

JERZY KĄCZKOWSKI

Katedra Biochemii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Nowe poglądy na strukturę i funkcje białek zapasowych zbóż na przykładzie pszenicy (*Triticum aestivum* L.)

New aspects of the cereal grain storage protein structure and functions based on wheat (*Triticum aestivum* L.)

Wobec znacznego postępu badań, w artykule przedstawiono najnowsze osiągnięcia w zakresie struktury i właściwości podjednostek uczestniczących w tworzeniu kompleksu glutenowego białek zapasowych ziarniaków zbóż, na przykładzie pszenicy. Główną uwagę zwrócono na elastomeryczny charakter tych białek, występowanie charakterystycznych sekwencji powtarzalnych aminokwasów odpowiedzialnych za tworzenie struktur lewoskrętnych — β oraz na typy i lokalizację wiązań sieciujących, uczestniczących w tworzeniu wielkocząsteczkowych kompleksów (disulfidowych, wodorowych, sił hydrofobowych). Starano się również, w miarę możliwości, powiązać strukturę podjednostek uczestniczących w tworzeniu kompleksów z właściwościami i wartością wypiekową glutenu i ciasta, jakkolwiek w tym zakresie istnieje nadal wiele wątpliwości. Przedstawiono wreszcie mechanizm toksycznego oddziaływania prolamin na osoby cierpiące na chorobę pochodzenia genetycznego — celiakię, a także zastosowanie metod inżynierii genetycznych dla uzyskiwania naturalnych podjednostek w stanie czystym i wbudowywanie ich do kompleksów, co stanowi ważny krok na drodze poznania cech jakościowych wnoszonych przez poszczególne podjednostki.

Słowa kluczowe: białka zbóż, budowa podjednostek, białka elastomeryczne, funkcje jakościowe, struktura kompleksów

Because of the significant progress in investigations on the structure and properties of subunits participating in the formation of gluten complex — the main storage proteins deposited in grain endosperm, this review presents most important results obtained during the last decade in this area. The main topics referred concern the elastomeric properties of gluten proteins, contents and regularities of characteristic amino acid motifs of repetitive regions, responsible for the formation of left-turned β -helices, as well as the types and localisation of crossing bonds (disulfide, hydrogen, hydrophobic forces), which take part in complexing process to form the high-molecular-weight units. The trials to establish possible relations between the monomer units participating in the complexing and mechanical (rheological) properties and bread-making quality in laboratory bakings, were also described, though many difficulties in that area exist until now. The elucidated recently mechanism of prolamin toxicity against patients suffering from the genetic celiac disease, was also presented. Finally, the genetic engineering methods applied to the synthesis of individual prolamin subunits in the pure form, were

presented, as the mostly important step to recognise their quality contribution, when included in vitro into gluten complex.

Key words: cereal proteins, complex structure, elastomeric proteins, subunit composition, quality relationships

WPROWADZENIE

Dziesięć lat temu został opublikowany w Biuletynie IHAR artykuł przeglądowy przedstawiający ówczesny stan wiedzy o strukturze i funkcjach białek glutenu pszennego, jako najważniejszego pod względem wykorzystania i najlepiej poznanego białka zapasowego ziarniaków zbóż (Kączkowski, 1991). Ponieważ technika badawcza w tym zakresie znacznie się od tego czasu rozwinęła, a kierunki badań zostały wzbogacone (np. o izolowanie indywidualnych składników wraz z lokalizacją kodujących je genów), wydało się celowe przedstawienie aktualnych osiągnięć w zakresie struktury i funkcji tych białek oraz o ich miejscach aktywnych w tworzeniu kompleksów. Udało się również wskazać te frakcje (lub składniki) białek glutenowych, które wykazują ścisłą współzależność struktury wtórnej z typowymi dla glutenu właściwościami elastycznymi (Tatham, Shewry, 2000).

W izolowaniu poszczególnych frakcji i pojedynczych składników białkowych szczególnie przydatne okazały się metody elektroforetyczne i chromatograficzne, których wyczerpującego przeglądu dokonali Bietz i Simpson (1992). Przy rozdzielaniu białek zapasowych zbóż najbardziej użyteczna okazała się elektroforeza w żelu poliakryloamidowym, zarówno bezpośrednia (PAGE), jak i w obecności SDS (SDS-PAGE), ogniskowanie izoelektryczne (IEF), a ostatnio również elektroforeza kapilarna (CE). Stosowanie w tych metodach żelu o różnej grubości pozwala również uzyskiwać większe ilości frakcji, lub indywidualnych składników białkowych, wystarczające do charakterystryki szczegółowej.

Wśród metod chromatograficznych największe znaczenie ma rozdział w chromatografii kolumnowej w żelu, działający na zasadzie różnic wielkości (SEC), wymiany jonowej (IEC) oraz oddziaływań hydrofobowych (HIC). Te metody odznaczały się długim czasem wykonania i niedostateczną powtarzalnością. Dlatego wprowadzono tzw. wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) eliminującą te niedostatki. Prowadzi się ją w kolumnach o jednorodnej porowatości i znacznej długości, wypełnionych pochodnymi krzemianowymi o specyficznej zdolności reagowania z cząsteczkami białek, pod znacznym ciśnieniem. W rozdzielaniu białek stosuje się 3 sposoby oddziaływania: wielkość cząsteczek (SE-HPLC), charakter jonowy (IE-HPLC), a szczególnie rozdział na zasadzie hydrofobowości w odwróconej fazie (RP-HPLC). Zostały one wprowadzone do rozdziału głównie przez Bietza i wsp. (1987).

Znaczne osiągnięcia uzyskano również w ustaleniu wielości i lokalizacji genów kodujących podstawowe podjednostki uczestniczące w budowie frakcji głównych oraz odpowiedniego ich krzyżowania metodami hodowlanymi, dla pozyskania linii wzbogaconych w szczególnie przydatne składniki glutenu. Ten kierunek nie będzie omawiany w artykule, natomiast zostanie opisana w skrócie technika klonowania cDNA

odpowiadającego określonym podjednostkom białkowym i jego ekspresja w komórkach bakterii w celu pozyskania czystych składników.

KLASYFIKACJA I BUDOWA BIAŁEK ZAPASOWYCH ZBÓŻ

Jak wiadomo, białka ziarniaków, np. pszenicy dzieli się zależnie od rozpuszczalności wg Osborne'a (1924) na albuminy i globuliny, rozpuszczalne odpowiednio w wodzie i rozcieńczonych roztworach soli obojętnych oraz prolamin i gluteliny, rozpuszczalne w 70% etanolu lub w kwasach. Pierwsze dwie frakcje pełnią liczne funkcje fizjologiczne i, przynajmniej u zbóż, nie są lub tylko w części zaliczane do zapasowych. Natomiast dla prolamin i glutelin, występujących w ziarniakach zbóż w ilości ok. 80% białek endospermu, nie są znane ich inne funkcje poza rezerwą aminokwasów, dlatego są one typowymi białkami zapasowymi. Są one zasadniczymi składnikami glutenu, czyli kompleksu o szczególnych właściwościach wiskoelastycznych, który pozostaje po odmyciu składników rozpuszczalnych i skrobi w strumieniu wody bieżącej i jest podstawą formowania ciasta. Gluten dzielono na dwie frakcje: rozpuszczalną w 70% etanolu gliadynę o znacznej lepkości oraz gluteninę wykazującą znaczne właściwości elastyczne, rozpuszczalną w kwasach lub zasadach; obie frakcje występują w endospermie, w podobnych proporcjach. Współdziałający zespół (kompleks) białek obu frakcji tworzy rozciągliwą masę zatrzymującą gazy wytwarzane w fermentacji ciasta, a powstała porowata struktura jest utrwalana w wysokiej temperaturze wypieku. Ta szczególna właściwość przesądza o głównym kierunku wykorzystywania pszenicy (i w mniejszym stopniu innych zbóż) w piekarstwie (Johansson, 1995; Shewry, Tatham, 1987).

Wykazano następnie, że zarówno gliadyna, jak i glutenina wykazują znaczną heterogeniczność, a ich podjednostki mają bardzo podobny skład oraz sekwencje aminokwasów (Bietz, 1987). Gdy okazało się, że gliadyny i gluteniny zawierają podjednostki o podobnej strukturze i że drugie z nich są również rozpuszczalne w 70% etanolu po uprzedniej redukcji, zaproponowano zmiany w klasyfikacji białek glutenowych, zaliczając do prolamin I — rozpuszczalne bezpośrednio w 70% etanolu, a do prolamin II — rozpuszczalne w tym rozpuszczalniku po redukcji. Natomiast do glutenin (białek resztkowych) zaliczono bardziej złożone białka (zawierające również składniki niebiałkowe), nierozpuszczalne po redukcji, o niewyjaśnionym składzie; stanowią one do 10% białek glutenowych. Wykazano więc, że białka prolamin I i II stanowią podstawowe składniki czynne glutenu pszennego i zróżnicowanie ich składników (oraz wzajemne proporcje) przesądza o różnicach cech jakościowych (MacRitchie i in., 1990; Shewry, Tatham, 1990). Należy zaznaczyć, że podział na prolamin I i II wprowadzany jest z oporami i nawet w nowej literaturze nie zawsze jest stosowany.

SKŁAD PODJEDNOSTKOWY PROLAMIN

Prolaminy są złożone z licznych polipeptydów o różnym składzie i sekwencji aminokwasów oraz masach cząsteczkowych (M_r). W drodze elektroforezy w żelu poliakryloamidowym bez, lub z udziałem SDS (PAGE lub SDS-PAGE) a także chromatografii

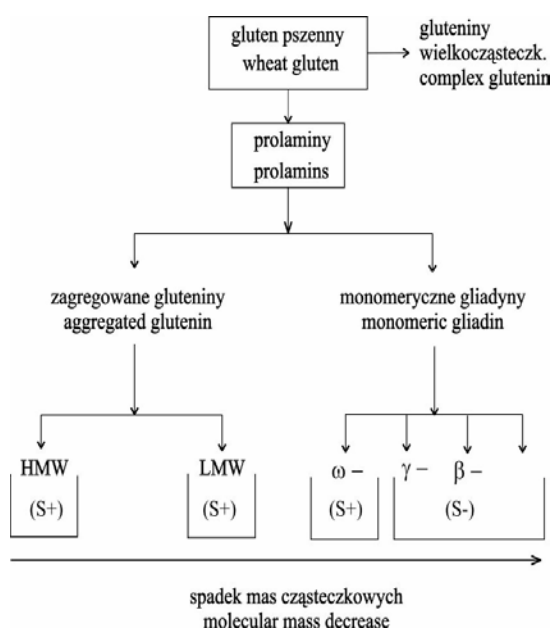
— HPLC — szczególnie w odwróconej fazie (RP-HPLC), w ostatnim 20-leciu rozdzielono, wyizolowano i scharakteryzowano wiele z nich. Prolaminy wydzielone z glutenu zbóż dzieli się na 2 grupy: monomeryczne - prolaminy I (d. gliadyny) i oligo- lub polimeryczne — prolaminy II (d. gluteniny). Jak wynika ze schematu na rysunku 1, pierwsze z nich podzielono ze względu na masy cząsteczkowe i ruchliwość w elektroforezie na: α -, β -, γ - i ω , a drugie na mało- i wielkocząsteczkowe (LMW i HMW). Frakcje α -, β - i γ - oraz LMW, ze względu na znaczną zawartość cysteiny (Cys) zalicza się do bogatych w siarkę (S+), natomiast ω -prolaminy - do ubogich w siarkę (S-). Frakcja HMW (prolamin II) ma pod tym względem charakter pośredni.

Skład aminokwasowy prolamin zbóż pokrewnych klimatu umiarkowanego (pszenicy, żyta i jęczmienia oraz pszenżyta) jest szczególnie bogaty w Glu + Gln (ponad 90% jest w formie amidu) — od 100 do 300 reszt/mol oraz Pro — od 30 do 130 reszt/mol; również Gly występuje w prolaminach HMW w znacznych ilościach (do 120 reszt/mol). Natomiast prolaminy są szczególnie ubogie w aminokwasy egzogenne, zwłaszcza Lys, Met i Trp, nieco więcej zawierają Phe i Tyr, a poziom Val, Leu i Ile (z łańcuchem rozgałęzionym) jest dostateczny w żywieniu. Pod tym względem prolaminy zbóż mają więc małą wartość żywieniową i winny być uzupełniane w żywieniu innymi źródłami (Shewry, Tatham, 1990), np. białkami roślin motylkowatych lub zwierzęcymi.

Prolaminy są odkładane w endospermie ziarniaków w niewielkich ciałach białkowych, które powstają wcześniej po zapyleniu, specjalnie w celu ich upakowania, a od 40 dnia rozwoju ulegają stopniowemu rozkładowi. Przebieg syntezy poszczególnych białek w trakcie rozwoju ziarniaków badali m.in. Huebner i wsp. (1990), a stan oksydacyjny — Gobin i wsp. (1997). Przejściowa lokalizacja tworzących się białek zapasowych w ciałach białkowych ma istotne znaczenie dla ich ochrony w czasie najmniejszej stabilności, a późniejsze uwolnienie ich od tej ochrony pozwala na utlenienie grup -SH i tworzenie wiązań -S-S-, co z kolei prowadzi do maksymalnej ich stabilności; w procesie tym, jak wiadomo (Kączkowski, 2001), podstawowe znaczenie ma udział tioredoksyny, jako przenośnika protonów i elektronów.

