

A new method for the separation of the protein fractions prolamin and glutelin in cereal grain by modified SE-HPLC

S. Wroblewitz, Braunschweig/D; L. Hüther, Braunschweig/D; H. Wätzig, Braunschweig/D; S. Dänicke, Braunschweig/D

Stefanie Wroblewitz, Institute of Animal Nutrition, Friedrich-Loeffler-Institute, Federal Research Institute for Animal Health, Bundesallee 50, 38116 Braunschweig, Germany

Variations in protein quality characteristics of cereal grain due to different cultivars and environmental impacts could influence their nutritional value and processing properties. Investigations concerning different aspects of climate change have shown significant decreases in crude protein content and varied amino acid compositions of cereal grains due to elevated atmospheric carbon dioxide concentration, suggesting also changes in single protein fractions. After Osborne fractionation of the grain proteins quantitative changes in the content of prolamins and glutelins could be observed. Therefore, a method to further characterize these fractions by a modified high performance size exclusion chromatography (SE – HPLC) was developed. It was implemented by using a Yarra SEC-2000 column and a pH gradient system, consisting of two phosphate buffers containing 0.1 % SDS at ambient temperature. Both, prolamins and glutelins could be separated in their essential parts (Figure 1 and 2). A calibration with the standard proteins Bovine Serum Albumin, Ovalbumin, Myoglobin and Cytochrome C was carried out to determine the sizes of the single samples fractions.

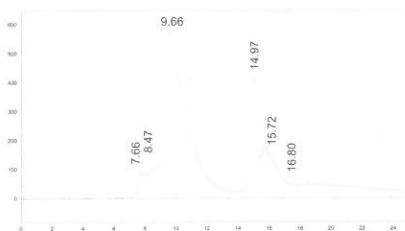


Figure 1: SE-HPLC chromatogram of winter wheat prolamin fractions (gliadins)

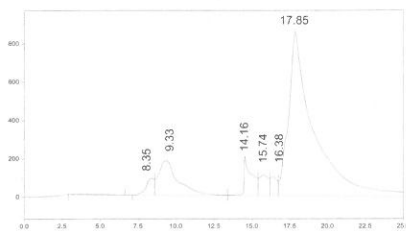


Figure 2: SE-HPLC chromatogram of winter wheat glutelin fractions (glutenins)

The purity of prolamins and glutelins after Osborne fractionation could be proved by SDS – PAGE. Wheat grain prolamins were identified at 27 – 35 kDa (α -, β - and γ - gliadins), 37 – 42 kDa (ω 1, 2 – gliadins) and approximately 55 kDa (ω 5 - gliadins). Glutelins were analyzed at 32 – 35 kDa (low molecular weight proteins, LMW) and at 60 – 88 kDa (high molecular weight proteins, HMW). After method validation, differences in the quality and quantity of the analyzed protein compounds could be determined to estimate possible genetic and environmental impacts.

Einfluss der Maillard-Reaktion auf die Struktur boviner Caseinmizellen

U. Möckel, Dresden/D, A. Dürasch/D, T. Henle, Dresden/D

Prof. Dr. Thomas Henle, Technische Universität Dresden, Bergstraße 66, 01069 Dresden/D

Die Proteine der Kuhmilch lassen sich in zwei Hauptgruppen, die Molkenproteine und die Caseine, unterteilen. Die Caseine, die hauptsächlich aus α -, β - und κ -Casein bestehen, aggregieren in der Milch zu Caseinmizellen (CM) mit einer durchschnittlichen Größe von ca. 150 nm. In unbehandelter Kuhmilch liegen weniger als 10 % des Gesamtcaseingehaltes als Monomere vor, wohingegen der Hauptanteil in Mizellen aggregiert ist. [1]

Es konnte gezeigt werden, dass die mizellare Struktur der Caseine in Kuhmilch durch enzymatische Quervernetzungsreaktionen, induziert durch mikrobielle Transglutaminase (mTG), entscheidend beeinflusst werden kann. Beispielweise sind die mTG-behandelten Mizellen stabiler gegenüber einer EDTA- (0 - 0,45 mM), Ethanol- (0 - 74 %) oder Hochdruckbehandlung (bis 400 MPa). [2]

Dem hier vorgestellten Projekt liegt die Hypothese zugrunde, dass auch nicht-enzymatische Glykierungsreaktionen die Wechselwirkungen zwischen mizellar-assoziierten Caseinen beeinflussen. Für die Studie wurden mit Lactose inkubierte CM-Suspensionen auf Glykierungsprodukte und Proteinquervernetzungen analysiert, sowie der Einfluss auf die Größe und Gestalt der Mizellen mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Die Caseinmizellen wurden dazu mittels Ultrazentrifugation bei 100000 x g (1 h, 20 °C) aus Kuhmilch isoliert und anschließend in 4,7 % Lactose-enthaltenden simulierten Milchultrafiltrat resuspendiert. Nach einer Inkubation zwischen 0 - 4 h bei 100 °C zeigten die Mizellsuspensionen mit steigender Inkubationszeit eine Zunahme der Bräunung, wobei es zu keinem Zeitpunkt zu einem Ausfällen der Caseine kam. Im Gegensatz dazu flockten Natriumcaseinat-Proben bereits nach 1 h deutlich aus. Sowohl für Natriumcaseinat als auch für die Mizellproben konnte im Verlauf der Inkubation mittels SDS-PAGE eine deutliche Proteinpolymerisation beobachtet werden, bei mizellarem Casein jedoch in deutlich geringerem Ausmaß. Dies deutet auf eine „Schutzfunktion“ der mizellaren Struktur vor einer Glykierung hin. Im Vergleich zu lactosefreien Proben spielt die Quervernetzung durch Lysinoalanin bei Anwesenheit von Lactose nur eine untergeordnete Rolle, sodass hier die Proteinquervernetzung im Zuge der Maillard-Reaktion entsteht. Die Untersuchungen der CM bezüglich ihrer Größe und äußeren Gestalt mittels DLS und TEM zeigten dabei keine entscheidenden Änderungen. Dies lässt eine starke Strukturierung der Mizelle in ihrem Inneren vermuten, wobei durch Maillard-Reaktions-Produkte vor allem zusätzliche hydrophile Wechselwirkungskräfte ausgebildet und die bereits vorhandenen hydrophoben Interaktionen verstärkt werden könnten. Nach außen hingegen wird die Caseinmizelle durch die Glykierung nicht erkennbar beeinflusst.

Literatur: [1] Belitz et al., Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2009, 5. vollständig überarbeitete Auflage. [2] Partschfeld et al., Biotechnol. J. 2007, 2