

Análises de gluteninas na Embrapa Trigo

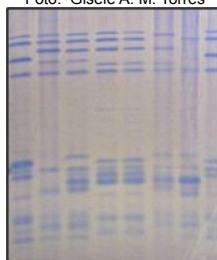
Gisele Abigail Montan Torres¹

Luciano Consoli¹

Ana Christina Sagebin Albuquerque²

Pedro Luiz Scheeren¹

Foto: Gisele A. M. Torres



**Embrapa Trigo
Passo Fundo, RS
2010**

Resumo

As gluteninas são as principais responsáveis pelas propriedades viscoelásticas da massa obtida da farinha de trigo, e são determinantes para a qualidade panificativa de diferentes cultivares. O estudo da associação dos alelos de gluteninas com parâmetros de qualidade tecnológica de trigo é ainda incipiente no Brasil, mas requer protocolos eficientes para sua devida caracterização. No laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, desde a década de 80, eram empregados dois métodos de extração para a caracterização dos perfis de gluteninas, um para alto peso molecular e outro para baixo peso molecular. O primeiro método é uma adaptação de diferentes protocolos, extraindo numa única etapa diferentes classes de proteínas de reserva. Já o segundo, corresponde a uma proposta de simplificação da extração sequencial de proteínas de reserva e obtenção de extratos específicos de cada classe. Ambos os métodos foram comparados quanto ao tempo de duração da análise e à qualidade dos resultados obtidos. A partir de 2007, foi implementada rotina de análise de gluteninas baseada num único protocolo de extração. Esta rotina trouxe melhorias quanto à qualidade dos perfis obtidos em eletroforese e quanto ao fato de uma mesma amostra de grão(s) poder servir à caracterização de ambos os perfis de gluteninas.

Termos para indexação: trigo, proteínas de reserva, qualidade panificativa, método

¹Pesquisador da Embrapa Trigo. Rodovia BR 285, km 294, Caixa Postal 451, CEP 99001-970 Passo Fundo, RS. E-mail para correspondência: gtorres@cnpt.embrapa.br.

²Pesquisadora da Embrapa.

Abstract

High molecular weight glutenin subunits are mainly responsible to the viscoelastic properties of dough and the bread-making quality of wheat cultivars. The association between glutenins alleles and end-use quality of Brazilian wheat cultivars is still incipient. Efficient protocols to characterize glutenin allele composition are required. At Embrapa Wheat, two methods of extraction for the characterization of HMW-GS and LMW-GS profiles have been employed since 80s. The first one is a local adaptation of different protocols where different classes of storage proteins are extracted in a single step. The second protocol is proposed as a simplification of sequential extraction of specific classes of storage proteins. Both methods were compared regarding time analysis and quality of results. In 2007, the establishment of a routine for glutenin analyses using a single extraction protocol improved the quality of electrophoretic profiles and it made possible the utilization of the same grain samples for the characterization of HMW-GS and LMW-GS.

Index terms: *wheat, storage proteins, baking quality, method*

Introdução

As proteínas de reserva de trigo são os principais componentes para a formação da rede de glúten, e contribuem para as propriedades reológicas e de panificação da farinha de trigo. Estas proteínas são classificadas em dois grandes grupos, gliadinas e gluteninas, com base em suas propriedades funcionais e de agregação (SHEWRY et al., 2001b).

Considerando-se diferentes cultivares de trigo, há ampla variação do perfil eletroforético das proteínas de reserva, tanto de gliadinas (BUSHUK; ZILLMAN, 1978) quanto de gluteninas (PAYNE et al., 1981; GUPTA; SHEPHERD, 1990).

As gliadinas são importantes no que se refere à característica de extensibilidade da massa obtida da farinha de trigo (METAKOVSKY et al., 1997), porém não constituem objeto de estudo deste trabalho.

