

JACEK WAGA
STANISŁAW WĘGRZYN
DANUTA BOROS¹
ANDRZEJ CYGANKIEWICZ

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Krakowie

¹ Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

Wykorzystanie orkisz (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) do poprawy właściwości odżywczych pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare*)*

Utilization of spelt wheat (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) for improving the nutritional qualities of common wheat (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare*)

Z uwagi na niską zawartość pewnych składników biochemicznych ziarna wartość odżywcza pszenicy jest gorsza w porównaniu z innymi gatunkami roślin uprawnych. Przyjęto założenie, iż tę cechę można poprawić przenosząc geny kodujące białka gliadynowe z *Tr. spelta* do *Tr. vulgare*. Spośród mieszańców orkisz i odmiany Elena wyprowadzono linie bliskoizogeniczne różniące się niektórymi podjednostkami należącymi do grupy ω -gliadyn. Dla uzyskanych linii określono: procentową zawartość białka ogółem, liczbę sedymentacji, skład aminokwasów, zawartość kationów cynku, żelaza i magnezu oraz właściwości immunochemiczne na podstawie testu ELISA. Stwierdzono, iż orkisz jest cennym źródłem genów odpowiedzialnych za wartość odżywczą. Związek ω -gliadyn orkisz ze zmiennością wartości odżywczej sugeruje, iż mogą one być wykorzystane jako markery genów odpowiedzialnych za tę cechę. Z drugiej strony, jeżeli przyjmiemy wynik testu ELISA jako wskaźnik toksyczności gliadyn w przypadku celiakii, to okazuje się, że orkisz jest najbardziej toksyczny w porównaniu do innych analizowanych form pszenicy. Badano też mąkę, z której gliadyny usunięto drogą ekstrakcji izopropanolem. Obserwowano znaczne pogorszenie właściwości wypiekowych zmodyfikowanego materiału przy jednoczesnym obniżeniu jego właściwości alergicznych.

Słowa kluczowe: analiza elektroforetyczna, celiakia, toksyczność gliadyn, wartość odżywcza, właściwości wypiekowe

Because of deficiencies in some important biochemical components the nutritional value of wheat is lower than that of other important crops. Improvement of these traits could be achieved by

* Pracę wykonano w ramach projektu badawczego Nr 6 PO6 A 016 15 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych w latach 1998–2001.

transferring genes coding specific storage proteins from some spelt to the common wheat. Some near isogenic lines were derived from the cross combination between a spelt and the Elena wheat cultivar, differing in individual ω -gliadin subunits. For these genotypes protein content, sedimentation value, amino acid composition, zinc, iron and magnesium content as well as some immunochemical properties of gliadins by the ELISA test were analyzed. Spelt wheat turned out to be a valuable source of traits important from the nutritional standpoint. Moreover, the relationships between the spelt specific ω -gliadins and variability of nutritional value suggests that the identified protein subunits could be used as markers of genes responsible for this trait. On the other hand, if we take the results of ELISA test as an indicator of gliadin toxicity for the afflicted with coeliac, it follows that spelt is the most toxic among analyzed wheat forms. Chemically modified „nongliadin” wheat flour samples were also analyzed. Decreasing of baking quality as well as allergenic properties was observed.

Key words: baking quality, coeliac, electrophoretic analysis, gliadin toxicity, nutritional value

WSTĘP

Wartość odżywcza białka ziarna pszenicy (*Triticum aestivum* sp. *vulgare*) jest niższa w porównaniu z białkiem ziarna innych gatunków zbóż: jęczmienia, owsa, żyta, ryżu, wykorzystywanych do produkcji żywności. Jest to związane z niską zawartością lizyny, a także innych aminokwasów egzogennych (Rakowska i in., 1978). Średnia procentowa zawartość białka, mimo dużych wahań u różnych odmian pszenicy w granicach od 8% do 15%, jest jednak wyższa aniżeli u wymienionych gatunków zbóż. Ziarno pszenicy, głównie w jego części bielkowej, jest materiałem ubogim pod względem zawartości mikroelementów. Ponadto białka zapasowe pszenicy — głównie gliadyny — mają właściwości toksyczne w przypadku osób z nietolerancją glutenu, czyli chorych na celiakię. Dlatego wytworzenie genotypu pszenicy o poprawionej wartości pokarmowej jest problemem nie tylko interesującym, lecz przede wszystkim ważnym.

Z doniesień literatury wynika, iż jeden z podgatunków pszenicy heksaploidalnej — orkisz (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) — charakteryzuje się korzystniejszym składem biochemicznym ziarna w porównaniu do form uprawnych *Tr. vulgare* (Piergiorgianni i in., 1996; Ranhortra i in., 1995; Ranhortra i in., 1996; Campbell, 1997). Pojawiały się nawet opinie, że pieczywo z orkiszu jest tolerowane przez osoby cierpiące na różne rodzaje alergii, w szczególności alergię na produkty spożywcze pochodzenia pszenne (Campbell, 1997). Dzięki tym właściwościom orkisz mógłby stać się źródłem cennych genów dla hodowli odmian pszenicy o poprawionych właściwościach odżywczych i zdrowotnych.

Z drugiej strony orkisz charakteryzuje szereg cech typowych dla dzikich gatunków pszenicy, takich jak: łamliwa osadka kłosowa, słaba wymłacalność, czy też znaczna wysokość roślin i dlatego jest on trudny do uprawy na szeroką skalę (Campbell, 1997). Trudności związane z produkcją ziarna orkiszowego, a następnie przerobu uzyskanego surowca powodują, że jego rozpowszechnienie jest niewielkie, a cena z uwagi na właściwości odżywcze bardzo wysoka.

Stwierdzono, iż niekorzystne działanie gliadyn spowodowane jest obecnością tetrapeptydów repetytywnych (QQQP oraz PSQQ) w niektórych regionach polipeptydu (Kasarda i in., 1998). Modyfikacja składu białek zapasowych polegająca na eliminacji tych

tetrapeptydów powinna znacznie ograniczyć ich alergenne działanie w przypadku osób uczulonych na gluten.