Prolaminy pszenicy i zbóż pokrewnych

Z rysunku 1 wynika, że do prolamin są zaliczane obecnie zarówno monomeryczne białka rozpuszczalne w 70% etanolu (d. α -, β -, γ - i ω -gliadyny), jak i kompleksy oligo- i polimeryczne (LMW i HMW-gluteniny). Niezależnie, białka zbóż dzieli się na bogate w S (S+) i ubogie w S (S-); do pierwszych należą: α -, β - i γ -gliadyny, w których Cys tworzy wiązania disulfidowe -S-S- wewnątrz- i międzycząsteczkowe oraz LMW-prolaminy (należące do prolamin II); Cys tworzy w nich oba rodzaje wiązań -S-S-. Wspomniano, że głównymi prolaminami (S-) są monomeryczne ω -prolaminy, jak i polimeryczne HMW-prolaminy II (gluteniny). Poszczególne frakcje wykazują znaczny polimorfizm, a ich składniki monomeryczne różnią się składem i sekwencją aminokwasów. Dodatkowo, frakcje oligo- i polimeryczne (LMW i HMW) zawierają składniki (podjednostki) zróżnicowane pod względem struktury i lokalizacji genów sterujących ich syntezą.



Rys. 1. Klasyfikacja białek zapasowych ziarniaków zbóż — prolamin pszenicy
Fig. 1. Classification of cereal grain storage proteins — wheat prolamins

Tabela 1

Klasyfikacja białek zapasowych ziarniaków zbóż — odpowiedniki frakcji prolamin pszenicy,
jęczmienia i żyta

Classification of cereal grain storage proteins — relative prolamin fractions of wheat, barley and rye

	Pszenica Wheat	Jęczmień Barley	Żyto Rye
HMW	HMW — glutenina HMW —glutenin	D — hordeina D— hordein	HMW — sekalina HMW — secalin
S(-)	ω — prolamina ω — prolamins	C — hordeina C — hordein	ω — sekalina ω — secalin
S(+) pierwotne	γ — prolamina	γ — hordeina	γ — sekalina
S(+) primary	γ — prolamins	γ — hordein	γ — secalin 40 kDa
S(+) wtórne	α — prolamina	—	—
S(+) secondary (monomer)	α — prolamins	—	—
LMW	LMW — prolamin LMW — prolamins	β — hordeina β — hordein	—
—	—	—	γ — sekalina γ — secalin 76 kDa

Skład podjednostkowy wymienionych frakcji mono- i oligomerycznych wykazuje różnice dziedziczące się w tzw. blokach (p. dalej) pomiędzy odmianami danego gatunku zboża. Różnice te są znacznie większe pomiędzy gatunkami spokrewnionymi w podrodzinie *Triticeae*, najbardziej popularnymi w naszej strefie klimatycznej — pszenicą, żytem i jęczmieniem. Skład jakościowy i ilościowy poszczególnych frakcji przesądza o

właściwościach fizycznych tzw. białka glutenowego (m.in. lepkości i elastyczności), co wiąże się z użytkowymi cechami technologicznymi — głównie w piekarstwie.

Charakterystyka frakcji białek glutenowych zbóż

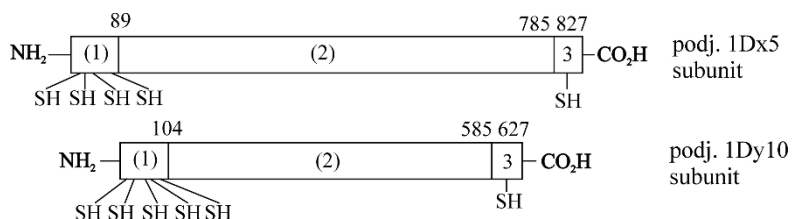
Jednym z podstawowych kierunków badań białek glutenowych, obok ich frakcjonowania i sterowania genetycznego syntezy poszczególnych składników, było od wielu lat znalezienie frakcji, czy ich podjednostek (i ewentualnie składników niebiałkowych), które mają główny wpływ na tworzenie szczególnych cech viskoelastycznych, tzn. lepkości, spoistości i elastyczności glutenu odmytego lub ciasta. Cechy te, spotykane bardzo rzadko u białek naturalnych są wykorzystywane w tworzeniu porowatej struktury ciasta o szczególnych właściwościach reologicznych. Białka naturalne tego typu określa się jako elastomeryczne (Tatham, Shewry, 2000), a mechanizm powstawania tych cech jest obecnie intensywnie badany. Pionierskie prace Finneya i wsp. (Hoseney i in., 1970), a nieco później Ewarta (1979) wskazały wyraźnie na dodatnie działanie niektórych frakcji białkowych oraz ich struktury pierwotnej i wtórnej.

Prolaminy wielkocząsteczkowe (HMW)

Występują one we wszystkich wymienionych gatunkach podrodziny *Triticeae* i u pszenicy stanowią ok. 10% glutenu ogółem, a w europejskich zbożach składają się z ponad 30 podjednostek. Różnice alleliczne ich składu i liczby wykazały istotny wpływ na wartość wypiekową mąki (Payne i in., 1981). Ustalono, że występują wśród nich 2 typy cząsteczek różniących się M_r (Shewry, Tatham, 1990) i sekwencją aminokwasów: typu x wędrujące w SDS-PAGE wolniej oraz typu y — szybsze; ich schematyczne struktury oraz M_r pokazano na rysunku 2. Oba typy podjednostek zawierają znaczne ilości Gly (14–19% mol), Glu (37–39% mol w tym ok. 90% w formie amidu) i Pro (12–14% mol). Wyizolowano szereg genów kodujących te podjednostki HMW i ustalono sekwencję aminokwasów na podstawie namnożonego w PCR cDNA. Różnią się one długością łańcuchów peptydowych w granicach od 627 do 827 reszt aminokwasów i M_r od 67,5 do 88,13 kDa.

Jak wynika z rysunku 2, podjednostki te mają prostą strukturę pierwotną domen: sekwencje niepowtarzalne w regionie N-końca (81–104 reszt aminokwasów) i C-końca (42 reszty), flankujące centralny region domen powtarzalnych. Regiony niepowtarzalne zawierają wszystkie (lub prawie) reszty Cys (typ x — 3, typ y — 5). Natomiast regiony powtarzalne oparte są na trzech motywach: heksapeptydu i nonapeptydu (Pro-Gly-Gln-Gly-Gln-Gln oraz Gly-Tyr-Tyr-Pro-Thr-Ser-Pro/Leu/-Gln-Gln), które są obecne w obu typach podjednostek (x i y) oraz tripeptydu Gly-Gln-Gln, który występuje tylko w podjednostkach typu x. Ponadto motyw heksapeptydu występuje w szyku podwójnym, a nonapeptydu — jest rozrzucony w sekwencji. Wreszcie, w niektórych podjednostkach występują na obu końcach domen powtarzalnych reszty Cys (Shewry, Tatham, 1990). Uważa się, że domeny powtarzalne tworzą się w wyniku zjawisk amplifikacji i delecji bloków reszt aminokwasów.

a)



b) Motywy sekwencji aminokwasów

Typ x: -Pro-Gly-Gln-Gly-Gln-Gln-Gly-GLN-Gln

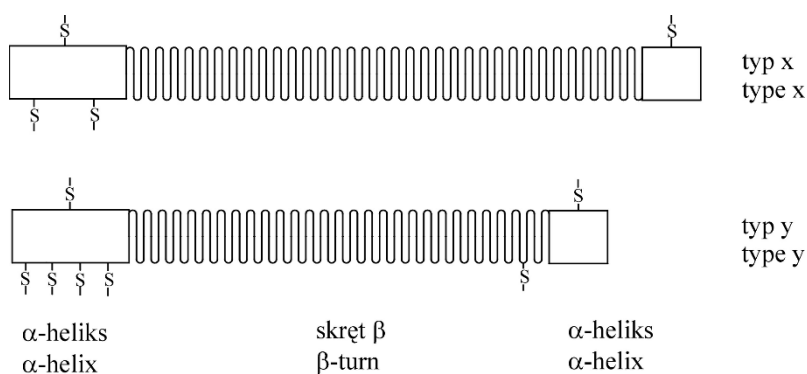
-Pro-Gly-Gln-Gly-Gln-Gln-Gly-Gln-Gln

-Gly-Tyr-Tyr-Pro-Thr-Ser-Pro-Gln-Gln

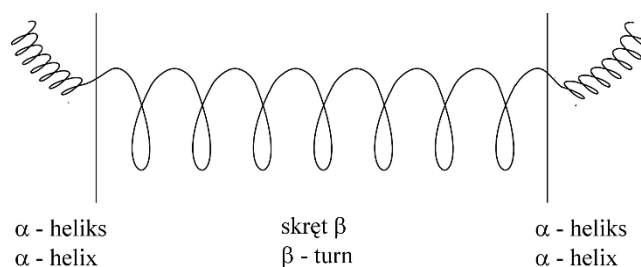
Typ y: -Pro-Gly-Gln-Gly-Gln-Gln-

-Gly-Tyr-Tyr-Pro-Thr-Ser-Leu-Gln-Gln

c)



d)



Rys. 2. Cechy struktury podjednostek HMW glutenin (prolamin II); a, struktura pierwotna podjednostek; b) typy częściej spotykanych motywów powtarzalnych; c) schemat struktury II-rzędowej jednostek x i y; d) model struktury III-rzędowej podjednostek; (1) — strefa N-końcowa; (2) - domeny powtarzalne; (3) — strefa C-końcowa; (Shewry, Tatham, 1990, 1997)
Fig. 2. Structural features of HMW glutenin (prolamin II) subunits; a) the primary subunit structures; b) the types of most popular repetitive motifs; c) schematic secondary structures of x and y subunits; d) a model of tertiary subunit structure; (1) N-terminal region; (2) — repetitive domains; (3) C-terminal region; (Shewry, Tatham, 1990, 1997)

Na podstawie badań spektroskopowych dichroizmu kołowego (CD) podjednostek HMW oraz potwierdzenia na syntetycznych oligopeptydach odpowiadających domenom powtarzalnym wykazano, że fragmenty C- i N-końcowe przyjmują w roztworze konformację α -helikalną, natomiast domeny powtarzalne mają nietypową strukturę lewoskrętną — β -helikalną. Na podstawie badań właściwości hydrodynamicznych i spektroskopowych sporządzono model cząsteczki HMW, który ma kształt „laski” o wymiarach $44\text{--}45 \times 1,8$ nm, a β -spiralą ma przesunięcie wzdłuż osi 13,5 reszt aminokwasowych na 1 obrót. Należy zaznaczyć, że struktury β -helikalne wykazano dotychczas dla niewielu białek naturalnych, określanych jako elastomeryczne (Tatham, Shewry, 2000), ze względu na ich właściwości gumowato-elastyczne i zdolność deformacji (bez rozrywania wiązań), czemu towarzyszy gromadzenie i wyzwalamie energii.

Nowsze badania potwierdziły, że frakcja HMW-gluteniny ma zasadniczy wpływ na wartość technologiczną (wypiekową) pszenicy, co zbadano zarówno przez wypiek laboratoryjny, jak i wartości reologiczne. Jakość zależy nie tylko od poziomu tej frakcji, ale i jej struktury podjednostkowej; podjednostki x mają w tej współzależności większy wpływ, niż jednostki y. Dodatkowych argumentów w tym względzie dostarczyło porównanie frakcji HMW pszenicy i żyta (Kipp i in., 1996). Wykazano m.in., że żyto zawiera tylko ok. 30% frakcji HMW w stosunku do pszenicy. W pełni utleniona frakcja HMW pszenicy ma znacznie większy wpływ na właściwości reologiczne, niż żytnia; m.in. ta druga zawiera wyłącznie podjednostki typu y, a pszenna — oba typy, choć ruchliwości elektroforetyczne w SDS-PAGE u obu zbóż były podobne; Niższy poziom Glu + Gln (zwłaszcza Glu) różnicuje ich elastyczność, a 2-3-krotnie wyższy poziom Cys świadczy o odmiennym sposobie polimeryzacji. Wreszcie, żytnia frakcja HMW wykazuje wyższy poziom glikozylacji, co zmniejsza hydrofobowość powierzchniową w stosunku do frakcji HMW pszenicy. Wymienione różnice wskazują na znacznie mniejszą możliwość tworzenia typowych kompleksów w glutenie ziarniaków żyta, w porównaniu z pszenicą.

Białka HMW występują w nasionach zbóż (głównie pszenicy) w wielkocząsteczkowych kompleksach o M_r 500–5000 kDa, a nawet większej, stabilizowanych międzyłańcuchowymi wiązaniami disulfidowymi -S-S-. Wiązania te tworzą się głównie w regionach C- i N-końcowych, gdyż tam lokuje się większość reszt Cys. W wyniku powstają liniowe polimery łączące łańcuchy wg zasady „głowa-ogon” (Ewart, 1979), choć są również możliwe rozgałęzienia lub usieciowania, a także wiązania -S-S- wewnątrzłańcuchowe, np. w podjednostkach typu y. Sugeruje się, że w strukturze podjednostek HMW prolamin występują różnice regularności w strefach powtarzalnych, odbijające się na jakości technologicznej, ale nie są one wyjaśnione w szczegółach.

Istnieją wstępne dowody dotyczące znacznego podobieństwa pomiędzy strukturą podjednostek HMW pszenicy i pokrewnych zbóż — D-hordeiny jęczmienia i HMW-sekaliny, ale brak szczegółów w tym zakresie. Obok podobieństw i różnic z HMW-sekaliną, opisanych wyżej, wiadomo, że sekwencje powtarzalne białek jęczmienia i żyta, mają znaczne podobieństwo z sekwencjami HMW pszenicy, jednak ich długość jest zwykle mniejsza, a hydrofobowość większa. Opracowane nowe metody badania tych struktur, łącznie z białkami innych gatunków zbóż pozwoli uzyskać więcej informacji o strukturach podjednostek (Kasarda i in., 1998; Wieser i in., 1998).