As gluteninas constituem-se em proteínas poliméricas, em que as subunidades são ligadas por pontes de dissulfeto, e são divididas em dois grupos distintos: as de alto (HMW-GS, da sigla em inglês *High Molecular Weight Glutenin Subunits*) e as de baixo peso molecular (LMW-GS, *Low Molecular Weight Glutenin Subunits*). As HMW-GS variam de 77 a 160 kDa e as LMW-GS, de 23 a 68 kDa (KASARDA, 1999). Além de divergirem quanto à massa molecular, as subunidades de gluteninas diferem também quanto à composição em aminoácidos e, conseqüentemente, quanto à estrutura.

As HMW-GS representam 12% do total de proteínas da farinha de trigo (NICOLAS, 1997 citado por SHEWRY et al., 2001a), mas contribuem com 45 a 70% da variação em qualidade para panificação em cultivares de trigo européias (BRANLARD; DARDEVET, 1985b; PAYNE et al., 1987, 1988). As LMW-GS encontram-se em proporção de três a quatro vezes superior em massa em relação às HMW-GS, e têm efeito pronunciado sobre as propriedades viscoelásticas da massa tanto em trigos hexaplóides (espécie *Triticum aestivum*) como em trigos duros (espécie *Triticum durum*) (GUPTA; SHEPHERD, 1988; BOGGINI; POGNA, 1989; GUPTA et al., 1989; METAKOVSKY et al., 1990; POGNA et al., 1990). De modo geral, é aceito que as gluteninas são as principais responsáveis pela propriedade de tenacidade da farinha de trigo.

As HMW-GS são codificadas por seis genes localizados dois a dois, em clusters gênicos, muitas vezes chamados de locos, nos braços longos dos cromossomos 1A, 1B e 1D do trigo (locos *Glu-1*). Os trigos comuns possuem de três a cinco produtos protéicos de HMW-GS. As LMW-GS são codificadas por genes localizados nos locos *Glu-A3*, *Glu-B3* e *Glu-D3* nos braços curtos dos cromossomos 1A, 1B e 1D do trigo. Elas incluem múltiplos componentes tanto em trigos comuns quanto em trigos duros. Devido ao grande número de genes codificando as LMW-GS e a sua heterogeneidade considerável, sua caracterização é ainda incompleta (MASCI et al., 2000). Estes genes codificando para as LMW-GS estão fortemente ligados aos locos *Gli-1*, de gliadinas (POGNA et al., 1990).

A análise de gluteninas é realizada na Embrapa Trigo desde a década de 80. A identificação do perfil de HMW-GS é atividade de apoio ao programa de melhoramento genético de trigo (SCHEEREN et al., 1997), no que diz respeito à caracterização das linhagens e à indicação de qualidade panificativa superior, com base em cálculos de escores definidos em trabalhos de literatura estrangeira (PAYNE et al., 1980; BRANLARD; DARDEVET, 1985a, 1985b). No caso das LMW-GS, a obtenção em eletroforese de géis de qualidade é fator preponderante para a caracterização dos respectivos perfis, que são *per se* de maior complexidade que o perfil de HMW-GS (GUPTA; SHEPHERD, 1990).

O estudo da associação do perfil de gluteninas com o perfil tecnológico de cultivares de trigo ainda é incipiente no Brasil (ZANATTA et al., 2002; TORRES et al., 2008). Em 2007, foi proposta uma revisão do método de análise de gluteninas utilizado em rotina no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo (Projeto: Prospecção de genes de interesse econômico em cultivares de trigo adaptadas ao Brasil, coordenado por Gisele A. M. Torres). Este novo protocolo deveria atender à realização de eletroforeses de gluteninas reprodutíveis, para que a associação de alelos protéicos com a qualidade panificativa pudesse ser estudada de maneira aprofundada.

Material e métodos

No Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, eram utilizados dois métodos de extração de gluteninas: um para as gluteninas de alto peso molecular e outro para as gluteninas de baixo peso molecular.