W niniejszej pracy chcieliśmy stwierdzić, czy przeniesienie białek gliadynowych z orkiszu do form uprawnych *Tr. vulgare* może wpłynąć na poprawę wartości odżywczej i zdrowotnej ziarna pszenicy.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny

Odmiany uprawne pszenicy ozimej

Z kolekcji roboczej pszenicy ozimej wybrano cztery odmiany: Begra, Elena, Sakwa i Zyta, które wykorzystano w badaniach jako wzorce obrazu elektroforetycznego, a ponadto jako surowiec niezbędny do uzyskania mąki „bezgliadynowej”.

Mieszance pokolenia F₂

Badano 217 pojedynków roślinnych pokolenia F₂ uzyskanych z kombinacji krzyżówkowej odmiany orkiszu Oberkummler Rotkorn i odmiany uprawnej Elena. Dla każdego osobnika wykonano oznaczenie procentowej zawartości białka ogółem, liczby sedymentacji, a także określono masę tysiąca ziaren.

Zestaw linii bliskoizogenicznych

Zestaw obejmował 62 linie bliskoizogeniczne, w obrębie których zidentyfikowano trzy biotypy. Został on utworzony drogą selekcji podlinii z linii wywodzącej się od jednego mieszańca F₃ (odmiany Elena z orkiszem). Biotypy różniły się między sobą budową fizykochemiczną białek z grupy ω-gliadyn, natomiast linie w obrębie biotypu były jednolite pod względem tej cechy.

Modyfikacje białek zapasowych — chemiczna eliminacja gliadyn

Skład białek zapasowych modyfikowano eliminując gliadyny 50% izopropanolem. Mąkę wybranych odmian traktowano roztworem izopropanolu w stosunku objętościowym 5:1 (izopropanol: mąka). Ekstrakcję prowadzono w temperaturze 50° C dwukrotnie po osiem godzin, a następnie mieszaninę wirowano przez 10 minut przy prędkości 5000 rpm (wirówka Eppendorf Centrifuge 5810). Mąkę po ekstrakcji suszono w temperaturze 30° C przez jedną dobę, kruszono i mielono w młynku laboratoryjnym.

Analiza elektroforetyczna białek zapasowych

Białka zapasowe analizowano metodami rozdziału elektroforetycznego na żelu poliakrylamidowym. Gliadyny rozdzielano metodą kwaśnej elektroforezy natywnej (A PAGE), a uzyskane obrazy elektroforetyczne interpretowano według metody opracowanej przez autora projektu (Bushuk i Zillman, 1978; Waga, 2000). Gluteniny analizowano metodą elektroforezy w środowisku zasadowym z dodatkiem soli sodowej siarczanu dodecyłu (SDS PAGE) (Laemmli, 1972).

Analiza jakości technologicznej

Procentowa zawartość białka ogółem

Procentową zawartość białka ogółem w ziarniakach określano metodą NIR przy użyciu aparatu Infratec 1255 firmy Tecator, w którym wartość badanej cechy jest funkcją ilości pochłoniętego promieniowania elektromagnetycznego w zakresie bliskiej podczerwieni.

Liczba sedymentacji

Wskaźnik sedymentacji oznaczono testem Zeleny'ego z użyciem kwasu mlekowego oraz tym samym testem w mikroskali z dodatkiem soli sodowej siarczanu dodecyłu (Zeleny i in., 1960; Cygankiewicz, 1997).

Wypiek laboratoryjny

Wypieki laboratoryjne wykonywano w warunkach standardowych ze 100 g mąki w piecu laboratoryjnym firmy Labor-Mim. Wykonywano pomiar objętości wypieku badanych prób, a następnie określano porowatość miękiszu wg tablic Dallmana.

Analiza wartości odżywczej

Ziarno uzyskane z 62 linii bliskoizogenicznych połączono w obrębie każdego z trzech biotypów. Otrzymane mieszaniny wraz z formami rodzicielskimi użyto do oznaczenia zawartości wybranych mikroelementów oraz składu aminokwasów.

Oznaczenie mikroelementów

Oznaczenie zawartości kationów trzech metali: żelaza, magnezu oraz cynku wykonano przy użyciu spektrofotometru absorpcji atomowej Varian Spekt. AA-20B.

Oznaczenie składu aminokwasów

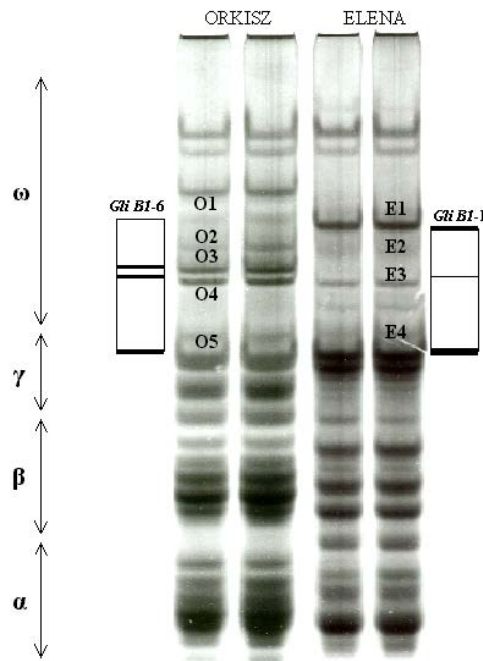
Skład aminokwasów oznaczono metodą chromatograficzną (Moore i Stein, 1963). Chromatogramy rejestrowano i integrowano za pomocą integratora Hewlett Packard 3396.

Analiza właściwości immunochemicznych gliadyn

Właściwości immunochemiczne prób mąki uzyskanej z mieszanek ziarna dwóch spośród trzech biotypów mieszańcowych oraz form rodzicielskich określono na podstawie testu ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). W analizie wykorzystywano królicze przeciwciała poliklonalne przeciwko gliadynie (Sigma Co., USA), a wynik reakcji immunoenzymatycznej odczytywano przy pomocy czytnika Microelisa Reader (Organon Teknika, Holandia) (Gregorek i in., 1994).