Białka prolaminowe ubogie w siarkę (S-)

Jak wynika z rysunku 1, do białek o małej zawartości siarki należą ω -prolaminy pszenicy, a także C-hordeina jęczmienia i ω -sekalina żyta. Ich masy cząsteczkowe wahają się w granicach 44–78 kDa, przy czym największym rozrzutem odznacza się ω -prolamina pszenicy, a najmniejszym - ω -sekalina — 48–53 kDa (większość struktur C-hordeiny jest również mało zróżnicowana — 52–54 kDa). Frakcja ta stanowi 10–20% glutenu w jęczmieniu i 11% w życie i pszenicy i odznacza się szczególnie dużą zawartością Glu+Gln+Pro+Phe — w sumie do 80% reszt/mol, ale występują tu duże różnice w podjednostkach sterowanych przez różne genomy, np. z genomów A i D — najmniej, a z genomu B — najwięcej. Wynika to ze zróżnicowanej sekwencji domen powtarzalnych. Różnice wystąpiły również w regionie N-końcowym, jakkolwiek homologia w tym przypadku jest duża. Wszystkie one zawierają znaczny poziom struktury β -helikalnej w domenach powtarzalnych, jakkolwiek w niejednakowej zwartości przestrzennej.

Składniki ω -prolaminy pszenicy w zasadzie nie zawierają Cys, natomiast towarzyszące tej frakcji składniki o podobnej budowie i właściwościach zawierają kilka reszt tego aminokwasu (uzyskiwane w hydrolizie białek HMW), są określane jako D-prolaminy (Masci i in., 1998). Dotychczas wyizolowano ok. 15 frakcji ω -gliadyny, dla których sugerowano skład aminokwasowy sekwencji powtarzalnych i N-końcowych oraz ustalono położenie genów kodujących je — głównie w pozycjach G1 i B1, na krótszym ramieniu odpowiednich chromosomów (Zhao i in., 1999; Du Pont i in., 2000). Zarówno sekwencja domen powtarzalnych (szczególnie bogata w Gln i Pro), jak i pomiary widma dichroizmu kołowego (CD) oraz IR wykazały, że podobnie do podjednostek HMW prolamin, są one bogate w struktury β -helikalne. Ich poziom w białku glutenu wzrasta (podobnie do HMW prolamin) przy niedoborze siarki w glebie. Jest to o tyle niezrozumiałe, że ω -prolaminy pozbawione Cys nie mogą tworzyć ani wewnątrz ani międzyłańcuchowych wiązań -S-S-, a więc uczestniczyć w tworzeniu kowalencyjnych struktur polimerów glutenu. Dlatego rola tej frakcji białek ziarniaków w tworzeniu cech jakościowych jest nadal zagadkowa.

Białka prolaminowe bogate w siarkę (+) (S+)

Z rysunku 1 wynika, że do białek bogatych w S należą prolaminy monomeryczne typów: α -, β - i γ - oraz oligomeryczne zwane frakcją małowcząsteczkową (LMW). Stanowią one największą grupę, gdyż ich zawartość sięga 80% białek glutenowych. Ze względu na znaczną zawartość reszt Cys są one zdolne do tworzenia licznych wiązań -S-S-, jednak białka monomeryczne (prolaminy α -, β - i γ) mogą w zasadzie tworzyć tylko wiązania wewnątrzłańcuchowe, a białka oligomeryczne (LMW) — zarówno wewnątrz, jak i międzyłańcuchowe. Monomery tej grupy białek mają M_r w granicach 36–44 kDa, a wyjątkiem jest γ -sekalina żyta, której jedna frakcja ma masę 75 kDa. Wreszcie, wszystkie białka tej grupy wykazują podobne struktury podstawowe z bogatą w Pro powtarzalną domeną N-końcową oraz domeną C-końcową zawierającą wszystkie (lub prawie) reszty Cys. Domena powtarzalna jest zwykle poprzedzona od N-końca krótkim fragmentem różnicującym (np. sygnałowym). Struktura podjednostkowa typowych białek pszenicy S+ jest podana na rysunku 3 (Shewry, Tatham, 1990).

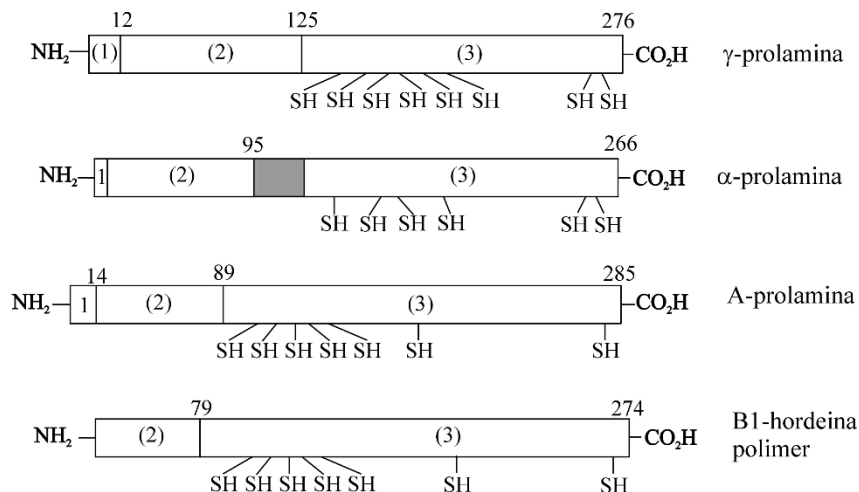
Podjednostki monomeryczne - α -, β - i γ -prolaminy pszenicy γ -Prolaminy

Najbardziej rozpowszechnione w naturze są białka typu γ -prolamin, gdyż oprócz zbóż występują w nasionach licznych traw łąkowych; grupa ta jest ewolucyjnie najstarsza. Główny motyw sekwencji powtarzalnej stanowi heptapeptyd: Pro-Gln-Gln-Pro-Phe-Pro-Gln (113 aminokwasów), a ubogie w Pro sekwencje (151 aminokwasów) zawierają wszystkie reszty Cys, w którą białka te są szczególnie bogate. Większość γ -prolamin ma charakter monomerów, ale spotyka się też oligomery. Zgodnie z oczekiwaniami struktura powtarzalna ma konformację β -helikalną, a C-końcowa — α -helikalną i stabilną. Wynika stąd, że struktura γ -prolaminy jest bardziej zwarta, niż ubogie w S ω -prolaminy; bardzo podobne struktury wykazano dla γ -sekalin żyta oraz C-hordeiny jęczmienia.

Rola γ -prolamin w kształtowaniu cech reologicznych białek glutenu (i ciasta), mimo intensywnych badań fizycznych nad kształtem i wielkością cząsteczek (Thomson i in., 1999) oraz chemiczno-technologicznych (Uthayakumaran i in., 2001) nie została jednoznacznie wyjaśniona. Sugeruje się, jednak, że prolaminy typu γ mogą być odpowiedzialne za obniżanie maksimum rezytencji, ale podwyższenie czasu rozwoju i siły ciasta, jednak wnioski te oparto na pozytywnych korelacjach (Field i in., 1987). Z drugiej strony frakcja γ najsilniej emulgowała spośród frakcji monomerycznych i wykazywała największą stabilność emulsji, a także zdolność pienienia i stabilność piany; parametry te były nawet większe, niż u ω -prolamin. Zachowania te, a także wynikające z pomiarów spektralnych (CD i w niskokątowym promieniowaniu X) oraz z obecności domen powtarzalnych bogatych w Pro i Gln, potwierdzają udział struktur β -helikalnych w tworzeniu charakterystycznych właściwości visko-elastycznych, typowych dla białek elastomerycznych. Ponadto, zawartość licznych reszt Cys w strukturach γ -prolaminowych stwarza możliwość powstawania międzylańcuchowych wiązań -S-S- (m.in. z peptydami innych typów). Również obecność licznych aminokwasów o łańcuchach niepolarnych (Leu, Val, Ile) prowadzi do powstania sił hydrofobowych i możliwości kompleksowania cząsteczek z ich udziałem, co wykazano już dawno (Dałek-Zawistowska i in., 1975). Nie wyjaśniono dotychczas, w jakim stopniu udział cząsteczek typu γ w tworzeniu kompleksów glutenowych jest przypadkowy, a w jakim kontrolowany.

Prolaminy typu α - i β -. Istnieje w zasadzie mało informacji dotyczących prolamin typu β , a znacznie więcej - typu α ; obecnie obie frakcje omawia się razem jako α -prolaminy, a typ β jest pojęciem historycznym (Tatham, Shewry, 1990). Frakcja ta występuje przypuszczalnie tylko w pszenicy i nie jest spotykana w białkach jęczmienia i żyta. Organizacja struktury monomerycznych cząsteczek typu α jest podobna do typu γ (rys. 3), jednak regiony powtarzalne są w mniejszym stopniu zakonserwowane i składają się z rozrzuconych motywów Pro-Gln-Pro-Gln-Pro-Phe-Pro oraz Pro-Gln-Gln-Pro-Tyr. Ponadto jednak region C-końcowy zawiera sekwencje poli-Gln. Spokrewniona z tymi strukturami jest tzw. A-gliadyna, która powstaje przez agregację cząsteczek α przy pH około 5,0 i w 5 mM KCl. W tych warunkach tworzy ona włókna o średnicy 8 nm. Włókna te dysocjują do podjednostek wykazujących konformację α -helikalną w około 34%; białko to ma kształt globularny o stosunku osiowym 3,4:1.

Peptydy pozyskiwane z A-prolaminy mają w regionie N-końcowym, zgodnie z przewidywaniem, konformację β -helikalną w przewodzie, nieco struktury α -heliksu, pasmowej β oraz nieuporządkowanej. Co prawda konformacja β jest mniej uporządkowana w porównaniu np. z γ - i ω -prolaminami, co sugeruje małe prawdopodobieństwo tworzenia w ich strukturach regularnego β -heliksu. Natomiast region C-końcowy, podobnie do uprzednio omawianych frakcji, ma w znacznej przewodzie struktury α -helikalne.



Rys. 3. Schemat porównujący struktury I-rzędowe ważniejszych S(+) prolamin; (1), (2) i (3), jak w rys. 2; strefa zaciemniona w α -prolaminie — region poli-Gln (Shewry, Tatham, 1990)

Fig. 3. Schematic comparison of primary structures of most important S(+) prolamins; (1), (2) and (3), as in Fig. 2; the darkened region in α -prolamin — poly-Gln sequence (Shewry, Tatham, 1990)

Małocząsteczkowe, oligomeryczne składniki bogate w siarkę (LMW)

Frakcja LMW-glutenin występuje w ziarniakach jęczmienia jako hordeina B oraz pszenicy — jako LMW-glutenina (prolamin II). Składa się ona z wielu typów podjednostek podstawowych łączących się w kompleks z udziałem międzylańcuchowych wiązań -S-S-. Różnica między tą frakcją, a omówioną wcześniej frakcją HMW-glutenin polega na większej ruchliwości elektroforetycznej podjednostek podstawowych. Przez redukcję frakcji LMW lub depolimeryzację w SDS uzyskuje się znacznie więcej indywidualnych jednostek (Altenbach, 1998). Frakcja ta doczekała się intensywnych prób charakteryzacji (m.in. u gatunków prymitywnych), wykazania genów je kodujących (Masci i in., 1998; Lee i in., 1999), a także mechanizmów biosyntezy.

Podjednostki S(+) polimerycznych prolamin (LMW) pszenicy zawierają z reguły krótką sekwencję niepowtarzalną przy N-końcu (która może zawierać 1 cząsteczkę Cys dołączoną do domeny powtarzalnej bogatej w Pro i Gln), złożoną zwykle z motywów hepta- lub oktapeptydowych, ułożonych w rozrzuceniu. Poszczególne podjednostki wykazują znaczne zróżnicowanie tych sekwencji; wykryto ich dotychczas ponad 40, a szczególnie wiele izolowano z prymitywnych form pszenicy (np. *Tr. boeoticum*, *Tr. urartu*). Do częściej spotykanych należą motywy: Pro-Gln-Gln-Pro-Pro-Pro-Phe-Ser oraz Gln-Gln-

Gln-Gln--Pro-Val-Leu. Widmo CD podjednostek jest w zasadzie podobne do α - i γ -prolamin: od C-końca zgromadzone są struktury o konformacji α -heliksu (ok. 35%), a od N-końca — typowe układy β -helikalne. Te ostatnie wydają się mniej regularne i przypominają bardziej struktury α - niż γ -prolaminy, gdyż ta ostatnia ma bardziej sprecyzowane domeny o skręcie β . Wspomniana różnorodność motywów powtarzalnych charakteryzuje się znaczną ilością Gln (30–50% mol) i Pro (10–30% mol), a przynajmniej w części występuje His, Val, Leu, Ser, Phe, co wskazuje na różnice w ich polarności. W domenach powtarzalnych mogą występować również (1 lub kilka) reszty Cys (p. dalej).