O primeiro método (A) é uma adaptação, feita na Embrapa Trigo, de diferentes protocolos de extração de proteínas de reserva. Às amostras de farinha obtida a partir da maceração de grãos de trigo, é adicionado tampão de extração (45 mg de farinha/ml de tampão), composto de 0,125M Tris-HCl pH 6,8; 1,3% (p/v) SDS; 8% (v/v) mercaptoetanol; 20% (v/v) glicerol; 0,02% (p/v) Pyronin Y; 1,5 M dimetilformamida. Após homogeneização, as amostras são mantidas a temperatura ambiente por 1 a 2 horas, podendo em seguida serem aplicadas em eletroforese de géis de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).

O segundo método (B) é baseado em protocolo de Singh et al. (1991), proposto como um procedimento simplificado para separação de subunidades de gluteninas em géis monodimensionais, aplicável em *screening* de grande número de amostras. Este método baseia-se no princípio de extração sequencial de proteínas de reserva, gliadinas e gluteninas, adaptado de Marchylo et al. (1989). Inicialmente é feita a extração de gliadinas, pela adição à farinha de solução a 50% (v/v) propanol-1 (20 mg farinha/ml). As amostras são homogeneizadas e incubadas a 65 °C por 30 minutos. Após centrifugação (10.000 g), o sobrenadante é eliminado e a farinha residual é tratada

com 100 μ L da segunda solução: 50% (v/v) propanol-1; 0,08M Tris-HCl pH 8,0; 1% (p/v) DTT (agente redutor). Após 5 minutos de centrifugação, adiciona-se ao extrato, 100 μ L de 50% (v/v) propanol-1; 0,08M de Tris-HCl pH 8,0 e 1,4% (v/v) de vinilpiridina-4 (agente de alquilação dos grupos sulfidríla das gluteninas).

Ambos os métodos foram comparados quanto ao período de duração da análise e à qualidade dos resultados obtidos, sendo que as amostras utilizadas para a avaliação de ambos os métodos de extração foram grãos de trigo de diferentes cultivares. Os grãos foram macerados individualmente e submetidos aos dois protocolos de extração A e B, descritos anteriormente. Os extratos de gluteninas foram submetidos à SDS-PAGE, seguindo o protocolo descrito por Payne et al. (1981). Após eletroforese, os géis foram corados na presença de Coomassie Blue R250 e G250 conforme Blakesley e Boezi (1977), e, posteriormente fotografados.

Resultados e discussão

Na Figura 1, é apresentado um dos géis obtidos com a aplicação de amostras extraídas por cada um dos métodos descritos.

Imagem: Gisele A. M. Torres.

