

REZERVNE BJELANČEVINE PŠENICE ANALIZIRANE RP-HPLC METODOM

Daniela Horvat ⁽¹⁾, G. Drezner ⁽¹⁾, Gordana Šimić ⁽¹⁾ K. Dvojković ⁽¹⁾

Izvorni znanstveni članak
Original scientific paper

SAŽETAK

Rezervne bjelančevine zrna pšenice u značajnoj mjeri utječu na funkcionalna svojstva brašna. Cilj istraživanja bio je kvalitativno i kvantitativno analizirati rezervne bjelančevine pšenice primjenom visokotlačne tekućinske kromatografije obrnutih faza (RP-HPLC). U radu je ispitano 13 kultivara ozimih pšenica uzgojenih na Poljoprivrednom institutu Osijek. Albumini i globulini su, s prosječnom vrijednošću od 19,03%, najmanje zastupljeni u ukupnim bjelančevinama zrna ispitivanih kultivara pšenice. Analizom kromatograma albumina i globulina, utvrđeno je da se profili ispitivanih kultivara razlikuju po broju podjedinica (19-22), s konstantnim vremenom zadržavanja od 7 do 15 min. Unutar glijadinske skupine bjelančevina, dominirali su hidrofobni α - (8-10 podjedinica) i γ - glijadini (6-9 podjedinica), dok se broj podjedinica hidrofилnih ω 5- kretao od 1 do 3, a ω 1,2- od 3 do 6. Prema dobivenim rezultatima, α - i γ - glijadini su dominantne komponente glijadinske skupine u odnosu na minorne ω 5- i ω 1,2- glijadine. Unutar gluteninske skupine bjelančevina, LMW podjedinice prisutne su s najvećim brojem podjedinica (16-19), dok se broj podjedinica HMW glutenina kretao od 4 do 6, što znači da su LMW podjedinice dominirale unutar gluteninske skupine. Prosječan udio glutena iznosio je 80,97 %. Glijadini su, s prosječnom vrijednošću od 44,20%, u ukupnim bjelančevinama zrna dominantnija skupina u glutenu, u odnosu na glutenine čiji je prosječni udio iznosio 36,77 %.

Ključne riječi: pšenica, rezervne bjelančevine, RP-HPLC

UVOD

Količina i kakvoća bjelančevina zrna pšenice (*Triticum aestivum* L.) glavni su faktori utjecaja na tehnološke karakteristike brašna. Jedinствена viskoelastična i kohezivna svojstva tijesta u najvećoj su mjeri pod utjecajem glijadina i glutenina, rezervnih bjelančevina endosperma zrna (Uthayakumaran i sur., 2000.; Shewry i Halford, 2002.; Johansson i sur., 2004.).

U skladu s tradicionalnom Osborn klasifikacijom, bjelančevine pšenice se prema topljivosti dijele u četiri skupine: albumini i globulini, topljivi u vodi i otopinama soli; glijadini, topljivi u 70-90% etanolu, ali ne i u vodi i glutenini, topljivi u razrijeđenim kiselinama i lužinama, ali netopljivi u neutralnim alkoholnim otopinama i otopinama soli. Albumini i globulini, prema biološkim i funkcionalnim svojstvima, pripadaju skupini rezervnih bjelančevina endosperma zrna, iako i većina metabolički aktivnih bjelančevina aleuronskog sloja i klice (enzimi i inhibitori enzima) također pripada toj skupini (Gianibelli i sur., 2002.). Utjecaj albumina i globulina na pekarsku kakvoću nije u potpunosti definiran, iako neki autori, procjenjujući utjecaj neglutenskih bjelančevina na funkcionalna svojstva brašna, ističu njihov negativan utjecaj (Veraverbeke i Delcour, 2002.). Glijadini i glutenini glavne su komponente glutena. Prema primarnoj strukturi, glijadini se dijele na ω 5-, ω 1,2-, α - i γ -podskupine, a glutenini na visokomolekularne (HMW) i niskomolekularne (LMW) podjedinice. Mnoga istraživanja ukazuju na vrlo jaku povezanost sastava i količine glijadina i glutenina s reološkim svojstvima tijesta, volumenom i strukturom kruha. Utjecaj količine glijadina i glutenina na funkcionalna svojstva brašna može varirati ovisno o genotipu, ali i o okolišnim uvjetima uzgoja. Međutim, općenito je prihvaćeno da glijadini utječu na rastezljivost, a glutenini na čvrstoću i