Trudności w badaniu struktury podjednostek i kompleksów LMW-glutenin wynikały z wielości ich rodzin genowych kodujących je, z niedoskonałych metod oczyszczania i z mniejszej rozpuszczalności niektórych podjednostek (Cassidy i in., 1998). Po zastosowaniu nowych procedur podzielono frakcje LMW na 2 typy podstawowe: LMWs i LMWm, przyjmując za podstawę sekwencję aminokwasów N-końcowych: typ s ma sekwencję Ser-His-Ile-Pro-Gly-Leu, a typ m - Met-Glu-Thr-Ser-His-Cys-Arg-Ile-Pro-Leu. Pierwszy typ (s) jest w przewodzie i ma większą M_r (35–45 kDa); a typ m ma tę wartość o większym rozrzucie (30–45 kDa), a jego podtyp histydynowy jest głównym takim składnikiem w odmianach hodowlanych. Najrzadziej występuje podtyp cysteinowy (Lew i in., 1992). Szczególnie interesujące są podjednostki zawierające Cys w pozycji 5 podtypu m, gdyż mają one dodatkową możliwość tworzenia międzylańcuchowego wiązania -S-S-, mimo że spotykana jest najrzadziej spośród izolowanych struktur (Masci i in., 1998); mogą one zawierać nawet 2 reszty Cys. Zależnie od liczby reszt Cys może ona oddziaływać pozytywnie lub negatywnie na wiskoelastyczne właściwości glutenu. Niezależnie od obecności Cys w regionie N-końcowym, stwierdzono resztę(y) tego aminokwasu w regionie sekwencji powtarzalnych obu typów (s i m — D'Ovidio, 1993).

Znaczne podobieństwo do LMW-gliadyn wykazuje B-hordeina jęczmienia, którą zbadano w większym stopniu w zakresie struktury i kodujących genów; również u niej wykazano znaczny polimorfizm monomerów, obejmujący także sekwencje motywów powtarzalnych, mas cząsteczkowych i wartości pI.

Tworzenie układów złożonych białek zapasowych pszenicy

Struktury elastomeryczne białek naturalnych

Białka elastomeryczne są spotykane często w tkankach zwierzęcych, gdzie dzięki swej konstrukcji pełnią istotne funkcje fizjologiczne. Odznaczają się one elastycznością i sprężystością, pozwalającymi na znaczne deformacje bez rozrywania cząsteczek, a więc są zdolne do gromadzenia energii pobieranej przy deformacji i odzyskiwanej przy powrocie do konformacji wyjściowej (Tatham, Shewry, 2000). Drugi etap przemiany ma tu charakter pasywny i nie wymaga dostarczania energii. Do typowych białek zwierzęcych należą np.: abduktyna współdziałająca u ślimaków w sprężystym zamykaniu okryw, białka jedwabiu i pajęczyny, elastyna naczyń krwionośnych, czy skóry oraz konnektyna (tytyna), odpowiedzialna za sprężystość miofibryli w mięśniach kręgowców, i inne. U roślin białka elastomeryczne spotykane są rzadziej i wyróżnia się wśród nich: ekstensynę, odpowiedzialną za sprężystość ścian komórkowych oraz białka zapasowe zbóż

(glutenowe), których właściwości elastyczne są eksploatowane w przemyśle piekarskim (Shewry, Tatham, 1990).

Zdolność białek do eksponowania właściwości gumowato-elastycznych odnosi się do ich struktury polimerycznej, przy czym muszą one spełniać 2 kryteria:

- 1. poszczególne monomery winny być giętkie i konformacyjnie swobodne (aby mogły reagować szybko na przyłożoną siłę,
- 2. monomery winny być usieciowane tworząc trójwymiarowy polimer; wiązania sieciujące mogą być kowalencyjne lub niekowalencyjne. Większość białek elastomerycznych łączy w swych cząsteczkach elastyczne domeny w monomerach z domenami zdolnymi do sieciowania. Dlatego viskoelastyczne właściwości białek winny być zależne od długości i cech domen elastycznych oraz stopnia ich usieciowania (Tatham, Shewry, 2000; Parchment i in., 2000). O ile kompleksy są trudno rozpuszczalne w wodzie, to podjednostki — zwłaszcza w regionach powtarzalnych, są rozpuszczalne, gdyż w miarę depolimeryzacji i rozpadu wiązań wodorowych uwalniają się (tworzą się wiązania wodorowe między białkiem (Gln) i wodą.

Z badań Fielda i wsp. (1987) oraz Miles i wsp. (1991) wynika, że prawie wszystkie białka występujące w kompleksie glutenowym spełniają (choćby częściowo) założenia struktur białek elastomerycznych. Wykazano zwłaszcza, że znaczną część łańcucha podjednostek (monomerów) stanowią mniej lub bardziej regularne motywy powtarzalne zdolne do przyjmowania drugorzędowej struktury β -helikalnej, oraz że im bardziej uporządkowane i im dłuższe są te regiony, tym większy wpływ na elastyczność może mieć dana cząsteczka. Sekwencje powtarzalne w monomerach różnych frakcji glutenu pszennego różnią się budową motywów, ich ułożeniem i długością, ale wszystkie przyjmują podobną strukturę II-rzędową w formie lewoskrętnej β o różnym stopniu skręcenia. Skręcenie to jest określonym stanem równowagi między skrętem oraz modelowym skręceniem poli-L-proliny typu II. Stopień tej równowagi zależy od temperatury, rodzaju rozpuszczalnika oraz stopnia uwodnienia (Tatham, Shewry, 1995). Sugeruje się, że stan tej równowagi, przynajmniej w niektórych frakcjach glutenu, ma zasadnicze znaczenie dla właściwości viskoelastycznych glutenu; np. we frakcji HMW-gluteniny; jej zmiana dokonuje się zależnie od stopnia utlenienia grup -SH do wiązań -S-S-, a więc stopnia usieciowania polimeru.

Siła tworzenia stanu elastyczności wynika ze spadku entropii przy rozciąganiu i zostaje wyzwolona przy zniesieniu naprężenia. Co prawda badania w NMR wskazują, że mechanizm entropii w pełni pasujący do działania elastyny, jako elastomeru, wykazuje dla białek HMW-gluteniny pewne odchylenia, które wymagałyby uściślenia (Belton i in., 1994).

Wiązania disulfidowe -S-S- a struktura białek glutenu

Wiadomo od dawna, że wiązania disulfidowe (-S-S-) tworzące się pomiędzy grupami -SH reszt Cys w warunkach utleniających, są jednym z głównych elementów struktury białek glutenowych pszenicy i innych zbóż (Bloksma, 1973; Kączkowski, Bernacka-Mieleško, 1980). Między innymi, na podstawie ich poziomu podzielono frakcje wchodzące w skład kompleksu glutenowego na: bogate w S (S+) - α -, β - i γ -prolaminy oraz frakcja LMW), ubogie w S (S-) — ω -prolaminy oraz HMW-gluteniny — o pośrednim

poziomie S. Wspomniano też o podziale na składniki monomeryczne oraz oligo(poli)meryczne (frakcje LMW i HMW). Pierwsze z nich: α - i γ -prolaminy mogą tworzyć wiązania -S-S- w obrębie jednego łańcucha (wewnątrzłańcuchowe) i nie są zdolne do polimeryzacji, natomiast frakcje LMW i HMW tworzą zarówno wewnątrz- jak i międzyłańcuchowe wiązania -S-S-. Te ostatnie są wtedy podstawą tworzenia struktur polimerycznych (usięciowanych). Pewnym odstępstwem jest tu zdolność kompleksowania monomerycznej γ -prolaminy z białkami innych frakcji, np. LMW — również z udziałem międzycząsteczkowych wiązań -S-S- (Dałek-Zawistowska i in., 1975; Lew i in., 1992). Kilka takich zespołów — tym razem γ -prolamin z jednostkami HMW uzyskano w pracowni Wiesera (Koechler i in., 1993).

Wykazano np., że γ -prolaminy zawierają 8 reszt Cys w domenie C-końcowej niepowtarzalnej, w znacznym skupieniu; 6 analogicznie zlokalizowanych reszt Cys występuje również w α -prolaminie. Mało informacji uzyskano dotychczas o strukturach LMW, jakkolwiek wiadomo o występowaniu w ich składzie 3 typów monomerów (na podstawie ruchliwości w SDS-PAGE) — B, C i D, z których ostatni jest, przeciwnie do pozostałych, ubogi w Cys. Najbardziej rozpowszechniony jest typ B o zakresie M_r 40–50 kDa (Lew i in., 1992). Właśnie z tego typu wyodrębniono frakcje LMWm i LMWs, wspomniane wyżej. Wszystkie frakcje LMWm zawierają po 6 reszt Cys, zlokalizowanych w miejscach analogicznych, jak w γ -prolaminie; ich sekwencja (wyznaczona na podstawie wyizolowanego cDNA) zawiera ponadto w regionie niepowtarzalnym 3–4 dalsze reszty Cys. Sądzi się, że właśnie one są aktywne w powstawaniu polimerów przez tworzenie wiązań -S-S-. Jednostki typu D, jak wspomniano, ubogie w Cys, okazały się pod wieloma względami podobne do frakcji ω -prolaminy, która może zawierać 1 resztę Cys, a więc kompleksować np. z białkami LMW.

Najbardziej złożoną budowę i największe zainteresowanie badaczy wykazuje bardzo zróżnicowana i polimeryczna frakcja HMW o rozbudowanej strukturze IV-rzędowej. Jak wspomniano, w ich budowie występują 2 typy monomerów: x i y o specyficznych sekwencjach motywów powtarzalnych. Wszystkie mają 3 podobne domeny: N-końcową (84–104 reszty aminokwasów), C-końcową (42 reszty) oraz bardzo rozbudowany region powtarzalny (481–681 reszt). Monomery typu y zawierają 6 reszt Cys, z których 5 jest wbudowanych w region N-końcowy, a 1 — w C-końcowy. Dodatkowa reszta Cys jest wbudowana w pobliżu C- lub N-końca strefy powtarzalnej (zależnie od pochodzenia genetycznego monomerów). Reszta Cys bliżej N-końca obecna w monomerze 1Dx5 wydaje się szczególnie aktywna w sieciowaniu kompleksów glutenowych, gdyż jej obecność wiąże się ze znaczną poprawą wartości wypiekowej pszenicy. Monomery typu x zawierają o 2 reszty Cys mniej, niż typu y (brak Cys-3 i Cys-4), natomiast pozostałe reszty Cys ze stref niepowtarzalnych stwierdzono we wszystkich izolowanych dotychczas monomerach. Jednak w niektórych, reszty Cys-2 i Cys-5 są podstawione resztami Tyr (np. w monomerze 1Bx20 typowym dla *Tr. durum*), co znacznie osłabia jej zdolność sieciowania. Warto wreszcie zwrócić uwagę, że wbudowanie reszt Cys w sekwencje niepowtarzalne jednostek HMW jest podobne do γ -prolaminy (np. w SC4 i SC5 w układzie Met-Arg-CysCys-Gln-Gln-Leu w HMW i Gln-Gln-Cys-Cys-Gln-Gln w γ -gliadynie. Wiadomo, że reszty Cys obecne w łańcuchach peptydowych monomerów

mogą uczestniczyć w tworzeniu wiązań wewnątrz- lub międzycząsteczkowych. Na podstawie hydrolizy monomerów specyficznymi peptydazami i analizy uzyskanych peptydów (Koch i in., 1995) określa się reszty Cys uczestniczące w tworzeniu jednego lub drugiego typu wiązań -S-S- (Koechler i in., 1991; Tao i in., 1992). Przy użyciu tej metody uzyskano po raz pierwszy bezpośredni dowód na tworzenie kompleksów między γ -prolaminami i kompleksami HMW. W podobny sposób wykryto 1 przypadek tworzenia wiązań -S-S- pomiędzy dwoma określonymi monomerami pochodzącymi z frakcji LMW i HMW, co wskazuje, że również taka interakcja jest możliwa.

Wiele badań prowadzono w kierunku wyjaśnienia stopnia specyficzności tworzonych sieciujących wiązań -S-S- (przegląd - p. Veegels i in., 1996; Shevry, Tatham, 1997). Na podstawie szczegółowych danych można ustalić, że udział poszczególnych reszt Cys w tworzeniu tych wiązań jest specyficzny, nie tylko pod względem wewnątrz- lub międzycząsteczkowego ich charakteru, ale w przypadku tych drugich — również pomiędzy określonymi typami podjednostek. To ostatnie dotyczy zresztą nie tylko ich przynależności frakcyjnej (HMW, LMW, γ -prolamin), ale również drobniejszych różnic między nimi, wynikających zarówno z rodzaju genomu, jak i lokalizacji określonych genów kodujących te podjednostki. Wydaje się jednak, że nie wszystkie kryteria uzyskiwanych wyników mogą prowadzić do jednoznacznych wniosków (np. reologia ciasta i glutenu, wartość wypiekowa — Rogers i in., 1991; Bekes i in., 1994), a wielość możliwości kompleksowania monomerów jest ogromna, więc uzyskanie w tym zakresie ścisłych mechanizmów, nie wydaje się w najbliższym czasie możliwe. Istotne natomiast jest stwierdzenie udziału w tworzeniu frakcji HMW zarówno monomerów typowych dla niej, jak i jednostek typowych dla LMW, czy nawet struktur monomerycznych - γ - lub nawet α -prolamin (Koechler i in., 1993; Shani i in., 1992). Te stwierdzenia dodatkowo zwiększyły liczbę możliwych monomerów, które mogą uczestniczyć w budowie wielkich kompleksów glutenowych tworzących się w ziarniakach zbóż.

