

ANNA KONONIUK, ALEKSANDRA BOCIAN, MAŁGORZATA KARWOWSKA,
TADEUSZ DRZAZGA

BIAŁKOWE MARKERY GATUNKOWE JAKO POTENCJALNE NARZĘDZIE MOLEKULARNE DO KONTROLI AUTENTYCZNOŚCI PRODUKTÓW ORKISZOWYCH

Streszczenie

Coraz większe zainteresowanie żywnością ekologiczną powoduje wzrost popularności produktów pochodzących z ziarna pszenicy orkisz, które charakteryzują się dobrymi właściwościami żywieniowymi. Ze względu na duże podobieństwo pszenicy zwyczajnej i pszenicy orkisz występują trudności z ich odróżnieniem w produktach mącznych, celowe jest więc poszukiwanie markerów gatunkowych umożliwiających ich zróżnicowanie.

W pracy podjęto próbę rozróżnienia pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*) i pszenicy orkisz (*Triticum spelta*) na podstawie analiz elektroforetycznych białek zapasowych występujących w ziarniakach. Materiał badawczy stanowiły ziarniaki 10 linii hodowlanych pszenicy zwyczajnej oraz 8 linii hodowlanych pszenicy orkisz. Do izolacji białek zastosowano metody frakcjonowania białek zapasowych. Następnie przeprowadzono rozdziały elektroforetyczne kolejnych frakcji białek: albumin i globulin, gliadyn oraz glutenin. Po zakończonej elektroforezie żełe wybarwiono i dokonano porównania profili białkowych uzyskanych z *T. aestivum* i *T. spelta* w celu identyfikacji potencjalnych markerów białkowych. Uzyskane wyniki nie pozwalają na jednoznaczne określenie występowania białkowego markera odróżniającego pszenicę zwyczajną od pszenicy orkisz. Niemniej jednak mogą stanowić podstawę do rozważań dotyczących wykorzystania bardziej zaawansowanych technik elektroforetycznych (A-PAGE i elektroforezy 2D) do opracowania markerów.

Przedstawione wyniki mogą pomóc w opracowaniu metody identyfikacji podjednostek białkowych specyficznych dla pszenicy orkisz, ułatwiającej wykrywanie zafałszowań żywności.

Słowa kluczowe: pszenica zwyczajna, pszenica orkisz, elektroforeza białek, zafałszowania żywności, białkowe markery gatunkowe

*Mgr inż. A. Kononiuk, dr hab. M. Karwowska, Katedra Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością, Wydz. Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin, dr A. Bocian, Zakład Biotechnologii i Bioinformatyki, Wydz. Chemiczny, Politechnika Rzeszowska, al. Powstańców Warszawy 6, 35-959 Rzeszów, dr inż. T. Drzazga, Małopolska Hodowla Roślin sp. z o.o. Oddział w Kobierzycach, ul. Sportowa 21, 55-040 Kobierzyce.
Kontakt: anna.kononiuk@up.lublin.pl*

Wprowadzenie

Pszenica zwyczajna i orkisz są heksaploidami klasyfikowanymi jako podgatunki gatunku *Triticum aestivum* L. [16] lub jako gatunki rodzaju *Triticum* [6]. Jako zboża blisko spokrewnione mają wiele wspólnych cech, ale również właściwości je odróżniających. Pszenica zwyczajna charakteryzuje się wyższym plonowaniem, łatwością w przetwarzaniu ziaren a także lepszą jakością technologiczną białek zapasowych w porównaniu z pszenicą orkisz [11]. Pszenicę zwyczajną cechuje również większa wartość wypiekowa mąki. Badania porównujące mąkę pochodzącą z pszenicy zwyczajnej i pszenicy orkisz podczas wypieku chleba wskazują na istotne różnice w procesie technologicznym pomiędzy tymi gatunkami [4, 9].