Dr.sc. Daniela Horvat, dr.sc. Georg Drezner, mr.sc. Gordana Šimić, mr.sc. Krešimir Dvojković - Poljoprivredni institut Osijek, Južno predgrađe 17, p.p. 334, 31103 Osijek

elastičnost tijesta (Lasztity, 2003.). Bjelančevine pšenice bile su predmet mnogih istraživanja u zadnjih nekoliko desetljeća. Primjenom sofisticiranih analitičkih metoda dolazi se do sve većih saznanja o strukturi i svojstvima bjelančevina, na temelju kojih se kroz oplemenjivanje, identifikaciju kultivara i bolju kontrolu tehnološkog procesa direktno utječe na poboljšanje kakvoće zrna. Cilj istraživanja bio je razdvojiti rezervne bjelančevine pšenice primjenom RP-HPLC metode, odrediti njihove udjele te procijeniti specifične razlike između kultivara.

MATERIJAL I METODE

U ovom istraživanju analizirano je 13 kultivara ozime pšenica uzgojenih na Poljoprivrednom institutu Osijek tijekom vegetacije 2001/2002.: Žitarka, Srpanjka, Barbara, Klara, Golubica, Monika, Kata, Hana, Ana, Demetra, Osječka Crvenka, Sana i Divana. Svi kultivari pšenice, osim Sane i Divane, priznati su kultivari Poljoprivrednog instituta Osijek. Žitarka je priznati standard za kakvoću, Sana (Bc institut, Zagreb) za prinos, a Divana (Jošt sjeme-istraživanja, Križevci) je namjenski kultivar poboljšivač.

Bjelančevine pšenice razdvojene su i kvantificirane visokotlačnom tekućinskom kromatografijom obrnutih faza (RP-HPLC) na aparatu *Integral 4000 (Perkin Elmer)*. Prije same RP-HPLC analize, bjelančevine pšenice kvantitativno su ekstrahirane iz 100 mg brašna prema postupku Wieser i sur. (1998.). U analizi je korištena *Supelcosil LC 318 (Supelco)* kolona s reverznom fazom (C_{18}), dimenzija 25 x 0,46 cm i s promjerom zrna punila 5 μ m. Za razdvajanje frakcija bjelančevina pšenice korištene su dvije mobilne faze: acetonitril (ACN, *Merck*) visoke HPLC čistoće + 0,1% trifluoroctene kiseline (TFA, *Sigma*) i deionizirana voda + 0,1% TFA. Albumini i globulini razdvojeni su gradijentnim eluiranjem, uz linearnu promjenu koncentracije ACN od 20% do 60% kroz 15 minuta i uz protok mobilnih faza od 1 ml / min. Sve frakcije bjelančevina pšenice analizirane su pri temperaturi pećnice od 50°C i pri valnoj duljini od 210 nm. Glijadinski ekstrakt analiziran je gradijentnim eluiranjem, uz linearnu promjenu koncentracije ACN od 28 % do 56 % kroz 30 minuta uz protok od 1 ml / min. Udjeli pojedinih skupina bjelančevina pšenice izračunati su kao %-tak ukupne površine dobivene zbrojem površina ispod kromatograma albumina i globulina, glijadina i glutenina. Wieser i sur. (1998.) su, analizirajući bjelančevine pšenice RP-HPLC metodom, pokazali da postoji potpuna pozitivna korelacija ($r=0,999$) između površine ispod kromatografske krivulje i količine bjelančevina glutena.

Podaci su analizirani pomoću ANOVA-e, a značajnost razlika između tretmana testirana je LSD testom, korištenjem SAS System 8.2. Softwarea.

