

**SŁAWOMIR FRANASZEK**  
**MONIKA LANGNER**  
**BOLESŁAW SALMANOWICZ**

Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu  
Zakład Biotechnologii

## Niskocząsteczkowe białka gluteninowe i ich wpływ na jakość wypiekową pszenicy

### Low molecular weight glutenin proteins and their effect on the baking quality of wheat

Wartość technologiczna pszenicy w dużym stopniu determinowana jest kompozycją i ilością białek zapasowych (glutenin i gliadyn) wchodzących w skład glutenu. Pogłębianie wiedzy na temat polimorfizmu białek glutenowych i poznanie ich genetycznych uwarunkowań oraz znajomość metod ich identyfikacji, umożliwi lepszy dobór odmian o parametrach spełniających określone wymagania stawiane przez hodowców i przedstawicieli przemysłu spożywczego. Przeprowadzono charakterystykę białek gluteninowych o niskiej masie cząsteczkowej (LMW) od 30 do 50 kDa, którym w ostatnich latach poświęca się dużo uwagi ze względu na istotny wpływ w kształtowaniu jakości wypiekowej mąki pszennej. Białka te stanowią około 45% białek glutenowych i wpływają w ponad 30% na zmienność cech technologicznych pszenicy. Ze względu na występowanie znacznego polimorfizmu w tej klasie białek oraz duże powinowactwo do białek gliadynowych, LMW gluteniny są mało poznane, a dokładna ich identyfikacja i charakterystyka jest wciąż obiektem wielu badań.

**Słowa kluczowe:** pszenica, jakość wypiekowa, gluten, białka glutenowe, LMW gluteniny

The technological value of wheat is determined to a large extent by the amount and composition of storage proteins (glutenin and gliadin) included in the gluten. The enhanced knowledge on the polymorphism of gluten protein, their genetic background and the methods of their identification, allows the selection of varieties with characteristics that fulfill defined requirements, not only for farmers but also for representatives of the flour and the baking industry. This article aims to characterize low molecular weight glutenin proteins (LMW) from 30 to 50 kDa, which have been given the most of attention for recent years because they have important effect on the quality of wheat. These proteins constitute 45% of gluten proteins and generate above 30% of the variation of grain and technological characteristics of wheat flour. Due to the high polymorphism and strong affinity for gliadin proteins to LMW glutenin, these proteins are not well known, and their accurate identification and understanding of the physicochemical qualities are still the subject of many studies.

**Key words:** wheat, baking quality, gluten, gluten proteins, LMW glutenins

## WPROWADZENIE

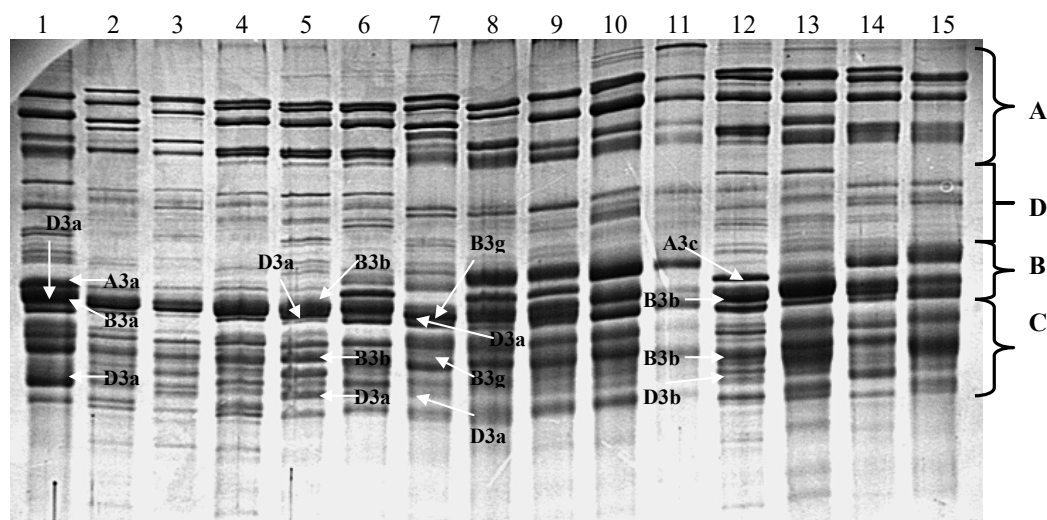
W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania i świadomości konsumentów odnośnie kupowanych produktów spożywczych. Dzisiejszy klient wymaga aby żywność, którą nabywa była jak najwyższej jakości. Jednym z podstawowych źródeł pożywienia na świecie jest pszenica zwyczajna, którą przeznaczają się głównie na cele młynarsko-piekarskie do produkcji różnego typu pieczywa, makaronów, produktów ciastkarskich, kaszy manny i płatków śniadaniowych oraz do produkcji skrobi, słoju piwowarskiego i suchego glutenu, który dodatkowo wzbogaca jakość mąki, pieczywa i makaronów. Zboże to wykorzystywane jest szeroko w przemyśle spożywczym ze względu na bardzo dobre właściwości odżywcze (bogate źródło białka, skrobi, witamin i minerałów) oraz dobre właściwości technologiczne. Jednym z kryteriów, które decyduje o przeznaczeniu technologicznym danej odmiany pszenicy jest skład oraz zawartość frakcji białkowej. W przemyśle zbożowo-młynarskim dla jakości wypiekowej istotne znaczenie ma udział ilościowy i kompozycja białek zapasowych (glutenin i gliadyn) zawartych w endospermie ziarniaków. Białka te stanowią „szkielet” wytworzonego ciasta i odpowiadają za właściwości fizykochemiczne glutenu. Białka gluteninowe stanowią około 45% wszystkich białek zapasowych i odpowiadają za 40–70% zmienności cech technologicznych mąki pszennej (D’Ovidio i Masci, 2004; Gale, 2005). Ze względu na wielkość masy cząsteczkowej można podzielić je na gluteniny wysoko- i niskocząsteczkowe, gdzie udział tych ostatnich stanowi 70%. Badania niskocząsteczkowej frakcji gluteninowej trwają od ponad 30 lat i skupiają się głównie na identyfikacji genów kodujących te białka oraz na charakterystyce ich wariantów allelicznych, co pozwala na dokładne określenie udziału poszczególnych podjednostek w kształtowaniu jakości wypiekowej i technologicznej pszenicy. W niniejszej pracy przedstawiono charakterystykę glutenin niskocząsteczkowych oraz ich wpływ na jakość wypiekową pszenicy.