WYNIKI

Na obrazie elektroforetycznym w strefie białek ω -gliadynowych zidentyfikowano kilka podjednostek specyficznych dla orkisz, które oznaczono symbolami O1, O2, O3 i O4 (rys. 1). Prążków tych nie obserwowano u odmian uprawnych pszenicy zwyczajnej. W jednej z wcześniejszych prac wykazano, iż frakcje O1, O3 i O4 w połączeniu z frakcją O5 (należącą do grupy γ -gliadyn) są kodowane chromosomem 1B i tworzą blok białkowy o symbolu *Gli B1-6*. Jest on allelicznym wariantem bloku *Gli B1-1* (typowego dla odmiany Elena), który składa się z prążków oznaczonych symbolami: E1, E2, E3 i E4 (Waga, 2002, w druku).



Rys. 1. Porównanie białek ω -gliadynowych orkisz i odmiany Elena
 Fig. 1. Comparison of ω -gliadin subunits in spelt and the cultivar Elena

Określenie związku specyficznych ω -gliadyn orkisz ze zmiennością wybranych cech użytkowych

Charakterystyka genetyczna ω -gliadyn specyficznych dla orkisz umożliwiła określenie związku genetycznego tych frakcji białkowych ze zmiennością wybranych cech użytkowych: procentowej zawartości białka ogółem, liczby sedymentacji oraz masy tysiąca ziaren. Analizowano zarówno pojedynki roślinne pokolenia F_2 , jak i zestaw linii bliskoizogenicznych, pochodzących z kombinacji krzyżówkowej odmian Oberkummler Rotkorn i Elena.

Genotypy mieszańcowe różniące się pojedynczymi wariantami białkowymi porównywano parami. Analizowano zmienność średnich wartości badanych cech każdego genotypu z porównywanej pary. Genotypy zawierające blok *Gli B1-6* porównywano z genotypami zawierającymi blok *Gli B1-1*, natomiast genotypy u których obserwowano prążek E2 porównywano z genotypami zawierającymi prążek O2. Następnie rozpatrywano kombinacje dwóch allelicznych wariantów białkowych kodowanych przez loci *Gli B1* z prążkami O2 i E2 (*Gli B1-6/O2*, *Gli B1-6/E2*, *Gli B1-1/O2*, *Gli B1-1/E2*) (rys. 2). W pokoleniu F_2 rozpatrywano sześć, a wśród linii izogenicznych trzy kombinacje par badanych genotypów. Istotność zróżnicowania średnich wartości cech pomiędzy grupami oszacowano na podstawie testu t Studenta (tab. 1).

Tabela 1

Związek ω-gliadyn orkiszu ze zmiennością procentowej zawartości białka ogółem, liczby sedymentacji oraz masy tysiąca ziaren
Relationships between spelt specific ω-gliadin subunits and variability of protein content, sedimentation value and thousand kernels mass

Podjednostki białek gliadynowych Gliadin protein subunits	Pokolenie F2 Generation F2							Linie bliskoizogeniczne Near-isogenic lines						
	% białka %protein			LS		MTZ		% białka % protein			LS		MTZ	
	N	X	t	X	t	X	t	N	X	t	X	t	X	t
Gli B1-6	43	13,76	0,925	57,21	2,513*	52,43	1,155	33	14,74	4,802**	39,38	1,113	52,43	6,142**
Gli B1-1	46	14,01		49,7		53,92		29	13,89		41,17		46,71	
O2	160	14,09	3,156**	54,08	0,928	52,93	1,898	22	14,78	4,101**	40,27	0,083	52,38	4,364**
E2	49	13,4		52,12		54,43		38	14,03		40,13		48,08	
Gli B1-6/O2	32	13,92	1,071	59,03	1,056	52,38	0,124	22	14,78	1,251	40,27	0,998	52,38	0,069
Gli B1-6/E2	11	13,3		51,91		52,58		9	14,46		36,78		52,51	
Gli B1-6/O2	32	13,92	0,561	59,03	3,091**	52,38	0,772							
Gli B1-1/O2	34	14,08		49,21		53,61								
Gli B1-6/O2	32	13,92	0,241	59,03	1,953	52,38	1,126	22	14,78	4,684**	40,27	0,553	52,38	6,264**
Gli B1-1/E2	12	13,82		51,08		54,8		29	13,89		41,17		46,71	
Gli B1-6/E2	11	13,3	1,353	51,91	0,402	52,58	0,702							
Gli B1-1/O2	34	14,08		49,21		53,61								
Gli B1-6/E2	11	13,3	0,802	51,91	0,115	52,58	1,079	9	14,46	2,29*	36,78	1,294	52,51	2,964*
Gli B1-1/E2	12	13,82		51,08		54,8		29	13,89		41,17		46,71	
Gli B1-1/O2	34	14,08	0,639	49,21	0,465	53,61	0,591							
Gli B1-1/E2	12	13,82		51,08		54,8								

% białka — procentowa zawartość białka ogółem

% protein content

LS — Liczba sedymentacji

LS — Sedimentation value

MTZ — Masa tysiąca ziaren

MTZ — Thousand kernels mass

N — Liczebność genotypów

N — Number of forms within genotypes

X — Średnia wartość badanej cechy

X — Mean value of trait

t — Wartość obliczona testu t

t — Student test value

Procentowa zawartość białka ogółem jest wskaźnikiem o szczególnym znaczeniu w badaniach mieszańców *Tr. spelta* i *Tr. vulgare* z uwagi na szczególnie wysoką wartość tej cechy u orkisz (ok. 18%). Test t liczony dla mieszańców F₂ wskazał istotnie (dla $p = 0,01$) wyższy poziom białka w liniach zawierających podjednostkę O2 w porównaniu z liniami zawierającymi prążek E2 typowy dla Eleny. Analiza linii bliskoizogenicznych potwierdziła tę zależność, wskazując dodatkowo na istotnie wyższą zawartość białka w liniach zawierających blok *Gli B1-6*. Ponadto istotne zwiększenie zawartości białka obserwowano u mieszańców, w których obie rozpatrywane frakcje gliadyn (*Gli B1-6* oraz O2) występowały łącznie.