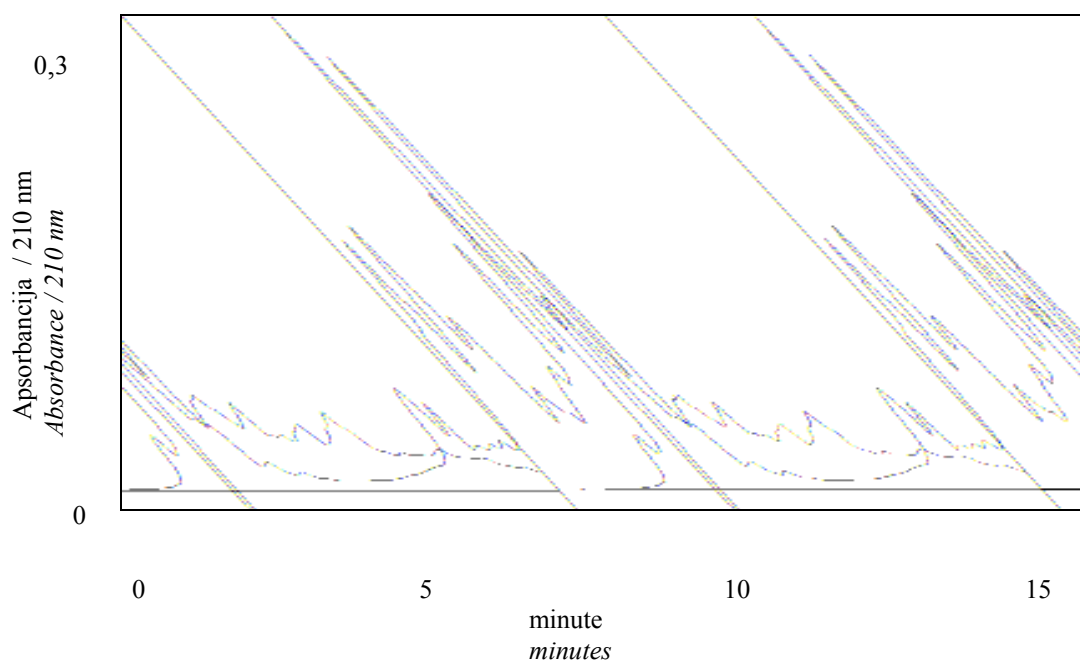
REZULTATI I RASPRAVA

Analizirane bjelančevine pšenice razdvojene su RP-HPLC metodom pri valnoj duljini 210 nm. Tipični kromatogram albumina i globulina prikazan je na Slici 1. Analizom kromatograma albumina i globulina utvrđeno je da se profili ispitivanih kultivara razlikuju po broju podjedinica (kromatografskih pikova) s konstantnim vremenom zadržavanja od 7 do 15 minuta (Tablica 1.). Broj albuminskih i globulinskih podjedinica ispitivanih kultivara varirao je od 19 do 22 (Tablica 1.), što je u skladu s Wieser i sur. (1998.).

Tablica 1. Vrijeme zadržavanja i broj podjedinica albumina i globulina

Table 1. Retention time and subunits number of albumins and globulins

	Albumini i globulini <i>Albumins and globulins</i>
Vrijeme zadržavanja t_R (min) <i>Retention time t_R (min)</i>	7 – 15
Broj podjedinica <i>Number of subunits</i>	19 - 22



Slika 1. RP-HPLC kromatogram albumina i globulina (kultivar Hana)

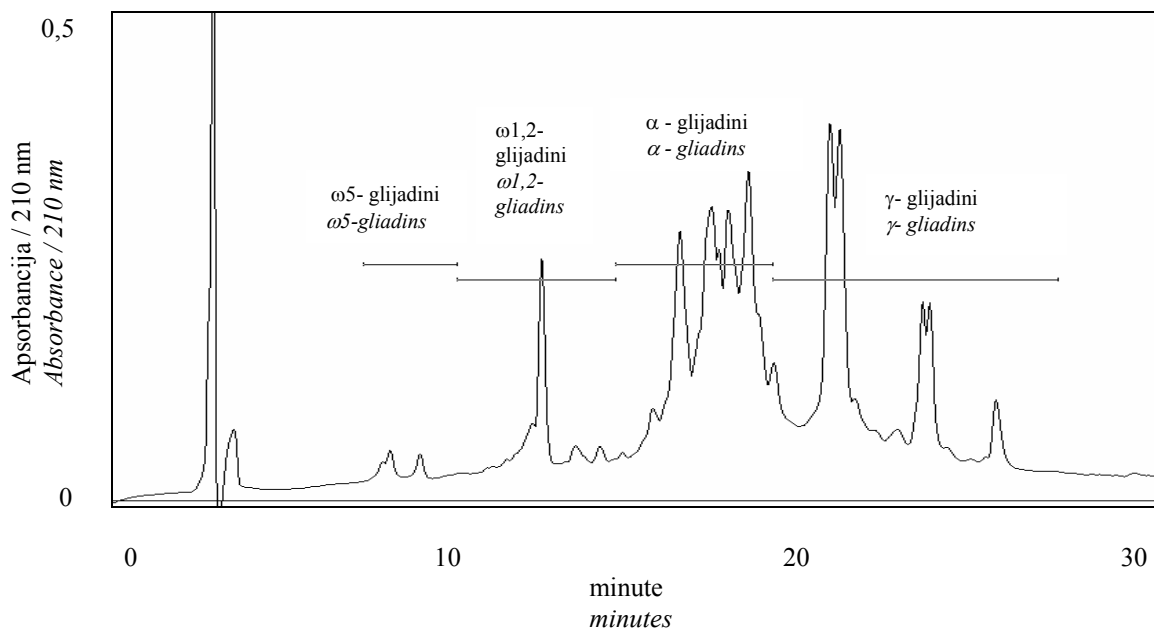
Figure 1. RP-HPLC chromatogram of albumins and globulins (cultivar Hana)