**Charakterystyka niskocząsteczkowych białek gluteninowych**

Gluteniny pszenicy są białkami polimerycznymi o masie cząsteczkowej do kilkunastu milionów daltonów (Da). Zbudowane są z wielu łańcuchów polipeptydowych, które dzięki disulfidowym wiązaniom wewnątrzcząsteczkowym i międzyłańcuchowym tworzą specyficzną strukturę glutenu. W wyniku redukcji wiązań disulfidowych powstaje szereg podjednostek o masie cząsteczkowej od 80 do 120 kDa klasyfikowanych jako wysokocząsteczkowe (HMW) podjednostki gluteninowe oraz niskocząsteczkowe (LMW) podjednostki gluteninowe o masie cząsteczkowej od 30 do 50 kDa (Gianibelli i in., 2001; D’Ovidio i Masci, 2004). Ze względu na różną mobilność w żelu poliakrylamidowym, białka gluteninowe zgodnie z podziałem zaproponowanym przez Gianibelli i współautorów (2001), można podzielić na cztery podgrupy A, B, C i D (rys. 1).

Grupę A stanowi frakcja HMW glutenin, natomiast frakcja LMW glutenin zaliczana jest do grupy B, C i D. W obszarze B zlokalizowane są wyłącznie LMW gluteniny o masie cząsteczkowej 42-51 kDa, natomiast w regionie C oraz D oprócz LMW glutenin (m. cz. 30-40 kDa) występują również  $\alpha$ -,  $\gamma$ -gliadyny i  $\omega$ -gliadyny. LMW białka gluteninowe ze względu na podobną budowę sekwencji polipeptydowych wykazują bowiem silne

powinowactwo do białek gliadynowych (Redaelli i in., 1995; Gianibelli i in., 2001; Cloutier i in., 2001; Ikeda i in., 2002; D'Ovidio i Masci, 2004).



**Rys. 1.** Rozdział pszenicznych białek gluteninowych w 12,5 % żelu poliakrylamidowym z dodatkiem siarcznanu dodecylsodowego (SDS). A- wysokocząsteczkowe białka gluteninowe, B-, C- i D- niskocząsteczkowe białka gluteninowe. Linie: 1. Chinese Spring (*Glu-A3a, Glu-B3a, Glu-D3a*), 2. Word's Prolific (*Glu-A3f, Glu-B3b, Glu-D3b*), 3. Aotea (*Glu-A3e, Glu-B3b, Glu-D3b*), 4. Claymore (*Glu-A3f, Glu-B3b, Glu-D3b*), 5. Justin (*Glu-A3e, Glu-B3b, Glu-D3a*), 6. Cheyenne (*Glu-A3c, Glu-B3e, Glu-D3f*), 7. Insignia (*Glu-A3e, Glu-B3c, Glu-D3c*), 8. Jufy-1 (*Glu-A3e, Glu-B3i, Glu-D3d*), 9. Kharkov (*Glu-A3e, Glu-B3g, Glu-D3a*), 10. Kukri (*Glu-A3d, Glu-B3h, Glu-D3b*), 11. Norin-61 (*Glu-A3e, Glu-B3i, Glu-D3d*), 12. Norstar (*Glu-A3c, Glu-B3b, Glu-D3b*), 13. Radja (*Glu-A3e, Glu-B3f, Glu-D3b*), 14. Rescue (*Glu-A3f, Glu-B3h, Glu-D3a*), 15. Thatcher (*Glu-A3e, Glu-B3h, Glu-D3e*), (dane własne)

**Fig. 1.** Separation of wheat glutenin proteins in 12.5% polyacrylamide gel with the addition of sodium dodecyl sulfate (SDS). A- high molecular weight subunits, B-, C- and D- low molecular weight subunits. Lines: 1. Chinese Spring (*Glu-A3a, Glu-B3a, Glu-D3a*), 2. Word's Prolific (*Glu-A3f, Glu-B3b, Glu-D3b*), 3. Aotea (*Glu-A3e, Glu-B3b, Glu-D3b*), 4. Claymore (*Glu-A3f, Glu-B3b, Glu-D3b*), 5. Justin (*Glu-A3e, Glu-B3b, Glu-D3a*), 6. Cheyenne (*Glu-A3c, Glu-B3e, Glu-D3f*), 7. Insignia (*Glu-A3e, Glu-B3c, Glu-D3c*), 8. Jufy-1 (*Glu-A3e, Glu-B3i, Glu-D3d*), 9. Kharkov (*Glu-A3e, Glu-B3g, Glu-D3a*), 10. Kukri (*Glu-A3d, Glu-B3h, Glu-D3b*), 11. Norin-61 (*Glu-A3e, Glu-B3i, Glu-D3d*), 12. Norstar (*Glu-A3c, Glu-B3b, Glu-D3b*), 13. Radja (*Glu-A3e, Glu-B3f, Glu-D3b*), 14. Rescue (*Glu-A3f, Glu-B3h, Glu-D3a*), 15. Thatcher (*Glu-A3e, Glu-B3h, Glu-D3e*) (own data)