Tak jednoznacznych wyników nie uzyskano w przypadku liczby sedymentacji. Test t wskazał wprawdzie podwyższoną jej wartość u osobników pokolenia F₂ zawierających blok *Gli B1-6*. Jednakże analiza statystyczna dla linii bliskoizogenicznych nie potwierdziła tego wyniku.

Analiza zmienności masy tysiąca ziaren w pokoleniu F₂ nie wykazała istotnego zróżnicowania tej cechy wśród osobników różniących się składem białek gliadynowych. Jednakże w grupie linii bliskoizogenicznych wystąpiły zależności kształtujące się identycznie, jak w przypadku procentowej zawartości białka ogółem. Istotnie wyższymi wartościami MTZ charakteryzowały się genotypy zawierające gliadyny pochodzące z orkisz, a więc blok *Gli B1-6* i prążek O2 zarówno, gdy pojawiały się one indywidualnie, jak i w połączeniu ze sobą.

Zawartość mikroelementów i charakterystyka składu aminokwasowego badanych materiałów

W kolejnym etapie analizowano wartość odżywczą badanych materiałów. Określono zawartość trzech mikroelementów: kationów żelaza, magnezu i cynku, a także skład aminokwasów u odmiany orkisz Oberkummeler Rotkorn, Eleny oraz w mieszańcowych liniach bliskoizogenicznych różniących się pojedynczymi wariantami ω -gliadyn. Oznaczenie zawartości kationów trzech metali w badanym materiale wykonano zarówno dla mąki jak i dla otrąb.

Porównując formy rodzicielskie można stwierdzić, że orkisz zawiera znacznie więcej analizowanych mikroelementów niż odmiana uprawna pszenicy (tab. 2). To stwierdzenie dotyczy zarówno mąki jak i w otrąb. U orkisz obserwowano około 50% więcej magnezu oraz o około 100% więcej żelaza i cynku w porównaniu do odmiany Elena. Analizując formy mieszańcowe odnotowano, iż w mące uzyskanej z genotypów zawierających wszystkie podjednostki ω -gliadyn specyficzne dla orkisz (*Gli B1-6/O2*) zawartość żelaza kształtuje się na poziomie orkisz. Zależności takiej nie zaobserwowano w przypadku mieszańca zawierającego blok *Gli B1-6* w połączeniu w prążkiem E2 Eleny, ani w przypadku mieszańca zawierającego wszystkie ω -gliadyny typowe dla Eleny. Uzyskany wynik sugeruje, że specyficzna dla orkisz podjednostka O2 może pozostawać w genetycznym związku z zawartością żelaza. Gdyby tę obserwację udało się potwierdzić w kolejnych latach na materiale rozmnażanym w różnych środowiskach, byłby to dowód, że frakcja O2 jest markerem genu (genów) decydujących o podwyższonej zawartości żelaza w ziarnie pszenicy.

Tabela 2

Oznaczenie zawartości magnezu, żelaza i cynku w genotypach mieszańcowych orkiszu i Eleny oraz formach rodzicielskich

The microelements (zinc, iron and magnesium) content in parental forms and in hybrid genotypes

	Genotypy Genotypes	Mg (%)		Fe (mg%)		Zn (mg%)	
		mąka flour	otręby bran	mąka flour	otręby bran	mąka flour	otręby bran
Komponenty rodzicielskie	Orkisz (spelt) (<i>Gli B1-6/O2</i>)	0,043	0,320	0,700	6,800	2,900	12,800
Parental forms	Elena (bread wheat) (<i>Gli B1-1/E2</i>)	0,030	0,212	0,400	3,500	1,300	6,900
Genotypy mieszańcowe	<i>Gli B1-6/O2</i>	0,030	0,262	0,700	4,500	1,200	8,000
Hybrid genotypes	<i>Gli B1-6/E2</i>	0,028	0,255	0,300	4,300	1,200	7,600
	<i>Gli B1-1/E2</i>	0,027	0,294	0,400	4,500	1,200	8,200

Analiza składu aminokwasowego wykazała podwyższoną zawartość wszystkich aminokwasów (z wyjątkiem argininy) w ziarnie orkiszu w porównaniu z ziarnem odmiany Elena o około 20–60% (tab. 3).

Tabela 3

Zawartość aminokwasów w formach rodzicielskich oraz w genotypach mieszańcowych (w g/100g ziarna). Symbole *Gli B1-6/O2* oraz *Gli B1-1/E2* oznaczają linie zawierające białka gliadynowe typowe dla orkiszu i odmiany Elena

Amino acid content in parental forms and in hybrid genotypes (g/100g kernels). The *Gli B1-6/O2* and *Gli B1-1/E2* lines contain spelt type or bread wheat type gliadins, respectively