Razlikovanje glijadinskih i gluteninskih komponenti izvršeno je u skladu s metodom Wieser i sur. (1998.), temeljenoj na različitim vremenima zadržavanja (t_R) ispitivanih bjelančevina glutena, ovisno o njihovoj površinskoj hidrofobnosti. Analizom glijadinskih kromatograma, utvrđen je sljedeći redoslijed odjeljivanja (Slika 2.): najmanju hidrofobnost, s najkraćim vremenom zadržavanja, pokazali su ω_5 - (7-11 min) i $\omega_{1,2}$ - (11-16 min) glijadini. Vrijeme zadržavanja α - glijadina iznosilo je od 16-21 minuta. Najveću hidrofobnost pokazala je γ - skupina glijadina, s vremenom zadržavanja od 21 do 30 minute (Tablica 2.). Prema broju podjedinica u glijadinskoj skupini, najmanji broj prisutan je u hidrofilnijim ω_5 - (1-3) i $\omega_{1,2}$ - (3-6) podskupinama, dok hidrofobni α - glijadini sadrže od 8 do 10, te γ - glijadini od 6 do 9 podjedinica (Tablica 2.), što je u skladu s Wieser i sur. (1998.).

Tablica 2. Vrijeme zadržavanja i broj podjedinica glijadina

Table 2. Retention time and subunits number of gliadins

	ω_5 - glijadini <i>ω_5- gliadins</i>	$\omega_{1,2}$ - glijadini <i>$\omega_{1,2}$- gliadins</i>	α - glijadini <i>α- gliadins</i>	γ - glijadini <i>γ- gliadins</i>
Vrijeme zadržavanja t_R (min) <i>Retention time t_R (min)</i>	7 - 11	11 - 16	16 - 21	21 - 30
Broj podjedinica <i>Number of subunits</i>	1 - 3	3 - 6	8 - 10	6 - 9



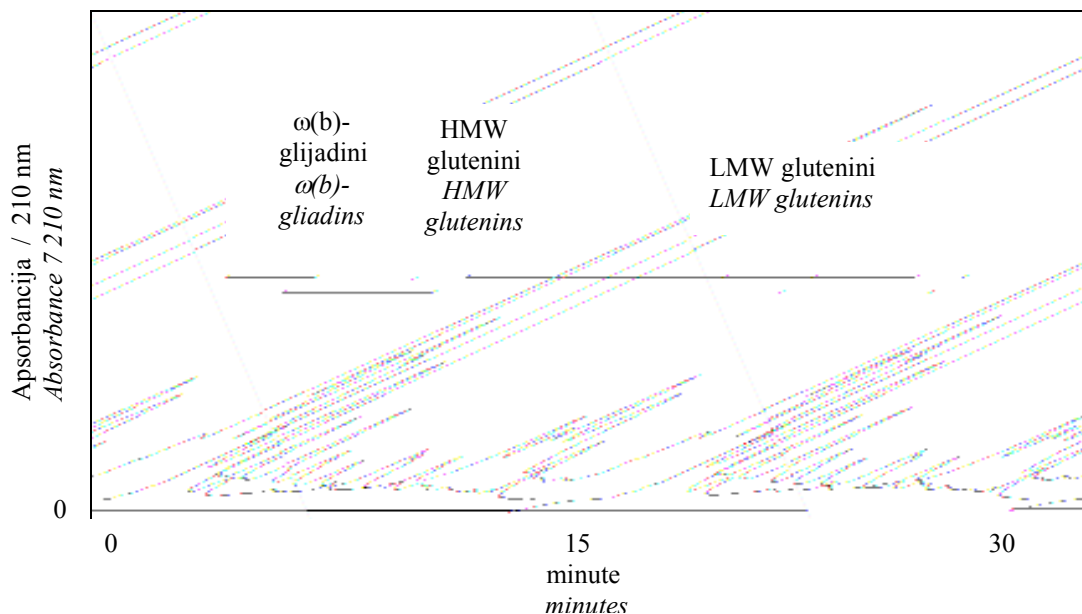
Slika 2. RP-HPLC kromatogram glijadina (kultivar Hana)
Figure 2. RP-HPLC chromatogram of gliadins (cultivar Hana)