Białka gluteninowe typu A zbudowane są z wysoce konserwatywnych domen terminalnych N- i C- zawierających reszty cysteinowe odpowiedzialne za tworzenie wiązań disulfidowych, a w konsekwencji sieci glutenowej poprzez łączenie łańcuchów polipeptydowych między sobą i z innymi komponentami glutenowymi. LMW gluteniny typu B w swojej budowie I-rzędowej posiadają 8 reszt cysteinowych, z czego dwie znajdują się w regionach terminalnych i biorą udział w tworzeniu glutenu. Ze względu na różne aminokwasy (metioninę, serynę lub izoleucynę) występujące w pierwszej pozycji N-terminalnej domeny można wyróżnić trzy typy podjednostek gluteninowych, tj. LMW-m,

LMW-s oraz LMW-i. W grupie LMW-m występują trzy sekwencje nukleotydowe w regionie N-terminalnej domeny METSHIPGL-, METSRIPGL-, lub METSCIPGL-. W przypadku grupy LMW-s sekwencja nukleotydowa zawiera układ SHIPGL-, natomiast w grupie LMW-i ISQQQQ (Gianibelli i in., 2001). LMW białka gluteninowe typu C na elektroforeogramach żeli poliakrylamidowych charakteryzują się zbliżoną migracją do  $\alpha$ - i  $\gamma$ -gliadyn oraz obecnością w domenach końcowych jednej cząsteczki cysteiny, która umożliwia tworzenie międzycząsteczkowych wiązań dwusiarczkowych (Redaelli i in., 1995; Gianibelli i in., 2001; Cloutier i in., 2001; Ikeda i in., 2002; D'Ovidio i Masci, 2004). W zakresie ruchliwości w żelu poliakrylamidowym oraz pod względem N-terminalnej budowy, grupa LMW glutenin typu D podobna jest do ubogich w siarkę  $\omega$ -gliadyn (Jackson i in. 1983; Masci i in., 1993 i 2000; D'Ovidio i in., 1997 i 1999, Bean i Lookhart, 2000). Białka gluteninowe typu D posiadają nieparzystą liczbę reszt cysteinowych, ponadto tylko jedna reszta cysteiny może brać udział w tworzeniu międzycząsteczkowych wiązań dwusiarczkowych uniemożliwiając wydłużenie łańcucha polimeru glutenu. Ma to w konsekwencji niekorzystny wpływ na wytrzymałość ciasta poprzez tendencję do zmniejszania się średniej masy cząsteczkowej frakcji gluteninowej (Shewry i Tatham, 1997; Gianibelli i in., 2001).

Synteza LMW białek gluteninowych jest kontrolowana przez geny zlokalizowane na krótkich ramionach pierwszej i szóstej grupy chromosomów homeologicznych w *loci Glu-3*, które są ściśle związane z *loci Gli-1* i *Gli-2*, gdzie znajdują się geny kodujące  $\alpha$ -,  $\gamma$ - i  $\omega$ -gliadyny (Masci i in., 2002; D'Ovidio i Masci, 2004). Dotychczas scharakteryzowano szesnaście wariantów allelicznych genów kodujących LMW białka gluteninowe w lokus *Glu-A3* (allele: *Glu-A3a* - *Glu-A3p*), dwadzieścia pięć w lokus *Glu-B3* (allele: *Glu-B3a* - *Glu-B3y*) oraz dziesięć w lokus *Glu-D3* (allele: *Glu-D3a* - *Glu-D3i*). Ostatnio zidentyfikowano dwa geny kodujące LMW białka gluteninowe typu-m oraz 4 geny kodujące LMW typu-i zlokalizowane w *locus Glu-A3*. W obrębie *locus Glu-B3* scharakteryzowano 3 geny odpowiedzialne za kodowanie LMW białek gluteninowych typu-s oraz 3 geny kodujące typ LMW-m. Dodatkowo w *loci Glu-D4* oraz *Glu-D5* zidentyfikowano dwa geny odpowiedzialne za kodowanie LMW podjednostek gluteninowych na chromosomach 1D oraz 7D (Sreeramulu i Singh, 1997; Gianibelli i in., 2001). W ostatniej pracy Zhanga i in. (2013) opisano gen odpowiedzialny za kodowanie LMW typu-s oraz siedem genów kodujących LMW typu-m.

#### **Metody identyfikacji niskocząsteczkowych białek gluteninowych**

W identyfikacji LMW białek gluteninowych podobnie jak w przypadku pozostałych białek glutenowych stosuje się szereg metod elektroforetycznych, chromatograficznych i molekularnych. Do oznaczania określonych podjednostek gluteninowych wchodzących w skład polimeru glutenowego rutynowo stosowana jest elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w środowisku kwaśnym (metoda A-PAGE) lub z dodatkiem siarczanu dodecylsodowego (metoda SDS-PAGE). Szybkość migracji białek gluteninowych podczas elektroforezy SDS-PAGE jest zależna od wielkości masy cząsteczkowej. Na podstawie ruchliwości elektroforetycznej określone są poszczególne podjednostki gluteninowe, które na elektroforegramach lokują się w odpowiednich grupach białkowych: A, B, C lub D zgodnie z wielkością ich mas cząsteczkowych. Na podstawie obrazów

elektroforetycznych wyróżniono 20 charakterystycznych obrazów LMW białek gluteninowych. Poszczególne LMW podjednostki gluteninowe oznaczono kolejnymi literami alfabetu łacińskiego a-f (Gupta i Shephard, 1990 a, 1990 b; Wang, 2010). Dla zdefiniowanych wariantów allelicznych genów kodujących LMW gluteniny zaproponowano 14 światowych odmian pszenicy jako wzorce poszczególnych alleli (tab. 1).