Aminokwasy Amino acid	Orkisz (spelt)	Elena (bread wheat)	%*	<i>Gli B1-6/O2</i>	<i>Gli B1-1/E2</i>	%**
Cysteina (Cys)	0,33	0,27	122,2	0,32	0,27	118,5
Asparagina (Asp)	0,74	0,55	134,5	0,60	0,58	103,4
Metionina (Met)	0,26	0,19	136,8	0,22	0,19	115,8
Treonina (Thr)	0,44	0,31	141,9	0,34	0,32	106,3
Seryna (Ser)	0,87	0,56	155,4	0,70	0,55	127,3
Glicyna (Gly)	0,59	0,45	131,1	0,51	0,38	134,2
Alanina (Ala)	0,52	0,36	144,4	0,47	0,33	142,4
Walina (Val)	0,86	0,67	128,4	0,62	0,63	98,4
Izoleucyna (Ile)	0,61	0,40	152,5	0,52	0,42	123,8
Leucyna (Leu)	1,27	0,83	153,0	1,10	0,85	129,4
Tyrozyna (Tyr)	0,49	0,31	158,1	0,45	0,34	132,4
Fenylalanina (Phe)	0,89	0,62	143,5	0,74	0,61	121,3
Histydyna (His)	0,39	0,26	150,0	0,31	0,26	119,2
Lizyna (Lys)	0,54	0,42	128,6	0,51	0,42	121,4
Arginina (Arg)	0,51	0,54	94,4	0,50	0,41	121,9
Glutamina (Glu)	5,83	3,63	160,6	4,70	3,66	128,4
Prolina (Pro)	2,59	1,64	157,9	1,91	1,67	114,4

* — Procentowy udział zawartości aminokwasów w orkiszu w stosunku do Eleny

* — Percent of amino acid content in spelt in relation to Elena

** — Procentowy udział zawartości aminokwasów w liniach zawierających gliadyny typowe do orkiszu w stosunku do linii zawierających gliadyny typowe dla odmiany Elena

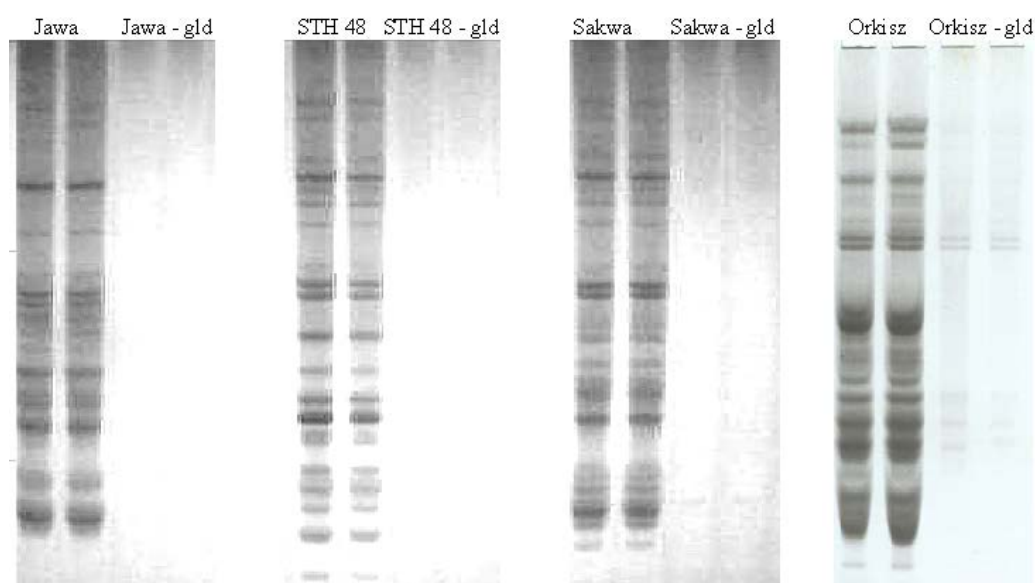
** — Percent of amino acid content in lines containing spelt gliadin type in relations to lines containing bread wheat gliadin type

Dotyczy to zwłaszcza glutaminy, proliny, seryny oraz tyrozyny. Godny odnotowania jest również fakt podwyższonej zawartości niektórych aminokwasów egzogennych, głównie lizyny, leucyny, oraz izoleucyny. Różnice pomiędzy genotypami mieszańcowymi, z których jeden zawierał ω-gliadyny typowe dla orkiszu (*Gli B1-6/O2*), a drugi dla odmiany

Elena (*Gli B1-1/E2*) są podobne do różnic między orkiszem a Eleną. W pierwszym przypadku zawartość wszystkich aminokwasów (z wyjątkiem waliny) była wyższa niż w drugim z tym jednak, iż przewaga nie była tak znaczna jak u form rodzicielskich (od 3 do 40%). Wartości procentowe podane w tabeli 3 informują, w jakim stopniu obserwowane różnice mogą być tłumaczone zmiennością podjednostek ω -gliadyn.

Modyfikacje składu białek zapasowych badanych materiałów

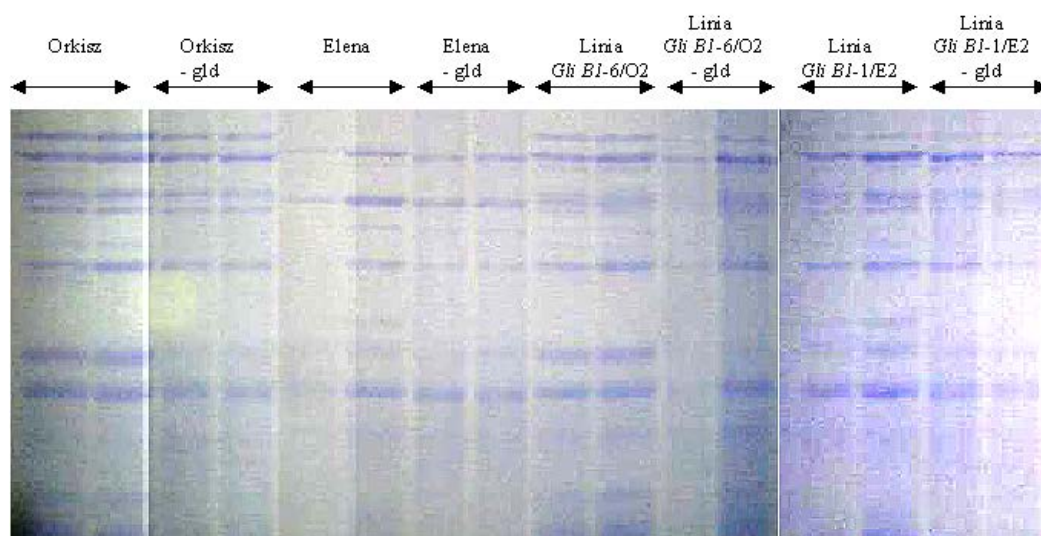
Opracowano metodę chemicznej eliminacji gliadyn z wykorzystaniem izopropanolu. W wyniku dwukrotnej ekstrakcji usunięto większość frakcji gliadynowych pozostawiając frakcje gluteninowe. Skuteczność wykonanej modyfikacji oceniono na podstawie analizy elektroforetycznej (rys. 2).