Tipičan kromatogram gluteninskih podskupina razdvojenih RP-HPLC metodom prikazan je na Slici 3. Broj podjedinica unutar gluteninske skupine varirao je od 1 do 3 za $\omega(b)$ - glijadine, od 4 do 6 za HMW i od 16 do 19 za LMW glutenine. Vrijeme zadržavanja iznosilo je od 6 do 10 minuta za $\omega(b)$ -, 10-15 minuta za HMW i 15-30 minuta za LMW glutenine (Tablica 3), što je u skladu s Wieser i sur. (1998.).

Tablica 3. Vrijeme zadržavanja i broj podjedinica glutenina
Table 3. Retention time and subunits number of glutenins

	$\omega(b)$ - glijadini <i>$\omega(b)$- gliadins</i>	HMW glutenini <i>HMW glutenins</i>	LMW glutenini <i>LMW glutenins</i>
Vrijeme zadržavanja t_R (min) <i>Retention time t_R (min)</i>	6 - 10	10 - 15	15 - 30
Broj podjedinica <i>Number of subunits</i>	1 - 3	4 - 6	16 - 19

0,5



Slika 3. RP-HPLC kromatogram glutenina (kultivar Hana)
Figure 3. RP-HPLC chromatogram of glutenins (cultivar Hana)

Rezultati kvantifikacije bjelančevina pšenice RP-HPLC metodom prikazani su u Tablici 4. Iz Tablice 4. vidljivo je da su albumini i globulini, s prosječnim udjelom od 19,03%, najmanje zastupljeni u ukupnim bjelančevinama zrna ispitivanih kultivara pšenice. Prosječan udio glutena iznosio je 80,97%. Glijadini su s prosječnim udjelom od 44,20% u ukupnim bjelančevinama zrna dominantnija skupina glutena u odnosu na glutenine, čiji je prosječni udio iznosio 36,77 %. Dobiveni podaci su u skladu s Dupont i Altenbach (2003.), koji navode da se udio albumina i globulina kreće od 10 do 22%, glutena od 80 do 85%, glijadina od 40 do 50% i glutenina od 30 do 40% ukupnih bjelančevina pšenice. Dobiveni kvantitativni podaci analize bjelančevina pšenice RP-HPLC metodom ukazuju na specifične razlike između ispitivanih kultivara. Najmanji udio albumina i globulina imali su kultivari Divana, Golubica i Osječka Crvenka (16,62-17,37 %), dok su najveći udio imali kultivari Kata, Sana i Monika (21,06-24,35 %), što se proporcionalno odrazilo i na udio glutena.