Tabela 1

**Wzorcowe odmiany pszenicy reprezentujące geny kodujące poszczególne warianty alleliczne LMW podjednostek gluteninowych**  
**Standard wheat varieties representing different allelic variants of LMW glutenin subunits**

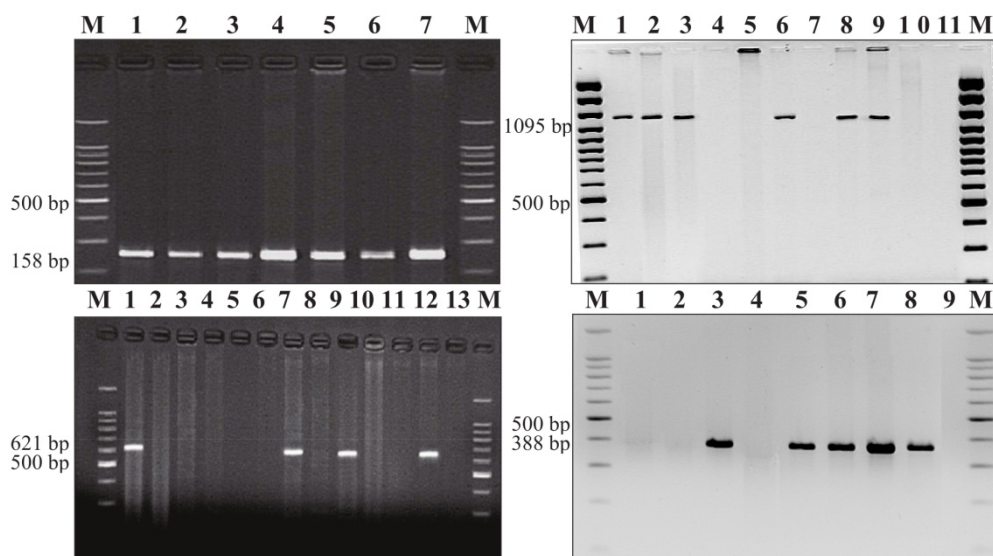
Odmiana: Cultivar:	Allel			Pochodzenie: Seed source:
	<i>Glu-A3</i>	<i>Glu-B3</i>	<i>Glu-D3</i>	
Cheyenne	c	e	-	U.S.A.
Chinese Spring	a	a	a	Chiny
Gabo	b	b	b	Australia
Glenlea	-	g	-	Kanada
Insygnia	e	c	c	Australia
Jufy-1	-	i	d	Belgia
Kharkov	e	g	a	Rosja
Kukri	-	h	b	Australia
Norin-61	-	i	d	Japonia
Norstar	c	b	b	Kanada
Orca	d	d	e	Francja
Radja	-	f	b	Francja
Rescue	f	h	a	Kanada
Thatcher	e	h	e	Kanada

LMW podjednostki gluteninowe lokujące się w grupie B na żelach poliakrylamidowych mogą dawać obraz składający się nawet z pięciu prążków białkowych, natomiast w grupie C obserwuje się do 3 pasm (Gupta i Shepherd, 1990 a i b; Gianibelli i in., 2001; Masci i in., 2002; Zientarski i Waga, 2007; Appelbee i in., 2009; Wang i in., 2009; Ram i in., 2011). W przypadku alleli *Glu-A3c* i *Glu-A3f* charakterystyczny jest obraz jednoprażkowy. Dotychczas tylko jeden gen *Glu-A3* kodujący LMW gluteniny nie ulega ekspresji co przejawia się brakiem produktów w rozdzielach SDS-PAGE (allel *Glu-A3e*). W przypadkach znacznej liczby podjednostek białkowych w obrębie jednego allelu proponowane jest przeprowadzanie dwukierunkowej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (Radaelli i in., 1995; Masci i in., 2002; Vaccino i in., 2002). Dwukierunkowa elektroforeza jest połączeniem dwóch technik polegających na rozdziale białek wg ciężaru cząsteczkowego w pierwszym etapie oraz punktu izoelektrycznego w drugim (Masci i in., 2002). Zastosowanie dwukierunkowanej elektroforezy przydatne jest szczególnie przy analizowaniu LMW glutenin typu C ze względu na podobną mobilność elektroforetyczną większości podjednostek białkowych oraz ich duże powinowactwo do białek gliadynowych typu  $\alpha$  i  $\gamma$ . Dzięki dużej rozdzielności tej metody oznaczono blisko 30 białek LMW glutenin oraz  $\alpha$ - i  $\gamma$ -gliadin (Masci i in., 2002; D'Ovidio i Masci, 2004; Muccilli i in., 2010; Wu i in., 2012).