Rys. 2. Obraz elektroforetyczny gliadyn w próbach mąki „bezgliadynowej” na tle obrazów prób nie poddanych modyfikacji

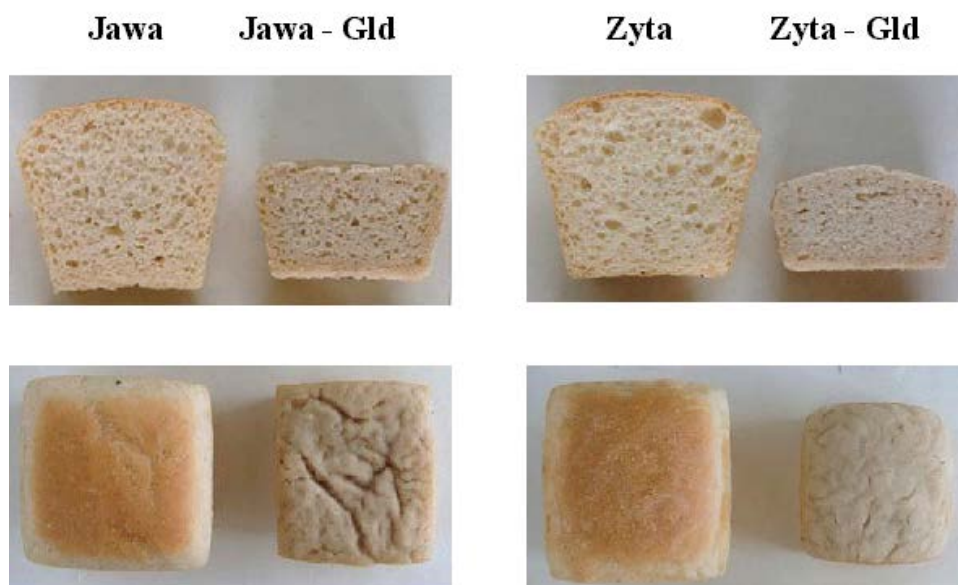
Fig. 2. Electrophoregrams of gliadins in „nongliadin” flour samples in comparison with the unmodified patterns

Obrazy elektroforetyczne uzyskane metodą A PAGE pozwalały obserwować jedynie śladowe ilości gliadyn w centralnej strefie rozdziału prób poddanych modyfikacji, na tle pełnego zestawu podjednostek gliadynowych w próbach nie modyfikowanych. Jednocześnie obraz elektroforetyczny uzyskany metodą SDS PAGE przedstawia białka gluteninowe w próbach mąki poddanych i nie poddanych modyfikacji (rys. 3).



Rys. 3. Obraz elektroforetyczny glutenin w próbach mąki „bezgliadynowej” na tle obrazów prób nie poddanych modyfikacji

Fig. 3. Electrophoregrams of glutenins in „nongliadin” flour samples in comparison with unmodified patterns



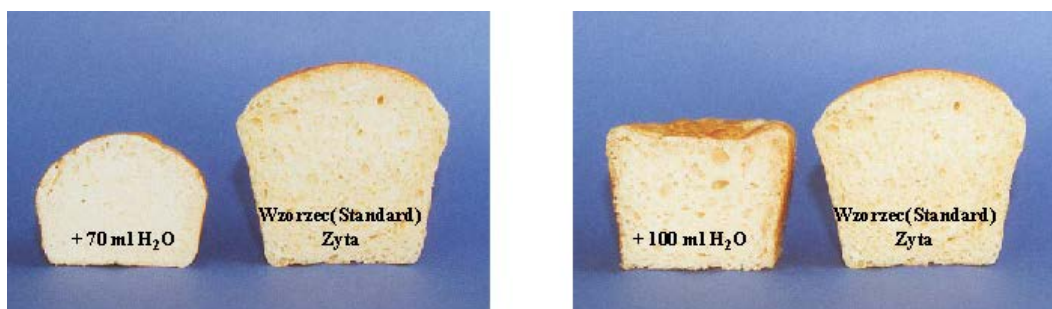
Rys. 4. Właściwości wypiekowe prób mąki „bezgliadynowej” w porównaniu z mąką nie poddaną modyfikacji

Fig. 4. Baking quality of „nongliadin” flour samples in comparison with the unmodified flour

Ich rozdziały były identyczne, co dowodzi, że mąka pozbawiona gliadyn zawiera pełny zestaw podjednostek gluteninowych.

Mąka „bezgliadynowa” z uwagi na brak jednego z podstawowych składników glutenu jest materiałem nietypowym, a przez to trudnym do oceny jakości technologicznej. W pierwszej kolejności wykonano szereg doświadczeń mających na celu określenie optymalnych warunków wypieku dla tego typu materiałów. W ocenie wykorzystano ziarno dwóch odmian pszenicy ozimej: Jawy oraz Zyty, które uzyskano od hodowców w ilości umożliwiającej przygotowanie dużych prób mąki zmodyfikowanej (około 2 kg). Pozwoliło to na wykonanie kilku powtórzeń analiz technologicznych.