Kultivar se Monika, s najvećim udjelom albumina i globulina (24,35%), tj. najmanjim udjelom glutena (75,65 %), prema $LSD_{0,05}$ testu značajno razlikuje od drugih analiziranih kultivara, kao i kultivar Divana s najvećim udjelom glutena (83,38%) i najmanjim udjelom albumina i globulina (16,62%) (Tablica 4.). S obzirom na to da varijacije u količini glijadina i glutenina značajno utječu na funkcionalna svojstva brašna, ispitivanje utjecaja količine bjelančevina glijadina i glutenina na pekarsku kakvoću kultivara različitog genetskog podrijetla tema je istraživanja mnogih autora. Prema nekim autorima (Wieser i Kieffer, 2001.; Uthayakumaran i sur., 2000., 2001.), dodavanje glijadina u osnovno brašno negativno utječe na njegova funkcionalna svojstva zbog povećanja omjera glijadini/glutenini, što se direktno odražava na vrijeme zamijesa, rastezljivost, maksimalni otpor tijesta i volumen kruha. Prema rezultatima ovog istraživanja, najmanji udio glijadina imali su kultivari Ana i Divana (39,84 i 40,10 %) i prema $LSD_{0,05}$ testu nalaze se na istoj razini značajnosti. Niži udio glijadina pokazali su i kultivari Srpanjka (42,09%), Žitarka (42,73%) i Demetra (43,46%). Navedeni kultivari, prema našim dosadašnjim istraživanjima, pripadaju skupini kultivara s vrlo dobrim reološkim svojstvima (Jurković i sur., 2000.; Horvat i sur., 2006.; Drezner i sur., 2006.) (Tablica 4.). Mnogi autori (Jood i sur., 2000.; Antes i Wieser, 2001.; Horvat i sur., 2006.) u svojim istraživanjima ističu značajan pozitivan utjecaj veće količine polimernih glutenina na pekarsku kakvoću pšenice, za razliku od veće količine monomernih glijadina, koji, kroz veći omjer glijadini/glutenini, negativno utječu na reološka svojstva tijesta. Udio glutenina analiziranih kultivara kretao se od 30,07 % (kultivar Monika) do 43,27% (kultivar Divana). Prema $LSD_{0,05}$ testu, kultivar Divana, s najvećim udjelom glutenina, značajno se razlikuje od drugih analiziranih kultivara. S druge strane, kultivari s najmanjim udjelima glutenina Monika (30,07%) i Sana (30,69%), odnosno Sana (30,69%) i Kata (32,42%) nalaze na istoj

razini značajnosti ($LSD_{0,05}$) (Tablica 4.). Kultivari Monika, Kata i Sana, prema rezultatima naših dosadašnjih istraživanja, pripadaju skupini kultivara lošijih reoloških svojstava (Horvat i sur., 2002.; Drezner i sur., 2006.).

Tablica 4. Relativni udio^a (%) bjelančevina ispitivanih kultivara pšenice

Table 4. Proportion of proteins (%) of analysed cultivars

Kultivari <i>Cultivars</i>	Udio ^a , % - <i>Proportion, %</i>			
	Albumini i globulini <i>Albumins and globulins</i>	Ukupan gluten <i>Total Gluten</i>	Glijadini <i>Gliadins</i>	Glutenini <i>Glutenins</i>
Žitarka	19,19	80,81	42,73	38,08
Srpanjka	17,65	82,36	42,09	40,27
Barbara	18,38	81,62	44,51	37,11
Klara	18,21	81,79	44,08	37,71
Golubica	17,29	82,71	47,24	35,47
Monika	24,35	75,65	45,58	30,07
Kata	21,06	78,94	46,52	32,42
Hana	19,06	80,95	44,84	36,11
Ana	18,79	81,21	39,84	41,37
Demetra	17,55	82,46	43,46	39,00
Osječka Crvenka	17,37	82,64	46,20	36,44
Sana	21,87	78,14	47,45	30,69
Divana	16,62	83,37	40,10	43,27
\bar{X}	19,03	80,97	44,20	36,77
$LSD_{0,05}$	1,808	1,808	1,769	2,178

^a izračunati kao %-tak ukupne površine (zbroj ukupnih površina ispod kromatograma albumina-globulina, glijadina i glutenina) - *calculated as % of total area (summ of total area under albumins-globulins, gliadins and glutenins chromatograms)*

ZAKLJUČAK

Analizom albumina i globulina ispitivanih kultivara pšenice, utvrđeno je da se broj njihovih podjedinica kretao od 19 do 22. Unutar glijadinske skupine bjelančevina dominirali su hidrofobni α - (8-10 podjedinica) i γ - glijadini (od 6-9 podjedinica), dok su unutar gluteninske skupine bjelančevina dominirale LMW podjedinice (od 16-19 podjedinica). Na temelju dobivenih rezultata istraživanja, može se zaključiti da su albumini i globulini, s prosječnom vrijednošću od 19,03%, najmanje zastupljeni u ukupnim bjelančevinama zrna ispitivanih kultivara pšenice, dok je analizom bjelančevina glutena utvrđeno da su glijadini dominantnija skupina (44,20%) u odnosu na glutenine (36,77 %).