Tworzenie wiązań niekowalencyjnych

Przy okazji dyskusji nad sieciowaniem cząsteczek, w wyniku którego tworzą się kompleksy białkowe, warto wspomnieć o innej możliwości kompleksowania. Ukazały się dane wskazujące na udział transglutaminazy (R-glutaminylo-peptydo-aminoglutamylotransferazy — TG — EC 2.3.2.13) w modyfikowaniu struktury białek; początkowo dotyczyły one leguminy grochu (1993), a ostatnio białek glutenu pszennego (Larre i in., 2001, Koeksal i in., 2001). Transglutaminaza może katalizować związanie białka rozpuszczalnego z nierozpuszczalnym, polimeru HMW, na skutek tworzenia innych niż -S-S- wiązań sieciujących, między γ -amidową grupą Gln i ϵ -aminową grupą Lys. Ściślej — enzym katalizuje przeniesienie acylu między związaną peptydowo resztą Gln oraz aminami I-rzędowymi. Gdy grupy ϵ -aminowe Lys związanej peptydowo działają jako akceptory acylów, tworzą się wewnątrz- lub międzyłańcuchowe wiązania izopeptydowe - ϵ -(γ -glutamylolizynowe). Szczególnie podatne na rodzaj sieciowania są białka glutenu pszenicy bogatego w Gln. Wykazano pozytywny wpływ zwiększonej aktywności TG na poprawę właściwości reologicznych białka i ciasta, przy czym równoczesny dodatek Lys miał działanie dodatnie dwójakie — jako jeden z substratów reakcji TG, a dodatkowo — jako uzupełnienie najbardziej deficytowego aminokwasu egzogenego. Na tej zasadzie dają się

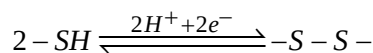
zresztą dodatkowo kompleksować z glutenem niektóre białka zwierzęce (Motecki, Nio, 1983), co znajduje zastosowanie w żywieniu. System ten może też przeciwdziałać szkodom przedżniwnym wywołanym przez żółwinka zbożowego (*Eurygaster maura*) lub lednicę zbożową (*Aelia* sp.) — oba z rodziny pluskwiaków, których enzymy proteolityczne znacznie obniżają wartość technologiczną mąki. Jednak mało jest dotychczas informacji teoretycznych o sieciowaniu tego typu.

Formowanie i rozkład wiązań -S-S- w białkach zapasowych

Istnieją dyskusje o celowości fizjologicznej tworzenia w ziarniakach zbóż białek elastomerycznych, wykazujących dwa zasadnicze elementy, komplikujące w znacznym stopniu strukturę ich cząsteczek: giętkość i plastyczność ich monomerów oraz wysoki stopień usieciowania z udziałem kowalencyjnych wiązań -S-S-. Jedyną dotychczas poznaną funkcją białek zapasowych nasion (w tym ziarniaków zbóż) jest tworzenie rezerwy kompletu aminokwasów, które po hydrolizie białek, towarzyszącej kiełkowaniu, stanowią substrat azotowy dla rozwijającego się zarodka. Jedyną nasuwającą się sugestią wyjaśniającą tę zagadkę są końcowe etapy syntezy białek zapasowych ziarniaków, m.in. upakowanie powstających cząsteczek w tzw. ciałach białkowych (co chroni je przed proteolizą we wczesnej fazie dojrzewania) oraz rozkład tych ciał z uwolnieniem białek w celu ich dalszej obróbki przy dojrzewaniu (Kączkowski, 2000). Uznano, że upakowanie w ciałach białkowych winno być bardzo efektywne, tzn. zwarte i proces ten wymaga znacznej elastyczności cząsteczek białkowych (Shewry, Tatham, 1997).

Białka uwolnione z ciał białkowych (ulegających rozkładowi), ok. 40 dni po zapyleniu podlegają stabilizacji w stosunku do czynników chemicznych i enzymów w celu przechowania ich w tym stanie do momentu kiełkowania ziarniaków. Zanim jednak rozpocznie się ich proteoliza, musi nastąpić redukcja sieciujących je wiązań -S-S-, co powoduje depolimeryzację do monomerów i dostępność wiązań peptydowych dla peptydaz.

W ostatnich latach wykazano, że zarówno w procesie utleniającym, jak i w redukcyjnym, rozpoczynającym kiełkowanie uczestniczy poznany wcześniej (Buchanan, 1980), a wykazany również w ziarniakach w latach 90-ych przenośnik elektronów i protonów — tioredoksyna — TR (Kobrehel i in., 1992), który pośredniczy jako ich dawca lub akceptor w przemianie odwracalnej.



Udział tego przenośnika w przemianach roślinnych, a m.in. polimeryzacji i depolimeryzacji białek glutenowych ziarniaków zbóż opisano w przeglądach (Meyer i in., 1999; Kączkowski, 2000, 2001).

Znane są obecnie 3 formy tioredoksyny: f, m i h, z których tylko ostatnia (TR h) cytosolowa uczestniczy w oksydoredukcyjnych przemianach białek glutenowych; opisano dotychczas 5 form strukturalnych TR h oraz kilka związków o podobnych strukturach. Jak podano uprzednio (Kączkowski, 2001) TR h jest niewielkim białkiem (ok. 13,4 kDa) zawierającym aktywną sekwencję Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-, której 2 grupy -SH pośredniczą w przekazywaniu protonów i elektronów. Należy przypomnieć, że TR h działa w układzie kaskadowym i w zasadzie odwracalnym. W kierunku redukcyjnym układ ten czerpie H^+ i e^-

z NADPH i są one przenoszone kolejno przez FAD, reduktazę tioredoksyny (TRR) i TR, z której są przekazywane na akceptor końcowy przez specyficzną reduktazę. Jednym z akceptorów są właśnie wiązania -S-S- sieciujące kompleksy białkowe dojrzałej pszenicy; w wyniku redukcji następuje depolimeryzacja białek (Gobin i in., 1996). Warto przypomnieć, że NADPH jako „równoważnik redukcyjny” w przemianie materii powstaje dwiema drogami: w organizmach zdolnych do fotosyntezy w chloroplastach w fosforylacji fotosyntetycznej niecyklicznej, a w pozostałych - w wyniku bezpośredniego utlenienia glukozy w cyklu fosforanów pentoz. System redukcyjny TR/NADPH okazał się równocześnie wysoce specyficzny do redukcji wiązań -S-S- w białkach glutenowych (Kobrehel i in., 1992), a także, że TR h stanowi wczesny (pierwotny?) sygnał dla kiełkowania (Lozano i in., 1996; Kobrehel, Buchanan, 1997). Obie obserwacje potwierdzają specyficzną rolę TR h w redukcji wiązań -S-S- w białkach zapasowych zbóż.

Stwierdzono równocześnie, że kiełkowaniu ziarniaków zbóż i redukcji wiązań -S-S- w białkach glutenu towarzyszy dezaktywacja białkowych inhibitorów hydrolaz, których obecność dodatkowo stabilizuje białka i skrobię w dojrzałych ziarniakach. Są to znane od wielu lat małowcząsteczkowe białka hamujące aktywność trypsyny (I'jao i in., 1992), np. sojowy inhibitor Kunitza, Bowmana-Birka, a także inhibitor α -amylazy/subtylizyny obecny w ziarniakach zbóż (Kobrehel, Buchanan, 1991). Synchronizacja procesu kiełkowania z redukcją wiązań -S-S- w białkach zapasowych o zniesienie zahamowania aktywności hydrolaz przez redukcję wiązań -S-S- w inhibitorach z udziałem TR h wydaje się w pełni logiczna i może stanowić jeden z czynników regulacyjnych, tym bardziej, że białkowym inhibitorom hydrolaz występującym w zewnętrznych warstwach okrywy owocowo-nasiennej, przypisuje się również funkcję fizjologiczną ochrony ziarniaków przed trawieniem w przewodzie pokarmowym zwierząt w warunkach naturalnych (gdy ziarniaki nie są uszkodzone mechanicznie).

Ostatnio wykazano również udział TR h w dojrzewaniu białek zapasowych ziarniaków, a więc działanie w kierunku odwrotnym do opisanego wyżej (Gobin i in., 1997). Wtedy system współdziałający z TR h odbiera protony i elektrony z grup -SH Cys wmontowanej w łańcuchy peptydowe i tworzą się wiązania -S-S-, zarówno wewnątrz- jak i międzycząsteczkowe. Powstawanie tych ostatnich (sieciujących) powoduje polimeryzację monomerów i wytwarzanie kompleksów. Tworzenie ich zwiększa stabilność cząsteczek w stosunku do rozpuszczalników i enzymów np. peptydaz, przez maskowanie wiązań peptydowych. System działający w tym kierunku okazał się też specyficzny w stosunku do białek glutenowych, nie działał np. na grupy -SH Cys wbudowanej w peptydy albumin i globulin. Na ile specyficzne jest atakowanie reszt Cys w zależności od ich lokalizacji, nie zostało dotychczas wyjaśnione. Wykazano wreszcie obiektywną możliwość przebiegu utleniania grup -SH, gdyż maksymalne stężenie TR h i współdziałających z nią reduktaz, przypada na okres od 40 dnia po zapyleniu, gdy ciała białkowe (w których jednostki monomerów były upakowane), zaczęły się rozkładać, uwalniając białka. W tym czasie wysoki stopień uwodnienia i znaczna aktywność proteolityczna stwarzały odpowiednie warunki dla proteolizy zredukowanych monomerów. Dlatego ich utlenianie i polimeryzacja mają istotne znaczenie zabezpieczające.

Białka zbóż a celiakia

Celiakia jest chorobą uwarunkowaną genetycznie polegającą na uczuleniu na prolaminę ziarna zbóż. Pod ich wpływem następuje uszkodzenie śluzówki jelita cienkiego. Skutkiem tego powstają istotne zmiany histologiczne kosmków jelitowych oraz niewydolność trawienia i związane z tym skutki (Tatham, Shewry, 1995). Mechanizm działania prolaminy jako alergenu wywołującego celiakię, nie został wyjaśniony, a główna uwaga badaczy była początkowo zwrócona na α - i β -prolaminę. Badania dotyczyły głównie peptydów uzyskiwanych w hydrolizie oczyszczonych frakcji prolaminy przez enzymy trawienne; okazało się, że frakcja o M_r 7–8 kDa uzyskiwana z wszystkich prolaminy: α -, β -, γ - i ω - (Vu., Popineau, 1987) były równie aktywne, podobnie, jak frakcje niehydrolizowane (znaczną aktywnością odznaczał się również inhibitor α -amylazy/subtylizyny, izolowany z pszenicy (Simonato i in., 2001). Odpowiedzialne peptydy zawierały znaczne ilości Pro i Gln, a często powtarzanymi motywami w ich sekwencjach były: Pro-Ser-Gln-Gln oraz Pro-Gln-Gln-Pro-; ten drugi stwierdzono w domenach powtarzalnych sekwencji uzyskanych z białek ubogich w S (ω -prolaminę). Tanabe i wsp. (1996) wykazali, że pentapeptyd Gln-Gln-Gln-Pro-Pro stanowił minimalną strukturę pierwotną epitopu wiążącego immunoglobulinę E (IgE), a jego N-końcowa reszta Gln i dwie reszty Pro były zasadnicze dla pełnienia funkcji epitopu. Dołączenie reszty acetylowej do wymienionego peptydu od N-końca dodatkowo wzmacniało efekt alergiczny u pacjentów z celiakią. Z rozważań tych wynika, że proteoliza wszystkich monomerycznych frakcji białek glutenowych prowadzi do powstania oligopeptydów o działaniu alergicznym, natomiast rozpad frakcji HMW i LMW nie prowadzi do takiego efektu. Przedstawiona właściwość immunologiczna pozwoliła na opracowanie metod oznaczania obecności glutenu w produktach żywnościowych (ważnych w żywieniu pacjentów uczulonych na białka pszenicy). Polegają one na reakcji precypitacji przeciwciała poli- lub monoklonalnego (Kączkowski i in., 1985) oraz bardziej precyzyjnej ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

W uzupełnieniu należy wspomnieć o informacji wskazującej, że ograniczona redukcja białka przez TR h powoduje obniżenie toksycznego działania produktów trawienia białek pszenicy (Buchanan i in., 1997). Być może, poprzedzająca redukcja wiązań -S-S- wpływa na zmienioną kolejność hydrolizowanych wiązań peptydowych, co może prowadzić do tworzenia peptydów o innej sekwencji aminokwasów i o mniejszym powinowactwie do IgE.

FUNKCJE FRAKCJI BIAŁEK ZAPASOWYCH ZBÓŻ W KSZTAŁTOWANIU WŁAŚCIWOŚCI WISKOELASTYCZNYCH CIASTA

Jak wspomniano, jedyną uznawaną funkcją białek zapasowych ziarniaków zbóż jest przechowanie niezbędnych aminokwasów i ich dostarczenie przy kiełkowaniu i rozwoju ziarniaków. Z drugiej strony, większość frakcji wchodzących w skład glutenu ma strukturę typową dla białek elastomerycznych, tzn. odpowiedzialną za giętkość i elastyczność podjednostek w roztworze (związaną z β -helikalnymi domenami powtarzalnymi) oraz możliwość usieciowania licznych monomerów w wielkocząsteczkowe twory (np. międzycząsteczkowymi wiązaniami -S-S-). Dlatego dyskusowanie o funkcjach składników

glutenu ma w zasadzie aspekt użytkowy, a nie fizjologiczny. Jak wiadomo, te charakterystyczne cechy struktury białek są wykorzystywane w praktyce piekarskiej i pokrewnych, a także w tworzeniu mas plastycznych, kompleksowania z innymi białkami itp.