Produkty mikrowypieku laboratoryjnego uzyskane z mąki poddanej modyfikacji charakteryzowały się znacznie mniejszą objętością w porównaniu z bochenkami wzorcowymi. Istotny natomiast był fakt, iż mąka pozbawiona gliadyny, a tym samym pozbawiona możliwości tworzenia glutenu, może być wykorzystywana do produkcji pieczywa (rys. 4). Zaobserwowano, iż stopniowe zwiększanie objętości wody dodawanej do mąki „bezgliadynowej” wpływało na zwiększenie objętości oraz poprawę kształtu uzyskanego pieczywa, osiągając (w przypadku odmiany Zyta) wysokość, taką jak w przypadku bochenków z mąki niemodyfikowanej (zawierającej gliadynę) (rys. 5). Różnica w obu przypadkach polegała na braku charakterystycznego „wyrośnięcia” ciasta i uzyskanego pieczywa. Wyniki doświadczenia świadczyły, iż mąka „bezgliadynowa” w porównaniu z mąką nie poddaną modyfikacji charakteryzuje się większą wodochłonnością. Ten wskaźnik oceny jakości technologicznej ulegał największym zmianom w wyniku eliminacji gliadyn.



Rys. 5. Wpływ zwiększenia ilości dodawanej wody na kształt i wielkość uzyskanego wypieku z mąki „bezgliadynowej” odmiany Zyta

Fig. 5. Influence of increasing water amount during processing on the shape and volume of bread derived from „nongliadin” flour samples of cultivar Zyta

Określenie poziomu gliadyny na podstawie testu ELISA

Materiały traktowane izopropanolem analizowano testem ELISA pod kątem zawartości gliadyny wiązanej przez specyficzne przeciwciała przeciwko gliadynie. Celem doświadczenia było stwierdzenie, w jakim stopniu zmniejszyła się toksyczność modyfikowanych materiałów.

Najwyższy poziom gliadyny związanej przez przeciwciała stwierdzono u orkisz, najniższy u odmiany Elena (tab. 4). W liniach mieszańcowych wartości testu ELISA były pośrednie w stosunku do form rodzicielskich. Ekstrakcja gliadyn izopropanolem spowodowała drastyczne obniżenie poziomu związanej gliadyny. W największym stopniu efekt ten obserwowano u odmiany Elena, w mniejszym u pozostałych genotypów.

Tabela 4

Zawartość gliadyny w mące orkisz, odmiany Elena i ich linii mieszańcowych traktowanej izopropanolem określona na podstawie testu ELISA
The level of gliadins linked by anti-gliadin antibodies in "nongliadin" flour samples of spelt, bread wheat and their hybrid lines evaluated on the basis of ELISA test

Genotyp Genotype	Modyfikacja Modification	Gliadyna (mg/100g)	gld+/gld-
Orkisz (spelt)	gld +	7504	24
	gld -	319,5	
Elena (bread wheat)	gld +	2892	30
	gld -	95,2	
<i>Gli B1-6/O2</i> (spelt type gliadins)	gld +	5181	20
	gld -	263,1	
<i>Gli B1-1/E2</i> (Elena type gliadins)	gld +	6168	24
	gld -	252,6	

“gld +” — Próba mąki zawierającej gliadyny (nie poddanej modyfikacji)

“gld +” — Unmodified (gliadin containing) flour samples

“gld -” — Próba mąki, w której zredukowano poziom gliadyny drogą ekstrakcji izopropanolem

“gld -” — “Nongliadin” (isopropanol treated) flour samples

“gld+/gld-” — Wskaźnik zmniejszenia poziomu gliadyny na skutek ekstrakcji izopropanolem

“gld+/gld-” — Gliadin level reduction indicator in samples treated with isopropanol

DYSKUSJA

Celem badań było stwierdzenie czy przeniesienie białek gliadynowych z orkisz do odmian uprawnych *Tr. vulgare*, a następnie ich modyfikacja może poprawić właściwości odżywcze i zdrowotne pszenicy. Uzyskane wyniki sugerują, iż należy oddzielić od siebie dwie grupy zagadnień: problem jakości technologicznej i wartości odżywczej od problemu toksyczności białek gliadynowych w przypadku osób chorych na celiakię.

W pierwszym przypadku orkisz okazał się źródłem cennych genów, głównie: wysokiej procentowej zawartości białka ogółem i związanej z tym podwyższonej zawartości niektórych aminokwasów (głównie egzogennej tyrozyny, leucyny i izoleucyny), a także wysokiej zawartości kationów żelaza, magnezu oraz cynku. U mieszańców orkisz z odmianą Elena, zawierających ω-gliadyny typowe dla orkisz, zaobserwowano podwyższony poziom białka ogólnego, żelaza oraz aminokwasów egzogennych, szczególnie lizyny, tyrozyny, leucyny i izoleucyny w porównaniu z mieszańcami zawierającymi ω-gliadyny typowe dla Eleny. Procentowa zawartość białka ogółem jest ważnym wskaźnikiem zarówno jakości technologicznej, jak i wartości odżywczej. Natomiast żelazo wchodzące w skład hemoglobiny wpływa na prawidłowe funkcjonowanie układu krążenia. Identyfikacja podjednostek ω-gliadyn kodowanych chromosomem *1B* jako markerów genów warunkujących te cechy może odegrać ważną

rolę w hodowli odmian pszenicy o poprawionych właściwościach technologicznych i odżywczych.

W drugim przypadku określenie zawartości gliadyny na podstawie testu ELISA (powszechnie wykorzystywanego wskaźnika przydatności badanego materiału w żywieniu osób uczulonych na gluten) nie potwierdziło opinii, zgodnie z którą orkisz i jego mieszańce z pszenicą uprawną mogły być tolerowane przez osoby chore na celiakię. Korzystniejsze wyniki uzyskano nawet dla odmiany Elena niż dla orkisz.