Jedną z najnowszych technik wykorzystywanych do rozdziału i identyfikacji białek gluteninowych jest ultrasprawną chromatografię cieczą (RP-UPLC), (Yu i in., 2013). Ostatnie badania pozwoliły zidentyfikować pięć LMW podjednostek gluteninowych w lokus *Glu-A3* (*Glu-A3a*, *Glu-A3b*, *Glu-A3d*, *Glu-A3e*, *Glu-A3f*), siedem w lokus *Glu-B3* (*Glu-B3a*, *Glu-B3c*, *Glu-B3d*, *Glu-B3f*, *Glu-B3g*, *Glu-B3h*, *Glu-B3i*) oraz cztery w lokus *Glu-D3* (*Glu-D3a*, *Glu-D3b*, *Glu-D3d*, *Glu-D3f*), (Yu i in. 2013). Wcześniej Lew i współpracownicy (1992) podjęli próbę wstępnej charakterystyki LMW białek gluteninowych przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczą z odwróconymi fazami (RP-HPLC). Alternatywą dla metod chromatograficznych jest wysokosprawną elektroforeza kapilarna (HPCE), (Luccia i in., 2009; Herrero i in., 2010; Li i in., 2012). Znaczącą zaletą HPCE jest szybkość analizy (ok. 10–20 min), dokładność oraz niewielka ilość aplikowanej próbki (ok. 5 nl). Na podstawie tej metody Luccia i współpracownicy (2009) wyodrębnili 3 grupy (A, B i C) białek gluteninowych. Charakterystyczne piki odpowiadające LMW podjednostkom gluteninowym stanowiły grupę białkową A, natomiast grupy B i C przedstawiały obrazy HMW podjednostek gluteninowych typu x i y. Podobne badania prowadził zespół Muccilli (2010) i Li (2012), którzy przy pomocy HPCE scharakteryzowali większość LMW podjednostek gluteninowych.

Rozwój wiedzy na temat białek glutenowych i doskonalenie technik ich identyfikacji przyczynił się do projektowania markerów molekularnych umożliwiających jednoznaczny identyfikację genów kodujących LMW gluteniny oraz ich warianty alleliczne. Badania nad odmianą Chinese Spring i jej null-tetrasomicznymi liniami, pozwoliły opracować specyficzne pary starterów dla pięciu alleli genu *Glu-A3*: *Glu-A3a*, *Glu-Ad*, *Glu-Ae*, *Glu-A3f* oraz *Glu-A3g*. Ze względu na obecność polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) w powtarzalnej sekwencji regionu w allelu *Glu-A3b*, zaprojektowanie markerów dla tego wariantu było niemożliwe. Identyfikacja tego allelu wymaga zastosowania markerów *gluA3abc*, *gluA3ac* lub *gluA3a* (Zhang i in., 2004). Również w celu identyfikacji allelu *Glu-A3c* należy zastosować dwie pary starterów: *gluA3ac* i *gluA3a* ponieważ allelospecyficzne SNP-y nie mogą być zidentyfikowane w odniesieniu do pozostałych sześciu alleli *Glu-A3* (Zhang i in., 2004). W innych badaniach w oparciu o odmianę pszenicy Aroona i jej pięć izogenicznych linii z allelami (*Glu-A3a*, *Glu-A3b*, *Glu-A3d*, *Glu-A3e*, *Glu-A3f*) zaprojektowano pięć specyficznych markerów w obrębie genu *Glu-A3*. Na bazie odmiany Glenlea zaprojektowano marker *gluA3g* identyfikujący allel *Glu-A3g*. Trudności napotkano przy projektowaniu allelospecyficznego markera dla *Glu-A3c*. Dla identyfikacji tego allelu należy zastosować pary starterów *gluAac* i *gluAa* (Wang i in., 2010). Bazując na odpowiednich sekwencjach alleli oraz na pojedynczych nukleotydowych polimorfizmach w obrębie genu *Glu-B3* zaprojektowano 10 zestawów starterów różnicujących allele: *Glu-B3a* - *Glu-B3h* (Wang i in., 2009). Również w tym przypadku markery zaprojektowano w oparciu o linie izogeniczne Aroona oraz odmiany Cheyenne i Aroona. W latach 2006 i 2007 Zhao i współpracownicy korzystając z sześciu pszenno-żytnich translokacyjnych linii, czterech izogenicznych linii Aril oraz rodziców Aroona opracowali zestaw czterech par starterów różnicujących allele w loci *Glu-D3*. Pierwszy zestaw starterów daje ten sam produkt dla genotypów z allelami: *Glu-D3a*, *Glu-D3b*, *Glu-D3d*, *Glu-D3g* oraz *Glu-D3j*. Druga para pozwala na odróżnienie alleli: *Glu-D3c*,

*Glu-D3e*, *Glu-D3k* i *Glu-D3i* od pozostałych wariantów genu *Glu-D3*. Trzeci zestaw markerów amplifikuje charakterystyczny produkt dla wariantu *Glu-D3c*. Ostatni zestaw starterów służy do identyfikacji dwóch alleli: *Glu-D3g* i *Glu-D3j*. Późniejsza praca zespołu Appelbee (2009) wykazała, że marker ten daje ten sam produkt również w przypadku obecności alleli *Glu-D3g*, *Glu-D3i* oraz *Glu-D3k*. Powodzenie techniki PCR w rutynowym oznaczeniu poszczególnych podjednostek LMW glutenin pszenicy zależy od liczby dostępnych markerów molekularnych umożliwiających identyfikację określonych alleli dla których zostały zaprojektowane. Przykładowe rozdziały elektroforetyczne produktów PCR z wykorzystaniem wybranych markerów molekularnych przedstawiono na rysunku 2 a-d.



Rys. 2 a-d. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów PCR w 1,5% żelu agarozowym z wykorzystaniem allelospecyficznych markerów. M – 100bp DNA Ladder (Promega). Rys. 2a: marker LA1F/SA5R, allel *Glu-A3e* – 158 bp. Rys. 2b: marker SB1F/SB1R, allel *Glu-B3a* – 1095 bp. Rys. 2c: marker SB9F/SB9R, allel *Glu-B3i* – 621 bp. Rys. 2d: marker S13F2/S13R1, allel *Glu-D3ceki* – 388 bp, (dane własne)

Fig. 2 a-d. Electrophoresis of PCR products on 1.5 % agarose gel using four allele-specific markers. M – 100bp DNA Ladder (Promega). Fig. 2a: marker LA1F/SA5R, allele *Glu-A3e* – 158 bp. Fig. 2b: marker SB1F/SB1R, allele *Glu-B3a* – 1095 bp. Fig. 2c: marker SB9F/SB9R, allele *Glu-B3i* – 621 bp. Fig. 2d: marker S13F2/S13R1, allele *Glu-D3ceki* – 388 bp (own data)

### Wpływ glutenin niskocząsteczkowych na jakość wypiekową pszenicy

Analiza składu jakościowo-ilościowego LMW glutenin w powiązaniu z jakością końcową mąki pszennej pozwoliły określić wpływ tej frakcji białkowej na wartość poszczególnych parametrów technologicznych oraz jakość wypiekową pszenicy (Li i in., 2010; van der Zalm i in., 2011; Hernandez i in., 2012).