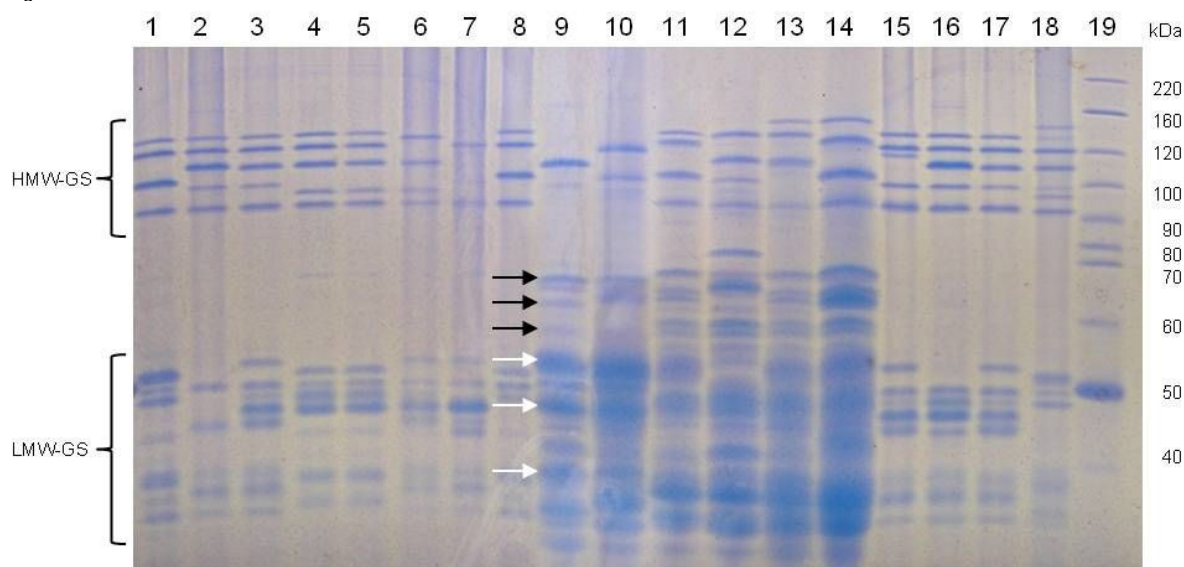


Fig. 1. SDS-PAGE de gluteninas de amostras de grãos de trigo obtidas pelos métodos de extração A (amostras de número 9 a 14) e B (amostras de número 1 a 8 e 15 a 18). A amostra de número 19 corresponde ao BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen), sendo indicadas à direita da figura, as massas moleculares em kilodaltons das bandas protéicas. As setas pretas indicam a contaminação do extrato com gliadinas e as setas brancas indicam a presença de complexos protéicos e a baixa resolução das bandas de LMW-GS.

As gliadinas são proteínas monoméricas, solúveis em álcool e com massa molecular de 30 a 60 kDa. Gliadinas das classes alfa, beta e gama têm ligações dissulfídicas intra-moleculares, e algumas das gliadinas-gama podem se ligar a subunidades de gluteninas (KÖHLER et al., 1993 citado por BRANLARD et al., 2001).

As gluteninas por sua vez, são proteínas poliméricas, ligadas por pontes dissulfídicas. O protocolo B, baseado em Singh et al. (1991), baseia-se na extração sequencial de proteínas de reserva, contando

com eliminação inicial das gliadinas. Com emprego do protocolo A, as gliadinas ainda são visualizadas (Figura 1 – amostras de 9 a 14), interferindo na identificação de bandas de LMW-GS.

No protocolo B, pelo uso de DTT e vinylpyridina-4 é promovida a redução das proteínas e a alquilação dos grupos sulfidríla na obtenção do extrato de gluteninas. A boa definição de bandas, tanto de HMW-GS quanto de LMW-GS, ficou evidente em amostras obtidas com o protocolo B (Figura 1 – amostras de 1 a 8 e de 15 a 18). Já com o protocolo A, no que se refere às LMW-GS, observam-se blocos de cor mais escura, indicando complexos protéicos, e não propriamente bandas de proteínas individualizadas.

Apesar do método A ser bastante rápido e, praticamente, não oferecer restrição quanto ao número de amostras por análise, ele não permite a obtenção de perfis protéicos com alta resolução. Já o método B demanda a dedicação de uma pessoa, nas condições do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo e um período de quatro horas para a extração de 24 amostras. Este número foi definido pela capacidade de trabalho da centrífuga. Porém, considerando-se a qualidade dos perfis obtidos e a obtenção de extratos de qualidade, tanto de HMW-GS quanto de LMW-GS, a partir do mesmo método de extração, o método de extração B demonstrou ser mais eficaz e efetivo na caracterização dos perfis protéicos de gluteninas das linhagens e cultivares analisadas no Laboratório de Biotecnologia/Área de proteínas da Embrapa Trigo.

Esta adaptação do protocolo de Singh et al. (1991), passou a ser executada como rotina no laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, desde a realização deste trabalho comparativo, no início de 2007.

Conclusões

Revisando-se os métodos de extração A e B, utilizados em rotina no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo desde a década de 80, em relação à obtenção dos extratos de gluteninas e à qualidade de caracterização dos perfis protéicos obtidos em eletroforese, concluiu-se que o método de extração B, adaptado do protocolo de Singh et al. (1991), foi mais eficaz e efetivo. Este protocolo utiliza uma mesma amostra de grãos para a caracterização de ambos os perfis de gluteninas, permitindo a visualização simultânea de perfil de gluteninas de alto e de baixo peso molecular.