LITERATURA

1. Antes, S., Wieser, H. (2001): Effects of high and low molecular weight glutenin subunits on rheological dough properties and bread-making quality of wheat. *Cereal Chem.* 78: 157-159.
2. Drezner, G., Dvojković, K., Horvat D., Novoselović, D., Lalić, A., Babić, D. Kovačević, J. (2006): Grain Yield and Quality of Winter Wheat Genotypes in Different Environments. *Cereal Res. Commun.* 34: 457-460.
3. Dupont, F.M, Altenbach, S.B. (2003): Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *J. Cereal Sci.* 38: 133-146.
4. Gianibelli, M.C., Masci, S., Larroque, O.R., Lafandra, D., MacRitchie, F. (2002): Biochemical characterisation of a novel polymeric protein subunit from bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Cereal Sci.* 35: 265-276.

5. Horvat, D., Jurković, Z., Drezner, G., Šimić, G., Novoselović, D., Dvojković, K. (2006): Influence of Gluten Proteins on Technological Properties of Croatian Wheat Cultivars. *Cereal Res. Commun.* 34: 177-1184.
6. Horvat, D., Jurković, Z., Sudar, R., Pavlinić, D., Šimić, G. (2002): The Relative Amounts of HMW Glutenin Subunits of OS Wheat Cultivars in Relation to Bread-Making Quality. *Cereal Res. Commun.* 30: 415-422.
7. Johansson, E., Prieto-Linde, M.L., Svensson, G. (2004): Influence of nitrogen application rate and timing on grain protein composition and gluten strength in Swedish wheat. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 167: 345-350.
8. Jood, S., Schofield, J.D., Tsiami, A.A., Bollecker, S. (2000): Effect of composition of glutenin subfraction on rheological properties of wheat. *J. Food Bioch.* 24:275-298.
9. Jurković, Z., Sudar, R., Drezner, G., Horvat, D. (2000): The HMW Glutenin Subunit Composition of OS Wheat Cultivars and their Relationship with Bread-Making Quality. *Cereal Res. Commun.* 28: 271-277.
10. Lasztity, R. (2003): Prediction of Wheat Quality-Succes and Doubts. *Periodica politechnica Ser. Chem. Eng.* 46: 39-49.
11. SAS System 8.2 Software (SAS Institute Inc. Cary, NC. USA, SAS/STAT User's Guide 1989)
12. Shewry, P.R. and Halford, N.G.(2002): Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J. Exper. Botany* 53: 947-958.
13. Uthayakumaran, S., Newberry, M., Keentok, M., Stoddard, F.L., Bekes, F. (2000): Basic Rheology of Bread Dough with Modified Protein Content and Glutenin-to-Gliadin ratio. *Cereal Chem.* 77: 744-749.
14. Uthayakumaran, S., Tomoskozi, S., Tatham, A.S., Savage, A.W.J., Gianibelli, M.C., Stoddard, 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.
15. Veraverbeke, W.S., Delcour, J.A. (2002): Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*42: 179-208.
16. Wieser, H., Antes, S., Selmeier, W. (1998): Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.* 75: 644-650.
17. Wieser, H., Kieffer, R. (2001): Correlations of the amount of gluten protein types to the technological properties of wheat flours determined on a micro-scale. *J. Cereal Sci.* 34: 19-27.

DETERMINATION OF WHEAT STORAGE PROTEINS BY RP-HPLC METHOD

SUMMARY

The wheat storage proteins have the most important role in defining functional properties of flour. The aim of this study was to analyse the wheat storage proteins profiles and relative amount by reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC). 13 wheat cultivars grown at Agricultural Institute Osijek were investigated. As compared to the other wheat storage protein fractions the average proportion of albumins and globulins was the least (19.03%). The albumins and globulins chromatogram profiles were different regarding subunits number (19-22) with constant retention time from 7 to 15 minutes. Within gliadins group hydrophobic α - (8-10 subunits) and γ - gliadins (6-9 subunits) were dominant, while the subunits number of hydrophilic gliadins varied from 1 to 3 for $\omega 5$ - and 3 to 6 for $\omega 1,2$ - gliadins. According to obtained results α - and γ - gliadins were dominant components of gliadins group in relation to minor $\omega 5$ - and $\omega 1,2$ - gliadins. The LMW glutenins with 16 to 19 subunits were dominant proteins of glutenins group compared with the HMW glutenins whose subunits number varied from 4 to 6. The average proportion of gluten was 80.97%. Concerning gluten proteins, the gliadins were dominant group (44.20%) compared with the average glutenins proportion (36.77%).

Key-words: wheat, storage proteins, RP-HPLC

(Primljeno 23. studenoga 2006.; prihvaćeno 11. prosinca 2006. - Received on 23 November 2006; accepted on 11 December 2006)