W ostatnich latach wykazano, że *loci Glu-A3* korzystnie wpływa na lepko-sprężyste właściwości, natomiast podjednostki gluteninowe kodowane przez *loci Glu-B3* w znacznym stopniu wpływają na parametry mechaniczne ciasta (czas miesienia ciasta w miksografie, wytrzymałość ciasta, stosunek pracy i wytrzymałości ciasta) oraz wskaźnik sedymentacji Zeleny'ego (Tsenov i in., 2010; Figueroa i in., 2011; Hernandez i in., 2012). Obecność LMW glutenin *Glu-A3b*, *Glu-B3b*, *Glu-D3b* poprawia rozciągliwość ciasta (Cronish i in., 1993). Allel *Glu-A3b* pozwala osiągnąć dobry wskaźnik sedymentacyjny Zeleny'ego, jednak nie wpływa na parametry miesienia i elastyczność ciasta w porównaniu do pozostałych wariantów genu *Glu-A3* (Liang i in., 2010). W chińskich odmianach pszenicy stwierdzono istotny wpływ allelu *Glu-A3d* na jakość ciasta (He i in., 2005). Inne badania dowodzą, że podjednostki *Glu-A3a* oraz *Glu-A3b* mają pozytywny wpływ na parametry miksograficzne opisujące tolerancję na nadmieszanie (Li i in., 2010). W 2013 roku Jin i współpracownicy podjęli próbę określenia wpływu poszczególnych LMW glutenin na właściwości technologiczne istotne w produkcji tradycyjnego surowego makaronu oraz chleba przygotowywanego na parze. W tym celu przeprowadzili analizy miksograficzne i na podstawie otrzymanych wyników uporządkowali allele genów *Glu-A3*, *Glu-B3* i *Glu-D3*, które najkorzystniej wpływały na wartości parametrów miksograficznych. Stwierdzili, że późny czas przełamania krzywej miksograficznej (peak time) świadczący o dużej sile ciasta związany był z obecnością alleli: *Glu-A3b=Glu-A3d>Glu-A3f>Glu-A3c>Glu-A3e*. Podobnie na wysokość przełamania krzywej (peak height) korzystnie wpływały następujące allele: *Glu-A3e=Glu-A3b=Glu-A3c=Glu-A3f>Glu-A3d*. Luo (2001) i Liang (2010) wykazali, że za wysokie wartości parametrów reologicznych, a przede wszystkim siły ciasta odpowiadają allele: *Glu-B3b* i *Glu-B3g*. Dodatkowo badania Li (2010) wskazują na wysokie korelacje między obecnością allelu *Glu-B3b* a dużą zawartością białka, twardością ziarna i wskaźnikiem sedymentacyjnym Zeleny'ego. Zaobserwowano, że podjednostka *Glu-B3b* korzystnie wpływająca na siłę glutenu oraz na czas tworzenia ciasta występuje dwa razy rzadziej niż podjednostka *Glu-B3i*, która gorzej wpływa na jakość technologiczną ciasta w chińskich odmianach pszenicy. Podobną zależność zaobserwowano pod względem allelu *Glu-B3d*, który dobrze wpływa na właściwości reologiczne pszenicy, jednak występuje rzadziej. Zaobserwowano również, że allel *Glu-B3h* występuje tylko w odmianach jarych, w przeciwieństwie do allelu *Glu-B3a*, który najczęściej jest obecny w pszenicach ozimych. Wykazano, że pszenice z allelem *Glu-A3e* i *Glu-B3j* charakteryzują się niskim współczynnikiem relaksacji naprężeń, wskaźnikiem sedymentacyjnym Zeleny'ego oraz krótkim czasem miesienia. Korzystne wartości tych parametrów wg Hernandez i współautorów (2012) związane są z obecnością alleli: *Glu-A3b*, *Glu-A3c*, *Glu-B3d*, *Glu-B3h* oraz *Glu-B3g*. Analiza LMW podjednostek gluteninowych kodowanych w genomie D wykazała, że na siłę i elastyczność ciasta wpływają kolejno allele: *Glu-D3f>Glu-D3a=Glu-D3d>Glu-D3c=Glu-D3b* oraz *Glu-D3d>Glu-D3f>Glu-D3c=Glu-D3b>Glu-D3a*. Stwierdzono, że dla produkcji makaronu najkorzystniej wpływają allele: *Glu-A3c*, *Glu-B3b* lub *Glu-B3d* oraz *Glu-D3c* pod względem gładkości oraz koloru produktu. Natomiast przy produkcji chleba najlepsze właściwości technologiczne związane są obecnością LMW białek gluteninowych kodowanych przez allele: *Glu-A3c* lub *Glu-A3e*, *Glu-B3b* i *Glu-D3c* (Jin i in., 2013).