Desta forma, a partir de 2007, foi implementada rotina de análise de gluteninas baseada neste único protocolo de extração. Esta nova rotina trouxe melhorias quanto à qualidade dos perfis obtidos em eletroforese e quanto ao fato de uma mesma amostra de grão(s) poder servir à caracterização de ambos os perfis de gluteninas.

Agradecimentos

Os autores agradecem a valiosa contribuição de Ellen T. W. Rogoski, analista da Embrapa Trigo, na execução do “método A” descrito neste documento.

Referências

- BLAKESLEY, R. W.; BOEZI, J. A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 82, p. 580-582, 1977.
- BOGGINI, G.; POGNA, N. E. The breadmaking quality and storage protein composition of Italian durum wheat. **Journal of Cereal Science**, London, v. 9, p. 131-138, 1989.
- BRANLARD, G.; DARDEVET, M. Diversity of grain protein and bread quality. I. Correlation between gliadin bands and technological characteristics. **Journal of Cereal Science**, London, v. 3, p. 329-343, 1985a.
- BRANLARD, G.; DARDEVET, M. Diversity of grain protein and bread wheat quality. II. Correlation between high molecular weight subunits of glutenin and flour quality characteristics. **Journal of Cereal Science**, London, v. 3, p. 345-354, 1985b.
- BRANLARD, G.; DARDEVET, M.; SACCOMANO, R.; LAGOUTTE, F.; GOURDON, J. Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. **Euphytica**, Wageningen, v. 119, p. 59-67, 2001.
- BUSHUK, W.; ZILLMANN, R. R. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclature. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 58, p. 505-515, 1978.
- GUPTA, R. B.; SHEPHERD, K. W. Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutenin. I. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid wheats. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 80, p. 65-67, 1990.
- GUPTA, R. B.; SHEPHERD, K. W. LMW-GS in wheat: their variation, inheritance, and association with breadmaking quality. In: INTERNATIONAL WHEAT GENETIC SYMPOSIUM, 7., 1988, Cambridge, UK. **Proceedings...** Cambridge, UK: Institute of Plant Science Research, 1988. p. 943-949.
- GUPTA, R. B.; SINGH, N. K.; SHEPHERD, K. W. The cumulative effect of allelic variation in LMW and HMW glutenin subunits on dough properties in the progeny of two bread wheats. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 77, p. 57-64, 1989.
- KASARDA, D. D. Glutenin polymers: the *in vitro* to *in vivo* transition. **Cereal Food World**, St. Paul, v. 44, p. 566-571, 1999.
- KÖHLER, P.; BELITZ, H. D.; WIESER, H. Disulphide bonds in wheat gluten: further cystine peptides from high molecular weight (HMW) and low molecular (LMW) subunits of glutenin and from γ -gliadins. **Zeitschrift Fuer Lebensmittle-Untersuchung Und Forshung**, Berlin, v. 196, p. 239-247, 1993.
- MARCHYLO, B. A.; KRUGER, J. E.; HATCHER, D. W. Quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of wheat storage proteins as a potential quality prediction tool. **Journal of Cereal Science**, London, v. 9, n. 2, p. 113-130, 1989.

MASCI, S.; D'OVIDIO, R.; LAFIANDRA, D.; KASARDA, D. D. A 1B-coded low-molecular-weight glutenin subunit associated with quality in durum wheats shows strong similarity to a subunit present in some bread wheat cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 100, p. 396-400, 2000.

METAKOVSKY, E. V.; FELIX, I.; BRANLARD, G. Association between dough quality (W values) and certain gliadin alleles in French common wheat cultivars. **Journal of Cereal Science**, London, v. 26, p. 371-373, 1997.

METAKOVSKY, E. V.; WRIGLEY, C. W.; BEKES, F.; GUPTA, R. B. Gluten polypeptides as useful genetic markers of dough quality in Australian wheats. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 41, p. 289-306, 1990.

NICOLAS, Y. Les prolamines de blé: extraction exhaustive et développement de dosages chromatographiques en phase inverse et de dosages immunochimiques à l'aide d'anticorps anti-peptide. 1997. Thèse (Doctorat) - Université de Nantes, Nantes.