Modyfikacje składu białek zapasowych, które opracowano i wykorzystano w trakcie realizacji projektu sugerują, iż kontynuacja badań nad eliminacją toksycznych właściwości białek zapasowych pszenicy w tym właśnie kierunku jest uzasadniona. Efekt zmniejszenia toksyczności można było zaobserwować w materiałach, których skład białek zapasowych zmieniono eliminując większość gliadyn przez ich ekstrakcję izopropanolem. Dzięki silnej redukcji zawartości wszystkich grup białek gliadynowych uzyskano pewien układ modelowy. Zakładając możliwość wyłączenia ekspresji genów kodujących gliadyny metodami biologii molekularnej wytworzony genotyp powinien być zbliżony (zarówno pod względem właściwości technologicznych, jak ich toksyczności) do materiałów poddanych modyfikacji. Właściwości wypiekowe prób traktowanych izopropanolem uległy znacznemu pogorszeniu w porównaniu z wzorcem, jaki stanowiły próby nie poddane modyfikacji. Jednakże biorąc pod uwagę, iż z mąki „bezgliadynowej” w ogóle uzyskano wypiek, którego toksyczność została poważnie zredukowana, wynik ten można uznać za obiecujący.

Biorąc po uwagę opinię, według której osoby uczulone na gluten tolerują pieczywo z mąki orkisz, należy przypuszczać, iż w takich przypadkach rodzaj uczulenia został nie dość precyzyjnie określony bądź też uczulenie miało łagodniejszy charakter i nie było związane z celiakią. Z drugiej strony istnieje pewne prawdopodobieństwo, iż tolerowanie orkisz przez osoby w niewielkim stopniu uczulone na gluten ma inne podłoże biochemiczne, nie związane ze specyfiką budowy gliadyn. Być może (jest to tylko hipoteza) pewną rolę w takich przypadkach odgrywa podwyższona zawartość cynku w ziarnie orkisz. Cynk jest kofaktorem szeregu enzymów układu pokarmowego. Tym samym zwiększone jego spożycie przez osoby żywiące się produktami z ziarna orkisz teoretycznie mogłoby wpływać na zwiększanie aktywności enzymów — głównie proteolitycznych. Taka hipoteza łączy się w sposób logiczny z doniesieniem literatury na temat efektywniejszego trawienia przez organizm ludzki gliadyn pochodzących z orkisz niż z innych form pszenicy (Piergiovanni i in., 1996).

WNIOSKI

1. Przeniesienie specyficznych dla orkisz frakcji ω -gliadyn poprawiło wartość odżywczą uzyskanych genotypów mieszańcowych pszenicy zwyczajnej poprzez zwiększenie zawartości w ziarnie białka ogólnego, niektórych aminokwasów egzogennych (lizyny, leucyny, izoleucyny) oraz żelaza. Specyficzne frakcje ω -gliadyn mogą być markerami genów warunkujących te cechy.

2. Przeniesienie do pszenicy zwyczajnej frakcji ω -gliadyn specyficznych dla orkisz nie wpłynęło na zmniejszenie właściwości alergennych uzyskanych genotypów mieszańcowych. W świetle wyników testu ELISA orkisz nie nadaje się do produkcji żywności dla osób uczulonych na gluten.
3. Modyfikacja składu białek zapasowych polegająca na ekstrakcji gliadyn izopropanolem powoduje znaczne zmniejszenie właściwości alergennych mąki pszennej, ale także drastyczne obniżenie wszystkich parametrów charakteryzujących jakość technologiczną. Podwyższając ilość wody dodawanej w trakcie przygotowania do wypieku można poprawić właściwości reologiczne ciasta z mąki „bezgliadynowej”.

LITERATURA

- Bushuk W., Zillman R. R. 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclature. *Can J. Plant Sci.* 58: 505 — 515.
- Campbell K. G. 1997. Spelt: agronomy, genetics, and breeding. *Plant Breeding Reviews* 15: 188 — 213.
- Cygankiewicz A. 1997. Wartość technologiczna ziarna materiałów hodowlanych pszenicy ozimej i jarej na tle badań własnych i światowych. *Biul. IHAR* 204: 219 — 235.
- Gregorek H., Stolarczyk A., Kunachowicz H., Socha J., Madaliński K. 1994. Ocena zawartości glutenu w produktach dietetycznych stosowanych w Polsce w leczeniu celiakii. *Żywnienie Człowieka i Metabolizm*; XXI nr 3: 233 — 242.
- Kasarda D. D. 1998. Gluten and gliadin: precipitating factors in coeliac disease. *Proceedings of 7th International Symposium on Coeliac Disease*. Tampere, Finland, September 5–7, 1996: 1 — 26.
- Laemmli V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 — 685.
- Moore S., Stein W. M. 1963. Chromatographic determination of amino acid by use automatic recording equipment. In: *Methods in enzymology*. Colowick P., Caplan N. O. (eds), Academic Press Inc., New York, VI: 819 — 831.
- Piergiovanni A.R., Laghetti G., Perrino P. 1996. Characteristics of meal from hulled wheats (*Triticum dicoccon* and *T. spelta* L.): an evaluation of selected accessions. *Cereal Chem.* 73/6: 732 — 735.
- Rakowska M., Szkiłładziowa W., Kunachowicz H. 1978. *Biologiczna wartość białka żywności*. Wydaw. Nauk. Tech. Warszawa.
- Ranhortra G. S., Gelroth J. A., Glaser B. K., Lorenz K. J. 1995. Baking and nutritional qualities of a spelt wheat sample. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28: 118 — 122.
- Ranhortra G. S., Gelroth J. A., Glaser B. K., Stallknecht G. F. 1996. Nutritional profile of three spelt wheat cultivars grown at five different locations. *Cereal Chem.* 73/5: 533 — 535.
- Waga J. 2000. Syntetyczna metoda klasyfikacji białek gliadynowych. *Biul. IHAR* 215: 35 — 60.
- Waga J. 2002. Inheritance of some ω -gliadin protein subunits and their linkage with the red glume coding Rg-1 locus. *Plant Breeding and Seed Science* (w druku).
- Zeleny L., Greenway W. T., Gurney G. M., Fifield C. C., Lebsack K. L. 1960. Sedimentation value as the index of dough mixing characteristics in early-generation wheat selections. *Cereal Chem.* 27: 673.