## PODSUMOWANIE

Niskocząsteczkowe i wysokocząsteczkowe gluteniny należą do najważniejszych białek zapasowych pszenicy. Dzięki charakterystycznej budowie fizykochemicznej biorą one udział w tworzeniu struktury glutenu, który nadaje pożądane właściwości technologiczne mące pszennej. Znajomość składu jakościowo-ilościowego HMW białek gluteninowych jest szeroko wykorzystywana w programach hodowlanych jako wskaźnik jakości pszenicy. Wraz z szybkim rozwojem coraz nowszych metod badawczych zwiększa się wiedza odnośnie roli i znaczenia LMW frakcji gluteninowej pszenicy. Ze względu na duży udział glutenin niskocząsteczkowych we frakcji białek zapasowych pszenicy oraz wpływ na wartość technologiczną mąki pszennej, mogą być istotnym wskaźnikiem jakości wypiekowej pszenicy. Pogłębiona wiedza na temat tych białek pozwoli korzystniej dobrać komponenty rodzicielskie do krzyżowań co znacznie skróci proces hodowli odmian o pożądanych parametrach technologicznych spełniających wysokie wymagania w przemyśle spożywczym (Vaccino i in., 2002; Zientarski i Waga, 2007; Si i in., 2012; Zhang i in., 2013).

## LITERATURA

- Appelbee M., Mekuria G., Nagasandra V., Bonneau J., Eagles H., Eastwood R., Mather D. 2009. Novel allelic variants encoded at the *Glu-D3* locus in bread wheat. *J. Cereal Sci.* 49: 254 — 261.
- Bean, S.R., Lookhart, G.L. 2000. Ultrafast capillary electrophoresis analysis of cereal storage proteins and its applications to protein characterization and cultivar differentiation. *J. Agric. Food Chem.* 48: 344 — 353.
- Cloutier S., Rampitsch C., Penner G., Lukow O. 2001. Cloning and expression of a LMW-i glutenin gene. *J. Cereal Sci.* 33: 143 — 154.
- Cornish G., Burridge P., Palmer G., Wrigley C. 1993. Mapping the origins of some HMW and LMW glutenin subunit alleles in Australian germplasm. *Proc. 42nd Aust. Cereal Chem. Conf.*, Sydney, pp 255 — 260.
- D'Ovidio R., Simeone M., Masci S., Porceddu E. 1997. Molecular characterization of a LMW-GS gene located on chromosome 1B and the development of primers specific for the *Glu-B3* complex locus in durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* 95: 1119 — 1126.
- D'Ovidio R., Marchitelli C., Ercoli Cardelli L., Porceddu E. 1999. Sequence similarity between allelic *Glu-B3* genes related to quality properties of durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* 98: 455 — 461.
- D'Ovidio R., Masci S. 2004. The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *J. Cereal Sci.* 39: 321 — 339.
- Figuroa J., Peña R., Rayas-Duarte P., Khan K. 2011. Kernel elastic properties and sedimentation: influence of high and low molecular weight glutenin allelic composition. *Cereal Chem.* 88: 41 — 44.
- Gale K. 2005. Diagnostic DNA markers for quality traits in wheat. *J. Cereal Sci.* 41: 81 — 192.
- Gianibelli M., Larroque O., MacRitchie F., Wrigley C. 2001. Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. *Cereal Chem.* 78: 635 — 646.
- Gupta R., Shepherd K. 1990a. Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of gluten. 1 Variation and genetic control of subunits in hexaploid wheats. *Theor. Appl. Genet.* 80: 65 — 74.
- Gupta R., Shepherd K. 1990b. Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of gluten. 2 Genetic control of the subunits in species related to wheat. *Theor. Appl. Genet.* 80: 183 — 187.
- He Z., Liu L., Xia X., Liu J., Peña R. 2005. Composition of HMW and LMW glutenin subunits and their effects on dough properties, pan bread, and noodle quality of Chinese bread wheats. *Cereal Chem.* 82: 345 — 350.
- Hernández Z., Figuroa J., Rayas-Duarte P., Martínez-Flores H., Arámbula G., Luna G., Peña R. 2012. Influence of high and low molecular weight glutenins on stress relaxation of wheat kernels and the relation to sedimentation and rheological properties. *J. Cereal Sci.* 55: 344 — 350.