Struktury elastyczne, rozciągliwe i o znacznej lepkości tworzą się w kontakcie z wodą i są zdolne do zatrzymywania CO₂ fermentacyjnego (wyrastanie ciasta), a rozciągnięta porowata struktura ulega utrwaleniu w czasie pieczenia. Stopień wyrośnięcia i trwałości ciasta wynika, jak wspomniano, z długości i zwartości (regularności) struktur β -helikalnych (powtarzalnych) oraz stopnia usieciowania kompleksów, tzn. ilości (i rozmieszczenia) tworzących się międzylańcuchowych wiązań -S-S- (i ew. innych). Wartości tych parametrów są niejednakowe w poszczególnych frakcjach glutenu, jak i podjednostkach kontrolowanych przez różne geny, a nawet w miejscach lokalizacji (*loci*) w genach. Każda z frakcji składa się z zespołu monomerów, w zasadzie bardzo podobnych, ale nieco zróżnicowanych między sobą. Dlatego określenie funkcji tych frakcji w sposób precyzyjny, jest trudne, tym bardziej, że metody oznaczania wartości reologicznych ciasta i wskaźnik ostateczny, czyli wypiek laboratoryjny (zwłaszcza na małych próbach 2–10 g mąki), nie są dokładne. W doświadczeniach z dodawaniem, czy podstawianiem badanego składnika (np. Finney i in., 1982) oraz jego odziedziczalności, bierze się też pod uwagę, że poszczególne grupy białek mogą wykazywać zróżnicowane współdziałanie z innymi składnikami, czy warunkami.

Funkcje HMW-glutenin

W badaniach i dyskusjach dotyczących funkcji poszczególnych frakcji białek glutenowych, właśnie ta frakcja jest uważana za najbardziej aktywną w kreowaniu cech reologicznych ciasta i jakości pieczywa. Uważa się ostatnio, że spełniają one w największym stopniu wymogi strukturalne dla białek elastomerycznych (Tatham, Shewry, 2001). Wiadomo jednak, że monomery budujące kompleksy HMW są kodowane we wszystkich genomach i w większej liczbie miejsc i są zróżnicowane strukturalnie, a więc i pod względem cech wprowadzanych przez ich udział w kompleksie ((jest znanych ponad 20 ich rodzajów). Dlatego wielu badaczy skłania się do poglądu, że nie skład podjednostkowy, ale procentowy udział frakcji HMW w białkach zapasowych ziarniaków ma zasadniczy wpływ na właściwości reologiczne i jakość pieczywa (Seilmeier i in., 1991; Gianibelli i in., 2001). Co prawda w licznych badaniach powtarzają się stwierdzenia, że dodatek np. podjednostek 1Dx5 czy 1Dy10 ma wpływ pozytywny na wskaźniki jakości, a np. 1By8, czy 1Dy12 — ma wpływ negatywny. Wiadomo jednak, że nie pojedyncze podjednostki, ale struktury dimeryczne kontrolowane przez geny alleliczne, np. 1Dx2 — 1Dy12, czy Dx5 - Dy10 mają zasadniczy wpływ na zmienność jakościową kompleksu (Payne, Lawrance, 1983; Cassidi i in., 1998; Ahmed, 2000). Z drugiej strony, nie tylko ilość, czy obecność określonych podjednostek ma wpływ na parametry jakościowe, ale również zdolność do polimeryzacji, np. podjednostki D5+10 mają w kompleksie wpływ na większy stopień polimeryzacji, a 2–12 na mniejszy; ma to m.in. wpływ na wyższą lub niższą wartość objętości sedymentacyjnej w SDS (Moonen i in., 1982). Wyrażany jest więc pogląd, że średnia M_r wszystkich podjednostek we frakcji HMW winna być bezpośrednim wskaźnikiem jakości i właściwości reologicznych. Istotne znaczenie ma również poziom

gluteniny nierozpuszczalnej w kwasie octowym, np. kompleksu z innymi składnikami (Bekes i in., 1993).

Najbardziej wiarygodne badanie funkcji poszczególnych typów podjednostek HMW-glutenin polega na wzbogacaniu mąki w pojedyncze podjednostki otrzymywane w większych ilościach przez ekspresję klonowanego cDNA odpowiadającego danej jednostce w komórkach *E. coli* (Bekes i in., 1994 a i b). W tej metodzie istotne znaczenie miało skonstruowanie miksografu na 2 g mąki, zachowanie naturalnej struktury monomeru przy bezpośredniej syntezie (a nie izolowaniu z kompleksu) oraz zastosowanie preinkubacji w warunkach redukcji, a następnie utleniania (dla umożliwienia naturalnego włączenia danej podjednostki do kompleksu). Zastosowana technika stanowi poważny krok do przodu, gdyż np. ustalono już bezpośrednie zależności, np. że dodane monomery typu x wpływały korzystniej na właściwości reologiczne ciasta, niż typu y, ale podane w mieszaninie wykazały efekt dodatni sumujący się przy optymalnym stosunku x:y = 1:1; dotyczy to zwłaszcza podjednostek kodowanych przez geny alleliczne. Monomery znane z poprzednich badań, jako działające pozytywnie, czy negatywnie potwierdzały te zachowania znacznie bardziej wiarygodnie, niż w uprzednio stosowanych danych opartych na korelacjach.

Próbowano również znaleźć zależność funkcji (właściwości reologicznych) od struktury makrocząsteczek, stosując metody ekstrakcyjne, ekstensograficzne, mikroskopowe i pomiar hydrofobowości wewnętrznej. Wykazano np. że przedłużone mieszanie ciasta zwiększa jego ekstraktywność, a zmniejsza lepkość, co dowodzi depolimeryzacji (Blokma, 1990; Carnes i in., 1994), np. przez mechaniczne zrywanie sił lub wiązań niekowalencyjnych, ale również kowalencyjnych -S-S-. Obserwowano w tym procesie np. przyrost poziomu grup -SH. Nie udało się natomiast jednoznacznie ustalić zmiany kształtu cząsteczek w trakcie obróbki ciasta, jakkolwiek wiadomo (Shewry, Tatham, 1997), że podjednostki HMW mają w domenach powtarzalnych tendencję do przyjmowania kształtu „laski” (struktura β -helikalna), a w domenach N- i C-końcowych - struktur globularnych typowych dla α -heliksu. Przypuszcza się jednak, że kształt polimerów nie wiąże się z kształtem podjednostek i zależy od szybkości mieszania; przy niedostatecznym lub nadmiernym mieszanii polimery przyjmują kształt globularny lub fibrylarny, a przy optymalnym - pasmowy (Paredes-Lopez, Bushuk, 1983). Porównano lewoskrętną strukturę β jednostek HMW ze strukturą typowego białka zwierzęcego — elastyny; Belton (1999) wykazał różnice właściwości fizycznych między tymi strukturami i na tej podstawie postuluje, że ze względu na znaczny udział Gln w strukturze HMW pszenicy, w sieciowaniu winny współdziałać, obok wiązań -S-S- — również liczne wiązania wodorowe. Sugeruje on, że zwłaszcza międzyłańcuchowe wiązania tego rodzaju są odpowiedzialne za przyrost elastyczności białka, a w formie uwodnionej (cieście) w czasie rozciągania (mieszania) niektóre z nich pękają i tworzą ruchliwe regiony (pętle) oraz związane pasma. Usunięcie siły rozciągającej powoduje elastyczną reakcję pętli. Teoria ta, znana jako mechanizm „pętli i pasm” jest stosowana dla wyjaśnienia mechanizmu rozciągłości polimerów o właściwościach gumowatych (Giannibelli i in., 2001).

Funkcje glutenin małowazeczkowych

Mimo, że białka tej frakcji występują w znacznej przewadze w stosunku do frakcji HMW, są w mniejszym stopniu zbadane pod względem struktury i mają mniej sprecyzowany wpływ na cechy reologiczne ciasta oraz jakość pieczywa. Mimo znacznej zawartości Cys w monomerach (8–9 reszt), tylko 2 (Cys-1 i Cys-7) wydają się tworzyć międzyłańcuchowe wiązania -S-S-, a pozostałe — tylko wewnątrzłańcuchowe; mają więc niewielkie możliwości udziału w tworzeniu struktur trójwymiarowych. Przeciwnie — wydają się uczestniczyć w formowaniu struktur liniowych ze względu na lokalizację reszt Cys w strefach N- i C-końcowych (Shewry, Tatham, 1997); dlatego mogą pełnić funkcję tzw. przedłużacza (łącznika — Lew i in., 1992). Ten pogląd potwierdza, przynajmniej w części, teorię Ewarta (np. 1995) o liniowym łąceniu się podjednostek białka glutenowego. Jednakże znaleziono korelację między poziomem jednostek LMW (zwłaszcza typu s) i wartością wypiekową pszenicy (D'Ovidio i in., 1996). Podjednostka 42K LMW (najczęściej spotykana) ma M_r wyższą od pozostałych ze względu na dłuższy region powtarzalny, odznacza się szczególnie częstym motywem Pro-Pro-Phe-Ser-Gln-Gln (25x) i ta frakcja, przeplatana wstawkami Gln, wydaje się najbardziej regularna i trwała (Masci i in., 1998). Sugeruje się, że ten długi region uczestniczy w kształtowaniu siły ciasta i elastyczności. Jednak wstawki Gln utrudniają tworzenie typowo β -helikalnej struktury i raczej przypisuje się tej frakcji lewoskrętny typ II heliksu prolinowego (Yang i in., 1996). Nie bez znaczenia w stabilizacji jest tu możliwość tworzenia licznych wiązań wodorowych pomiędzy grupami amidowymi Gln; te wiązania z kolei ułatwiają interakcję z cząsteczkami wody, co może mieć wpływ pozytywny na wisko-elastyczność ciasta (Belton, 1994). Zostało to ostatnio potwierdzone przez pozytywny wpływ jakościowy frakcji LMW pod działaniem zwiększonej aktywności amidotransferazy Gln (Koeksel i in., 2001), która ułatwia tworzenie wiązań wodorowych w bogatych w Gln podjednostkach.

Na podstawie lokalizacji reszt Cys w podjednostkach LMW sugeruje się, że istnieją 2 różne ich typy: tzw. „przedłużacze” zawierające co najmniej 2 reszty Cys zdolne do tworzenia wiązań -S-S- międzyłańcuchowych oraz „cząsteczki kończące”, zawierające tylko jedną resztę Cys zdolną do tworzenia takich wiązań (pozostałe stanowią pary tworzące wiązania wewnątrzłańcuchowe (rys. 4) Podczas, gdy przedłużacze mogą spajać liniowo dwie inne cząsteczki, dzięki czemu mają pozytywny wpływ na siłę ciasta, to cząsteczki kończące przerywają ciągłość struktury kompleksu i mają wpływ negatywny (Masci i in., 1998; Greenfield i in., 1998).

Niespolimeryzowane frakcje prolaminy I (gliadyny)

o tym miejscu będą omówione funkcje frakcji prolamin bogatych w S (α -, β - i γ -) oraz ubogie w S ω -prolaminy, wspólnie z tzw. D-gluteniną, która stanowi monomeryczną podjednostkę izolowaną z frakcji HMW o strukturze bardzo podobnej do ω -prolaminy

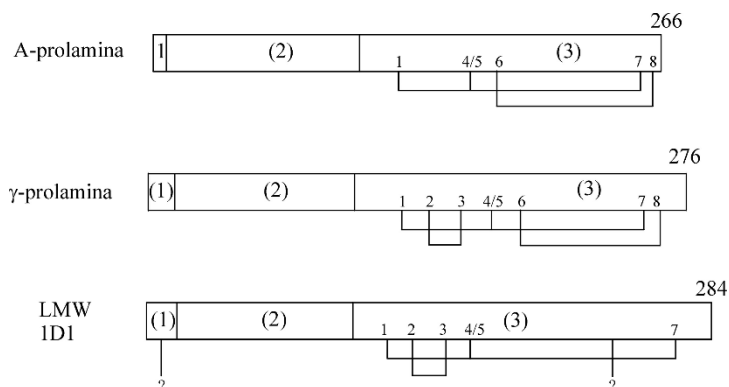
Frakcje S(+) dodane do mąki razem (α - + β - + γ -) powodują zmniejszenie czasu mieszania, maksimum rezystencji i oporności na rozciąganie oraz wysokości bochenka przy wypieku. Frakcje α - + β -prolamin wykazują mniej negatywne działanie na wysokość bochenka, ale powodują przy tym korzystne obniżenie czasu mieszania i pozytywne działanie na rozciąganie (Fido i in., 1997). Każda z frakcji ma stałą masę cząsteczkową: α - + β - ok. 31, a γ - - 35 kDa; ich negatywne działanie na objętość bochenka było zgodne z

M_γ , ale inne parametry reologiczne nie wykazywały tej zależności. W miksografii na 2g mąki wykazano (Khatkar, Schofield, 1996) negatywny efekt prolamin I na czas mieszania, który rośnie wraz z wielkością cząsteczek, ale równocześnie siła ciasta i objętość bochenka rośnie, podobnie, jak objętość bochenka po dodaniu do ciasta dowolnej frakcji prolamin I. Podobny brak konsekwencji obserwowano przy badaniu korelacji między dodatkiem tych frakcji i właściwościami reologicznymi ciasta oraz zdolnością emulgowania, a także tworzenia i trwałości piany. Wreszcie Waga i Węgrzyn (2000) wykazali, obok licznych cech uprawowych, zgodność pozytywnego oddziaływania różnych gliadyn na liczbę sedimentacji. W sumie więc, niewiele jest udokumentowanych wyników określających jednoznacznie funkcje tych frakcji prolamin, zwłaszcza α - i β - (Uthayakumaran i in., 2001). Nieco więcej danych dotyczących elementów struktury związanych z cechami i funkcjami wykazano dla γ -prolamin S(+) oraz ω -prolamin S(-).