PAYNE, P. I.; HARRIS, P. A.; LAW, C. N.; HOLT, L. M.; BLACKMAN, J. A. The high-molecular-weight subunits of glutenin: structure, genetics and relationships to bread-making quality. **Annales de Technologie Agricole**, Paris, v. 29, n. 2, p. 309-320, 1980.

PAYNE, P. I.; HOLT, L. M.; KRATTIGER, A. F.; CARILLO, J. M. Relationship between seed quality characteristics and HMW glutenin composition determined using wheats grown in Spain. **Journal of Cereal Science**, London, v. 7, p. 229-235, 1988.

PAYNE, P. I.; HOLT, L. M.; LAW, C. N. Structural and genetical studies on the high-molecular-weight subunits of wheat glutenin. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 60, p. 229-236, 1981.

PAYNE, P. I.; NIGHTINGALE, M. A.; KRATTIGER, A. F.; HOLT, L. M. The Relationship between HMW glutenin subunit composition and the breadmaking quality of british grown wheat varieties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 40, p. 51-65, 1987.

POGNA, P. E.; AUTRAN, J. C.; MELLINI, F.; LAFIANDRA, D.; FEILLET, P. Chromosome 1B-encoded gliadins and glutenin subunits in durum wheat: genetics and relationship to gluten strength. **Journal of Cereal Science**, London, v. 11, p. 15-34, 1990.

SCHEEREN, P. L.; MORAES-FERNANDES, M. I. B. de; BRAMMER, S. P.; HAAS, J. C.; SCHLEDER, M. de F.; GALON, G. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 20, p. 143, 1997. Supplement. Resumo C.31.

SHEWRY, P. R.; POPINEAU, Y.; LAFIANDRA, D.; BELTON, P. Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 11, p. 433-441, 2001a.

SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S.; FIDO, R.; JONES, H.; BARCELO, P.; LAZZERI, P. A. Improving the end use properties of wheat by manipulating the grain protein composition. **Euphytica**, Wageningen, v. 119, p. 45-48, 2001b.

SINGH, N. K.; SHEPHERD, K. W.; CORNISH, G. B. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. **Journal of Cereal Science**, London, v. 14, p. 203-208, 1991.

TORRES, G. A. M.; MIRANDA, M. Z. de; NICOLAU, M.; CONSOLI, L.; COSTA, L. F. M. M.; TOMAZIN, T. **Estudos preliminares da associação de gluteninas de alto peso molecular e parâmetros de qualidade tecnológica de trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. 13 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos online, 101). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do101.htm>.

ZANATTA, A. C. A.; SILVA, S. D. dos A. e; MILANI, W.; LUZA, J.; ARENDT, P. **Uso de marcadores protéicos na seleção de trigo (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) com qualidade tecnológica superior na Embrapa Trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. 6 p. html. (Embrapa Trigo. Comunicado técnico online, 85). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co85.htm>.



**Boletim de Pesquisa e
Desenvolvimento Online, 76**

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Embrapa Trigo
Caixa Postal, 451, CEP 99001-970
Passo Fundo, RS
Fone: (54) 3316 5800
Fax: (54) 3316 5802
E-mail: sac@cnpt.embrapa.br

Expediente

Comitê de Publicações

Presidente: **Sandra Maria Mansur Scagliusi**
Membros: Anderson Santi, Douglas Lau (vice-presidente),
Flávio Martins Santana, Gisele Abigail M. Torres, Joseani
Mesquita Antunes, Maria Regina Cunha Martins, Martha
Zavariz de Miranda, Renato Serena Fontaneli

Referências bibliográficas: Maria Regina Martins
Editoração eletrônica: Márcia Barrocas Moreira Pimentel

TORRES, G. A. M.; CONSOLI, L.; ALBUQUERQUE, A. C. S.; SCHEEREN, P. L. **Análises de gluteninas na Embrapa Trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2010. 12 p. html. (Embrapa Trigo. Boletim de pesquisa e desenvolvimento online, 76). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p_bp76.htm>.