- Herrero M., Garcia-Canas V., Simo C., Cifuentes A. 2010. Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and foodomics. *Electrophoresis* 31: 205 — 228.
- Ikeda T., Nagamine T., Fukuoka H., Yano H. 2002. Identification of new low-molecular-weight glutenin subunit genes in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 104: 680 — 687.
- Jackson E.A., Holt L.M., Payne P.I., 1983. Characterisation of high-molecular-weight gliadin and low-molecular-weight glutenin subunits of wheat endosperm by two-dimensional electrophoresis and chromosomal localisation of their controlling genes. *Theor. Appl. Genet.* 66: 29 — 37.
- Jin H., Zhang Y, Li G., Mu P., Fan Z., Xia X., He Z. 2013. Effects of allelic variation of HMW-GS and LMW-GS on mixograph properties and Chinese noodle and steamed bread qualities in a set of Aroona near-isogenic wheat lines. *J. Cereal Sci.* 57: 146 — 152.
- Lew E., Kuzmicky D., Kasarda D. 1992. Characterization 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.
- Li J., Wang S., Yu Z., Li X., Guo G., Feng S., Mab W., Yan Y. 2012. Optimization and development of capillary electrophoresis for separating and identifying wheat low molecular weight glutenin subunits. *J. Cereal Sci.* 55: 254 — 256.
- Li Y, Zhou R, Branlard G, Jia J. 2010. Development of introgression lines with 18 alleles of glutenin subunits and evaluation of the effects of various alleles on quality related traits in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Cereal Sci.* 51: 127 — 133.
- Liang D., Tang J., Pena J., Singh R., He X., Shen X., Yao D., Xia X., He Z. 2010. Characterization of CIMMYT bread wheats for high and low-molecular weight glutenin subunits and other quality-related genes with SDS-PAGE, RP-HPLC and molecular markers. *Euphytica* 172: 235 — 250.
- Luccia A., Lamacchia C., Mamone G., Picariello G., Trani A., Masi P., Addeo F. 2009. Application of capillary electrophoresis to determine the technological properties of wheat flours by a glutenin index. *J. Food Sci.* 74 (4): 307 — 311.
- Luo C., Griffin W., Branlard G., McNeil D. L. 2001. Comparison of low- and high molecular-weight wheat glutenin alleles effects on flour quality. *Theor. Appl. Genet.* 102: 1088 — 1098.
- Masci S., Lafiandra D., Porceddu E., Lew E. J. L., Tao H.P., Kasarda D. D. 1993. D glutenin subunits: N-terminal sequences and evidence for the presence of cysteine. *Cereal Chem.* 70: 581 — 585.
- Masci S., D'Ovidio R., Lafiandra D., Kasarda D.D. 2000. A 1B-coded low-molecular-weight glutenin subunits associated with quality in durum wheats shows strong similarity to a subunit present in some bread wheat cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 100: 396 — 400.
- Masci S., Rovelli L., Kasarda D., Vensel W., Lafiandra D. 2002. Characterization and chromosomal localization of C-type low-molecular-weight glutenin subunits in the bread wheat cultivar Chinese Spring. *Theor. Appl. Genet.* 104: 422 — 428.
- Muccilli V., Cunsolo V., Saletti R., Foti S., Margiotta B., Scossa F., Masci S., Lafiandra D. 2010. Characterization of a specific class of typical low molecular weight glutenin subunits of durum wheat by a proteomic approach. *J. Cereal Sci.* 51: 134 — 139.
- Ram S., Sharma S., Verma A., Singh Tyagi B., Peña R. 2011. Comparative analyses of LMW glutenin alleles in bread wheat using allele-specific PCR and SDS-PAGE. *J. Cereal Sci.* 54: 488 — 493.
- Redaelli R., Morel M., Autran J., Pogna N. 1995. Genetic analysis of low Mr glutenin subunits fractionated by two-dimensional electrophoresis (A-PAGE x SDS PAGE). *J. Cereal Sci.* 21: 5 — 13.
- Shewry P.R., Tatham A.S. 1997. Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *J. Cereal Sci.* 25: 207 — 227.
- Si H., Gao Y., Liu F., Li Z., Ma C. 2012. Distribution of low-molecular-weight glutenin subunit *Glu-B3* alleles in mini core collections of Chinese wheat germplasm. *AJCS* 6: 1390 — 1394.
- Sreeramulu G., Singh N. 1997. Genetic and biochemical characterization of novel low molecular weight glutenin subunits in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome* 40: 41 — 48.
- Tsenov N., Atanasova D., Todorov I., Ivanova I., Stoeva I. 2010. Quality of winter common wheat advanced lines depending on allelic variation of *Glu-A3*. *Cereal Res. Commun.* 38: 250 — 258.
- Vaccino P., Redaelli R., Metakovsky E., Borghi B., Corbellini M., Pogna N. 2002. Identification of novel low Mr glutenin subunits in the high quality bread wheat cv. Salmone and their effects on gluten quality. *Theor. Appl. Genet.* 105: 43 — 49.

- Wu M., Giersch T., McKay S., Schofield P., Skylas D., Cornish G., Hegedus E., Chin J. 2012. A novel hardness-related and starch granule-associated protein marker in wheat: LMW-GS-‘S’. *J. Cereal Sci.* 55: 153 — 159.
- Wang L., Li G., Peña R., Xia X., He Z. 2010. Development of STS markers and establishment of multiplex PCR for *Glu-A3* alleles in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Cereal Sci.* 51: 305 — 312.
- Wang L., Zhao X., He Z., Ma W., Appels R. Peña R., Xia X. 2009. Characterization of low-molecular-weight glutenin subunits *Glu-B3* genes and development of STS markers in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 118: 525 — 539.
- Yu Z., Han C., Yan X., Li X., Jiang G., Yan Y. 2013. Rapid characterization of wheat low molecular weight glutenin subunits by ultraperformance liquid chromatography (UPLC). *J. Agric. Food Chem.* 61: 4026 — 4034.
- van der Zalm E., van der Goot A., Boom R. 2011. Quality of shear fractioned wheat gluten - comparison to commercial vital wheat gluten. *J. Cereal Sci.* 53: 154 — 159.
- Zhang W., Gianibelli M., Rampling L., Gale K. 2004. Characterization and marker development for low molecular weight glutenin genes from *Glu-A3* alleles of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 108: 1409 — 1419.
- Zhang X., Liu D., Zhang J., Jiang W., Luo G., Yang W., Sun J., Tong Y., Cui D., Zhang A., 2013. Novel insights into the composition, variation, organization, and expression of the low-molecular-weight glutenin subunit gene family in common wheat. *J. Exp. Bot.*, 64: 2027 — 2040.
- Zhao X., Xia X., He Z., Gale K., Lei Z., Appels R., Ma W. 2006. Characterization of three low-molecular-weight *Glu-D3* subunit genes in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 113: 1247 — 1259.
- Zhao X., Xia X., He Z., Lei Z., Appels R., Yang Y., Sun Q., Ma W. 2007. Novel DNA variations to characterize low molecular weight glutenin *Glu-D3* genes and develop STS markers in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 114: 451 — 460.
- Zientarski J., Waga J. 2007. Białka gluteninowe o niskiej masie cząsteczkowej jako markery biochemiczne w hodowli pszenicy. *Biul. IHAR* 244: 69 — 77.