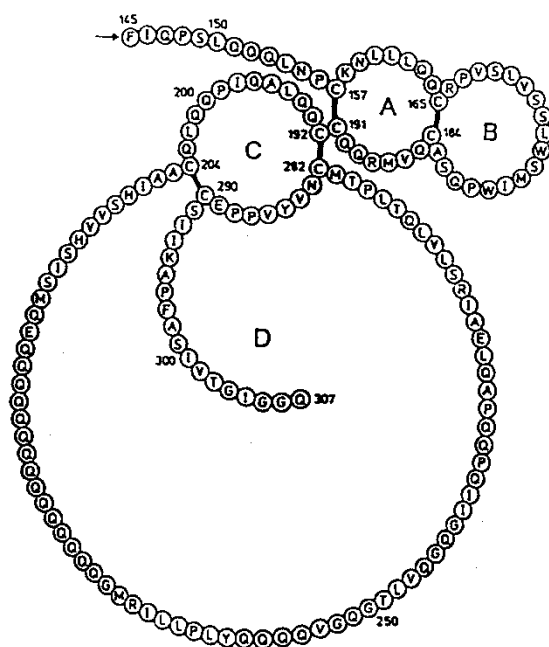
γ -Prolaminy

Frakcja ta, obok α -prolamin, stanowi podstawowy składnik białka endospermu ziarniaków zbóż. Składa się z wielu podobnych podjednostek, a sekwencję aminokwasów wielu z nich ustalono na podstawie sekwencji sklonowanego cDNA. Większość podjednostek zawiera 8 reszt Cys, z których 6 występuje w strefie III (rys. 4a — Mueller, Wieser, 1997), a 2 w strefie V; wydają się one uczestniczyć wyłącznie w tworzeniu wewnątrzłańcuchowych wiązań -S-S-. Powstałe 4 wiązania -S-S- grupują się na małej przestrzeni (rys. 4 b), tworząc zwartą strukturę w regionie C-końcowym; powstają m.in. 3 małe pierścienie A, B i C oraz duży pierścień D, w porównaniu z regionem powtarzalnym przy N-końcu; wynika to z badań konformacyjnych i hydrofobowości powierzchniowej (Popineau, Pineau, 1988). Podobne struktury są spotykane w cząsteczkach α -prolamin i niektórych monomerach LMW, jednak nieco zmodyfikowane ze względu na brak 2 reszt Cys i możliwość tworzenia jednego mostka -S-S- międzylańcuchowego. Sugeruje się, że γ -prolaminy znacznie obniżają maksimum rezystencji ciasta oraz oporność na rozciąganie, a także powodują wzrost rozciągliwości. Natomiast regiony powtarzalne zawierają główny motyw Pro-Gln-Gln-Pro-Phe-Pro-Gln-, który mógłby tworzyć typową dla białek elastomerycznych strukturę β -helikalną, ale ze względu na jego rozrzucony charakter, byłaby ona zbyt luźna. Obserwowane w niektórych badaniach pozytywne korelacje γ -prolamin z cechami jakościowymi mogą wynikać z możliwości wbudowywania się ich struktur do frakcji LMW, lub nawet HMW (zwykle z udziałem innych, niż -S-S- wiązań), gdyż przy degradacji wymienionych polimerów uzyskiwano również monomery typowe dla γ -prolamin.

a)



b)



Rys. 4. Niektóre elementy struktury prolamin monomerycznych; (a) - rozmieszczenie i funkcje wiązań --S-S- w strukturach α i γ -prolamin oraz LMW-prolamin II (Shewry, Tatham, 1997); (b) — struktura C-końcowa prolamin typu γ w obrębie reszt 143–307 aminokwasów (Mueller, Wieser, 1997)

Fig. 4. Some structural elements of monomeric prolamins (a) - localisation and functions of --S-S- bonds in α -, γ - and LMW-prolamins (Shewry, Tatham, 1997); (b) C-terminal conformation of γ -type prolamins in the 143–307 amino acid zone (Mueller, Wieser, 1997)

ω -Prolaminy

Jak wiadomo, frakcja ω -prolamin nie zawiera Cys i jest prawie w całości zbudowana z regionów powtarzalnych, bogatych w Pro i Gln. Bardzo podobne monomery określane jako D-prolaminy, jednak zawierające Cys, wyizolowano z frakcji HMW (Masci i in., 1998). Konstrukcja jednostek ω -prolamin sugeruje stabilną strukturę typu PP II (poliprolinowy typ heliksu lewoskrętnego), który przejawia interakcję z białkami globularnymi (np. domenami C-końcowymi). Według sugestii Du Pont i wsp. (2000), np. 1D- ω -prolaminy składają się ze sprężystej pętli (lub kilku), PP II-heliksu oraz niewielkich fragmentów β -helikalnych (domen powtarzalnych). Frakcje kontrolowane przez inne genomy, np. 1B- ω -prolaminy mają strukturę podobną, ale mniej sekwencji helikalnych poliprolinowych. Łańcuchy boczne Gln tworzą liczne wiązania wodorowe z analogicznymi resztami Gln wbudowanymi we własny łańcuch polipeptydowy, lub łańcuchy sąsiednich podjednostek. Umożliwia to interakcję i usztywnienie własnej cząsteczki, co przenosi się na sąsiednie podjednostki przez ich grupy amidowe Gln. Powoduje to wytworzenie równowagi dynamicznej z protonami cząsteczek wody otaczających ten układ. Przy znacznej ilości wiązań wodorowych występuje silne działanie usztywniające jednostek ω -prolamin, zwłaszcza ich niedoskonały układ β -helikalny domen powtarzalnych, a także giętki (elastyczny), ale rozciągnięty charakter fragmentów C-końcowych.

Sugerowane tu możliwości dynamicznych zmian cząsteczek ω -prolamin w środowisku wodnym oraz siły kohezji stwarzające możliwość wbudowywania się tych monomerów w duże kompleksy LMW lub HMW, pozwalają przypisywać im istotny i pozytywny udział w kształtowaniu wisko-elastycznych właściwości kompleksu glutenowego oraz ciasta. Potwierdzają to liczne badania korelacyjne i rekonstruktoryjne, jakkolwiek ciągle brak w tym zakresie dowodów bezpośrednich.

PODSUMOWANIE

Z przedstawionego przeglądu wynika, że mąka pszenna jest jednym z najbardziej złożonych układów wśród środków żywności. Skomplikowany jest nie tylko skład chemiczny (zwłaszcza białek), ale również zróżnicowanie genetyczne oraz złożone, dynamiczne interakcje między składnikami, zachodzące w trakcie dojrzewania i przechowywania ziarniaków oraz procesów technologicznych, prowadzących zwłaszcza do wytwarzania pieczywa. Ponieważ te zmienności dotyczą głównie białek, które odznaczają się ogromną labilnością struktury, a jak obecnie wiadomo, każda z frakcji zasadniczych jest zbiorem wielu podobnych, ale i zróżnicowanych indywidualów molekularnych (do tego syntetyzowanych na bazie różnych genów), trudno się dziwić, że wiedza o ich funkcjach jest często ogólnikowa i poparta nie zawsze jednoznacznymi (i wiarygodnymi) korelacjami.

Mimo opisanych trudności, osiągnięcia ostatnich kilkunastu lat są duże i można je podsumować następująco:

- wyjaśnienie sekwencji aminokwasów w licznych monomerach poszczególnych frakcji zasadniczych;
- sprecyzowanie konformacji i charakteru domen N- i C-końcowych oraz występujących dość powszechnie domen powtarzalnych z charakterystycznymi motywami sekwencji;

- zlokalizowanie i określenie typów wiązań disulfidowych -S-S- i ich roli w tworzeniu trójwymiarowych struktur kompleksowych;
 - stwierdzenie innych typów i funkcji wiązań (sił) uczestniczących w kompleksowaniu; monomerów (wodorowych, sił Van der Waalsa);
 - izolowanie i oczyszczenie monomerów, wykazanie różnic między nimi i określenie lokalizacji genów sterujących ich biosyntezą;
 - określenie funkcji poszczególnych frakcji w kształtowaniu jakości białek i pieczywa, które badano na podstawie:
 - a) frakcjonowania i porównywania składu z wartością wypiekową;
 - b) frakcjonowania i rekonstytucji lub zwiększenia stężeń frakcji;
 - c) korelowania frakcji wytwarzanych przez geny alleliczne z jakością pieczywa;
 - d) korelowania struktury i funkcji jakościowych;
 - uzyskiwanie klonów cDNA poszczególnych genów i ich ekspresja w komórkach bakterii; otrzymany tą drogą czysty monomer dodany do ciasta pozwala na jednoznaczne określenie jego wpływu na cechy reologiczne;
- Wiele innych elementów struktury, np. fizycznych, zostało wyjaśnionych, co zbliża do zrozumienia ich wpływu na cechy reologiczne i wypiekowe białek zbóż.

LITERATURA

- Ahmed M. 2000. Molecular marker-assisted selection of HMW-glutenin alleles related to wheat bread quality by PCR generated DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 101: 892 — 896.
- Altenbach S. B. 1998. Quantification of individual low-molecular-weight glutenin subunit transcripts in developing wheat grains by competitive RT-PCR. *Theor. Appl. Genet* 97: 413 — 421.
- Bekes F., Anderson O., Gras P. W., Gupta R. B., Tam A., Wrigley C. W., Appels R. 1993. The contribution to mixing properties of 1D-HMW-glutenin subunits expressed in the bacterial system. *Proc. Cereal Conf. Sydney* 1993.
- Bekes F., Gras P. W., Gupta R. B. 1994 a. Mixing properties as a measure of reversible reduction and oxidation of dough. *Cereal Chem.* 71: 44 — 50.
- Bekes F., Gras P. W., Gupta R. B. Hickman D. R., Tatham A. S. 1994 b. Effects of 1Bx20 HMW-glutenin on mixing properties. *J. Cereal Sci.* 19: 3 — 7.
- Belton P. S. 1994. A hypothesis concerning the elasticity of high-molecular-weight subunits. In: *Wheat kernel proteins; Molecular and functional aspects.* Univ Della Tuscia, Viterbo: 159 — 165.
- Belton P. S., Colguohoun I. J., Field J. M., Grant A., Shewry P. R., Tatham A. S. 1994. ^1H and ^2H NMR studies of a high M_r subunit of wheat glutenin and comparison with elastin. *J. Cereal Sci.* 19, 115 — 121.
- Bietz J. A. 1987. Wheat and wheat improvement. *Am. Soc. Agron. Madison. E. G. Hayne (ed.) 2nd Ed.:* 215 — 241.
- Bietz J. A.. 1987. Genetic and biochemical studies on nonenzymatic endosperm proteins. In: *Wheat and wheat improvement. Agron. Monogr. 13., E. G. Hayne (ed.):* 215 — 241.
- Bietz J. A., Simpson D. C. 1992. Electrophoresis and chromatography of wheat proteins: available methods and procedures for statistical evaluation of the data. *J. Chromatography* 624: 53 — 80.
- Bloksma A. H. 1972. The relation between the thiol and disulfide contents of dough and its rheological properties. *Cereal Chem.* 49: 104 — 120.
- Bloksma A. H. 1990. Dough structure, dough rheology and baking quality. *Cereal Food World* 35: 237 — 244.
- Buchanan B. B. 1980. Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 341 — 374.

