITY IN THE WORLD: STORAGE
PROTEINS BIOSYNTHESIS, ACCUMULATION, STRUCTURE, AGGREGATION AND
RHEOLOGY RELATED TO END-USE PRODUCTS

A.I. Rybalka,¹ B.V. Morgun,² V.M. Pochinok³

¹Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivars Investigation, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine

3 Ovidiopolska road, Odesa, 65036, Ukraine

²Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine
148 Akademika Zabolotnogo St., Kyiv, 03022, Ukraine

³Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

Recent analytical and technological research of wheat grain storage proteins are reviewed. Gluten proteins biosynthesis, their accumulation during grain development, proteins interaction with other grain compounds are discussed. Efficiency of biotechnology in regulation of seed proteins biosynthesis and protein nutrition quality improvement has demonstrated.

Key words: gluten proteins, gliadin, glutenin, antibodies, molecular markers, rheology, glutenin-macropolymer, disulfide bounds.