- Buchanan B. B., Adamidi C., Lozano R. E., Yee R. C., Meuma M., Kobrehel K., Ermel E. 1997. Thioredoxin-linked migration of allergic responses to wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 5372 — 5377.
- Carnes M., Popineau Y., Lefebvre J. 1994. Characterisation of gluten subfractions by SE-HPLC and dynamic rheological analysis in shear. *J. Cereal Sci.* 19: 131 — 139.
- Cassidy B. G., Dvorak J., Anderson O. D. 1998. The wheat low-molecular-weight glutenin genes and progress in understanding gene family structures. *Theor. Appl. Genet.* 96: 743 — 750.
- Dąlek-Zawistowska U., Bartoszewicz K., Kączkowski J. 1975. The equilibrium between the high- and low-molecular-weight fractions of wheat gluten. *Bull. Acad. Polon. Sci. ser. sci. biol.* 23: 71 — 75.
- D'Ovidio R. 1993. Single-seed PCR LMW glutenin genes to distinguish between durum wheat cultivars with good and poor technological properties. *Plant Mol. Biol.* 22: 1173 — 1176.
- D'Ovidio R., Simeone M., Morchitelli C., Masci S., Porceddu E. 1996. Isolation and characterisation of members of the LMW glutenin gene family in durum wheat. In: *Proc. 6-th Int. Gluten Workshop* (ed. C. W. Wrigley), Melbourne: 81 — 84.
- Ewart J. A. D. 1979. Glutenin structure. *J. Sci. Food Agric.* 30: 482 — 492.
- Ewart J. A. D. 1985. Blocked thiols in glutenin and protein quality. *J. Sci. Food Agric.* 36: 101 — 112.
- Fido R. J., Bekes F., Gras P. W., Tatham A. S. 1997. Effects of α -, β -, γ - and ω -gliadins on the dough mixing properties of wheat flour. *J. Cereal Sci.* 26: 271 — 277.
- Field J. M., Tatham A. S., Shewry P. R. 1987. The structure of the high M_r subunit of durum wheat (*Triticum durum*) gluten. *Biochem. J.* 247: 215 — 221.
- Finney K. F., Jones B. L., Shogren M. D. 1982. Functional (bread making) properties of wheat protein and fractions obtained by ultra centrifugation. *Cereal Chem.* 59: 449 — 453.
- Gianibelli M. C., Laroque O. R., Mac Rithie F., Wrigley C. W. 2001. Biochemical, genetic and molecular characterisation of wheat glutenin and its component subunits. *Cereal Chem.* 78: 635 — 646.
- Gobin P., Duviau M. P., Wong J. H., Buchanan B. B., Kobrehel K. 1996. Change in sulfhydryl-disulfide status of wheat proteins during conditioning and milling. *Cereal Chem.* 73: 495 — 498.
- Gobin P., Ng P.K.W., Buchanan B.B., Kobrehel K. 1997. Sulfhydryl-disulfide changes in proteins of developing wheat grain. *Plant Physiol. Biochem.* 35: 777 — 783.
- Greenfield J. J. A., Ross-Murphy S. B., Tamas L., Bekes F., Halford N. G., Tatham A. S., Shewry P. R. 1998. Rheological properties of monomeric and polymeric forms of C-hordein, a sulphur-poor protein of barley. *J. Cereal Sci.* 27: 233 — 236.
- Hoseney B. C., Finney K. F., Pomeranz Y. 1970. Functional (bread making) and biochemical properties of wheat flour components. VI. Gliadin-lipid-gluten interaction in wheat gluten. *Cereal Chem.* 47: 135 — 144.
- Huebner F. R., Kączkowski J., Bietz J. A. 1990. Quantitative variation by HPLC of wheat proteins from grains of different stages of maturity and from different spike locations. *Cereal Chem.* 67: 464 — 470.
- I'jao J. A., Jee B. C., Kobrehel K., Buchaan B. B. 1992. Effect of thioredoxin-linked reduction of the activity and stability of Kunitz and Bowman-Birk soybean trypsin inhibitor protein. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2333 — 2336.
- Johansson E. 1995. Wheat grain proteins - accumulation and composition. Thesis of Sveed. Univ. Agric. Sci.: 1 — 53.
- Kasarda D. D., Wooderd K. M., Adalsteins A. E. 1998. Resolution of high-molecular-weight glutenin subunits by a new SDS-PAGE system incorporating a neutral pH buffer. *Cereal Chem.* 75: 70 — 71.
- Kączkowski J., Bernacka-Mieleśzko T. 1980. The role of disulfide bonds and their localisation in wheat protein molecules. *Ann. Technol. Agric.* 23: 377 — 384.
- Kączkowski J., Kurowska E., Moskal M. 1985. Immunological method of wheat gluten detection in food products for celiac disease patients. *Acta Alim. Polon.* 9: 177 — 183.
- Kączkowski J. 1991. Stan badań nad strukturą i funkcjami białek glutenu pszennego. *Biul. IHAR* 179: 3 — 17.
- Kączkowski J. 2000. New aspects of the cereal storage protein synthesis and degradation including the role of thioredoxin, as well as its regulatory properties. *Acta Physiol. Plant.* 22: 483 — 494.
- Kączkowski J. 2001. Udział tioredoksyny w przemianach metabolicznych roślin wyższych, a szczególnie w syntezie i degradacji białek zapasowych ziarniaków zbóż. *Biul. IHAR* 217: 5 — 18.

- Keck B., Koehler P., Wieser H. 1995. Disulfide bonds in wheat gluten: cysteine peptides derived from gluten proteins following peptic and thermolytic digestion. *Zeitschr. Lebensm. Unters. Forsch.* 200: 432 — 439.
- Khatkar B. S., Schofield J. D. 1996. Assessment of wheat gluten quality using the 2g direct-drive mixograph. *Proc. 46-th Cereal Chem. Conf.* (Ed. C. W. Wrigley) Melbourne: 70 — 73.
- Kipp B., Belitz H. D., Seilmeier W., Wieser H. 1996. Comparative studies of high M_r subunits of rye and wheat; I: Isolation, biochemical characterisation and effects on gluten extensibility. *J. Cereal Sci.* 23: 227 — 234.
- Kobrehel K., Wong J. H., Balogh K., Kiss E., Yee B. C., Buchanan B. B. 1992. Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin h. *Plant Physiol.* 99: 919 — 924.
- Kobrehel K., Buchanan B. B. 1997. Thioredoxin h: an early signal in wheat germination and seedling development. *Rec. Res. Dev. Plant Physiol.* 1: 265 — 272.
- Koehler P., Belitz H. D., Wieser H. 1993. Disulfide bonds in wheat gluten; farther cysteine peptides from low-molecular-weight (LMW) subunits from γ -gliadins. *Zeitschr. Lebensm. Unters. Forsch.* 196: 239 — 247.
- Koeksel H., Sirri D., Ng P. K. W., Steffe J. F. 2001. Effect of transglutaminase enzyme on fundamental rheological properties of sound and bug damaged wheat flour doughs. *Cereal Chem.* 78: 26 — 30.
- Larre C., Denery-Papini S., Popineau Y., Deshasey G., Desserme C., Lefebvre J. 2000. Biochemical analysis and rheological properties of gluten modified by transglutaminase. *Cereal Chem.* 77: 32 — 38.
- Lee Y. K., Bekes F., Gupta R., Appels R., Morell M. K. 1999. The low-molecular-weight glutenin subunit proteins of primitive wheats: I. Variation in A genome species. *Theor. Appl. Genet.* 98: 118 — 125.
- Lew E. J. L., Kuzmicky D. D., Kasarda D. D. 1992. Characterisation of low-molecular-weight glutenin subunits by reversed-phase high-performance liquid chromatography, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and N-terminal amino acid sequencing. *Cereal Chem.* 69: 508 — 515.
- Lozano R. M., Wong J. H., Yee B. C., Peters A., Kobrehel K., Buchanan B. B. 1996. New evidence for a role for ferredoxin h in germination and seedling development. *Planta* 200: 100 — 106.
- Mac Ritchie F., DuCross D. L., Wrigley C. W. 1990. Flour polypeptides related to wheat quality. *Adv. Cereal Sci. Technol.* 10 (Ed. Y. Pomeranz) AACC, St. Paul: 79 — 145.
- Mac Ritchie F., Lafiandra D. 2001. Use of near isogenic wheat lines to determine protein composition-functionality relationships. *Cereal Chem.* 78: 501 — 506.
- Masci S., D'Ovidio R., Lafiandra D., Kasarda D. D. 1998. Characterisation of a low-molecular-weight glutenin subunit gene from bread wheat and the corresponding protein, that represents a major subunit of the glutenin polymer. *Plant Physiol.* 118: 1147 — 1158.
- Masci S., Egorov E. A., Ronchi C., Kuzmicky D. D., Kasarda D. D., Lafiandra D. 1996. Evidence for a presence of only one cysteine residue in the D-type low-molecular-weight subunits of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.* 29: 17 — 25.
- Meyer Y., Verdoncq L., Vignol F. 1999. Plant thioredoxins and glutaredoxins: identity and putative roles. *Trends Plant Sci.* 4: 388 — 394.
- Miles M. J., Carr H. J., McMaster T. J., I'Anson K. J., Belton P. S., Morris V., Field J. M., Shewry P. R., Tatham A. S. 1991. Scanning tunneling microscopy of a wheat seed storage protein reveals data of an unusual supersecondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 68 — 71.
- Moonen J. H. E., Shepstra A., Graveland A. 1982. Use of the SDS sedimentation test and SDS polyacrylamide gel electrophoresis for screening breeders samples of wheat for bread-making quality. *Euphytica* 31: 677 — 690.
- Motoki M., Nio N. 1983. Crosslinking between different food proteins by transglutaminase. *J. Food Sci.* 48: 561 — 566.
- Mueller S., Wieser H. 1997. The location of the disulfide bonds in monomeric γ -type gliadins. *J. Cereal Sci.* 26: 169 — 176.
- Osborne T. B. 1924. *The vegetable proteins*. Longmans, Green.
- Parchment O., Shewry P. R., Tatham A. S., Osguthorpe O. 2001. Molecular modeling of unusual spiral structure in elastomeric wheat seed proteins. *Cereal Chem.* 78: 658 — 662.
- Paredes-Lopez O., Bushuk W. 1983. Development and "undevelopment" of wheat dough by mixing; microscopic structure and its relations to bread making quality. *Cereal Chem.* 60: 24 — 27.

- Payne P. L., Corfield K. G., Holt L. M., Blackman J. A. 1981. Correlations between the inheritance of certain high-molecular-weight subunits of glutenin and bread making quality in progenies of six crosses of bread wheat. *J. Sci. Food Agric.* 32: 51 — 60.
- Payne P. L., Lawrence G. J. 1983. Catalogue of the alleles for the complex gene loci Glu A1, Glu B1 and Glu D1, which code for high-molecular-weight subunits in glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res. Commun.* 11: 29 — 35.
- Popineau Y., Pineau F. 1988. Changes of conformation and surface hydrophobicity of gliadins. *Lebensm. Wiss. Technol.* 21: 113 — 117.
- Rogers W. J., Payne P. L., Seekings J. A., Sayers J. 1991. Effects on bread-making quality of x-type and y-type high-molecular-weight subunits of glutenin. *J. Cereal Sci.* 14: 209 — 221.
- Seilmeier H., Belitz H. D., Wieser H. 1991. Separation and quantitative determination of high-molecular-weight subunits of glutenin from different wheat varieties and the genetic variants of the barley Sinco. *Zeitschr. Lebensm. Unters. Forsch.* 192: 124 — 129.
- Shani N., Steffen-Campbell J. D., Anderson O. D., Green F. C., Galili G. 1992. Role of the amino- and carboxy-terminal region in the folding and oligomerization of wheat high-molecular-weight glutenin subunits. *Plant Physiol.* 98: 433 — 441.
- Shewry P. R., Tatham A. S. 1987. Recent advances in our understanding of cereal seed protein structure and functionality. *Comments Agric. Food Chem.* 1: 71 — 94.
- Shewry P. R., Tatham A. S. 1990. The prolamin storage proteins of cereal seeds; structure and evolution. *Biochem. J.* 267: 1 — 12.
- Shewry P. R., Halford N. G., Tatham A. S. 1992. The high-molecular-weight subunits of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.* 15: 105 — 120.
- Shewry P. R., Tatham A. S. 1997. Disulfide bonds in wheat gluten proteins. *J. Cereal Sci.* 25: 207 — 227.
- Simonato B., DeLazzari F., Passini G., Palato F., Gianattasio M., Gemignani C., Peruffo A. D. B., Santucci B., Plebani M., Curioni A. 2001. IgE binding to soluble and insoluble wheat flour proteins in atopic and non-atopic patients suffering from gastrointestinal symptoms after wheat ingestion. *Clin. Exp. Allergy* 31: 1771 — 1778.
- Tanabe S., Arrai S., Yanagihara Y., Mita H., Takahashi K., Watanabe M. 1996. A major wheat allergen has a Gln-Gln-Pro-Pro motif identified as an IgE binding epitope. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 219: 290 — 293.
- Tao H. P., Adalstein A. E., Kasarda D. D. 1992. Intermolecular disulfide bonds link specific high-molecular-weight glutenin subunits in wheat endosperm. *Biochim. Biophys. Acta* 1159: 13 — 21.
- Tatham A. S., Shewry P. R. 1985. The beta-turn conformation in wheat gluten proteins. *Cereal Chem.* 62: 405 — 412.
- Tatham A. S., Shewry P. R., Belton P. S. 1990. Structural studies of cereal prolamins including wheat gluten. *Adv. Cereal Sci. Technol.* 10: 1 — 78.
- Tatham A. S., Shewry P. R. 1995. S-poor prolamins of wheat, barley and rye. *J. Cereal Sci.* 22: 1 — 16.
- Tatham A. S., Shewry P. R. 2000. Elastomeric proteins: biological roles, structure and mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* 25: 567 — 571.
- Thomson N. H., Miles M. J., Popineau Y., Harries J., Shewry P. R., Tatham A. S. 1999. Small angle X-ray scattering of wheat seed storage proteins: α -, β - and γ -gliadins and the high-molecular-weight (HMW) subunits of glutenin. *Biochim. Biophys. Acta* 1430: 358 — 366.
- Uthayakumaran S., Tomaskozi S., Tatham A. S., Savage A. W. J., Gianibelli M. C., Staddard F. L., Bekes F. 2001. Effects of gliadin fractions on functional properties of wheat dough depending on molecular size and hydrophobicity. *Cereal Chem.* 78: 138 — 141.
- Veegels P. L., Hamer R. J., Schofield J. D. 1996. Functional properties of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.* 23: 1 — 18.
- Vu A. T., Popineau Y. 1987. An immunochemical study of two γ -gliadin components from common wheat's. *J. Cereal Sci.* 6: 15 — 25.
- Waga J., Węgrzyn S. 2000. Powiązanie wybranych frakcji białek gliadynowych ze zmiennością cech użytkowych odmian i rodów pszenicy ozimej. *Biul. IHAR* 215: 61 — 76.

- Wieser H., Anthes S., Seilmeier W. 1998. Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.* 75: 644 — 650.
- Yong A. S., Hitz G., Honig B. 1996. Free energy determinants of secondary structure formation: III; β -turns and their role in protein folding. *J. Mol. Biol.* 259: 875 — 882.
- Zhao F. J., Salmon S. E., Withers P. J. A., Monaghan J. M., Evans E. J., Shewry P. R., MacGroth S. P. 2000. Variation in bread-making quality and rheological properties in relation to sulphur nutrition and field conditions. *J. Cereal Sci.* 30: 19 — 31.