Triticum spelta cechują: większa odporność na choroby oraz mniejsze wymagania klimatyczne i agrotechniczne (nawożenie, środki ochrony roślin), co predysponuje ten gatunek do upraw ekologicznych [17]. Pod względem żywieniowym pszenica orkisz charakteryzuje się większą zawartością łatwiej strawnego białka, korzystniejszym składem aminokwasowym oraz profilem kwasów tłuszczowych, większą zawartością mikroelementów w porównaniu z pszenicą zwyczajną. Różnice w składzie białkowym pomiędzy *T. spelta* a *T. aestivum* mogą mieć wpływ na alergenicność tych zbóż. W niektórych przypadkach choroby na alergię pokarmowe wywołane przez pszenicę zwyczajną mogą spożywać produkty zawierające pszenicę orkisz bez negatywnych konsekwencji dla zdrowia [8, 13].

Mniejszy plon ziarna a także trudności w uprawie *T. spelta* doprowadziły przed laty do wyparcia tego gatunku na rzecz łatwiejszej w uprawie i mniej kosztownej pszenicy zwyczajnej. Obecny wzrost zainteresowania produktami pochodzącymi z pszenicy orkisz związany jest z trendami dotyczącymi żywności ekologicznej, która charakteryzuje się dobrymi właściwościami żywieniowymi.

W celu wyeliminowania niekorzystnych cech pszenicy orkisz od wielu lat stosuje się krzyżowanie obu gatunków. Powstałe w ten sposób mieszańce mają łączyć wysoką wartość odżywczą pszenicy orkisz z dobrymi cechami technologicznymi pszenicy zwyczajnej [7, 12]. Oprócz czystych linii orkiszu przetwarzane są więc także linie mieszańcowe, które są przypisywane do odpowiedniego podgatunku na podstawie cech morfologicznych, takich jak kształt ziarna czy połączenie łusek z jądrem [19]. Cechy determinujące jakość i właściwości biochemiczne konkretnego gatunku nie są ujmowane.

Dodatkowo mogą powstawać zafałszowania produktów orkiszowych innymi ziarnami wynikające z chęci poprawy opłacalności produkcji, nieodpowiednich warunków sanitarnych lub podczas nieodpowiedniego czyszczenia maszyn produkcyjnych przy zmianie rodzaju zboża. Brzeziński [3] przeanalizował 7 komercyjnie dostępnych mąk orkiszowych z wykorzystaniem techniki PCR i wykazał obecność we wszystkich próbkach produktów specyficznych dla pszenicy zwyczajnej. Powyżej

10 % specyficznych produktów wykazano w 3 próbkach. Badania te jednoznacznie wskazują na potrzebę kontroli rynku produktów orkiszowych.

Częste fałszowanie ziaren i przetworów orkiszowych sprawia, że istotne wydaje się znalezienie sposobu na łatwą i szybką identyfikację gatunkową. Naukowcy nieustannie podejmują próby odnalezienia molekularnych markerów odróżniających *T. aestivum* i *T. spelta*. Opisano metody rozróżnienia obu gatunków na podstawie zawartości i składu kwasów tłuszczowych [13], analizy genetycznej [10] oraz identyfikacji różnic w profilach białkowych [7]. Opracowanie metody identyfikacji podjednostek białkowych specyficznych dla pszenicy orkisz mogłoby pomóc w identyfikacji mieszańców charakteryzujących się wysoką jakością frakcji białkowych, a także umożliwić sprawne wykrywanie zafałszowań żywności.

Celem pracy była identyfikacja markerów białkowych umożliwiających rozróżnienie pszenicy orkisz i pszenicy zwyczajnej.

Material i metody badań

Material doświadczalny

Material doświadczalny stanowiły ziarniaki pszenicy zwyczajnej oraz pszenicy orkisz pochodzące z Małopolskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o. Oddział w Kobierzycach. Do badań wykorzystano ziarniaki pochodzące z 10 linii hodowlanych *Triticum aestivum* oraz 6 linii hodowlanych *T. spelta*. Linie hodowlane pszenicy zwyczajnej

Tabela 1. Material do badań: ziarno linii hodowlanych pszenicy zwyczajnej (wraz z dostarczonymi przez hodowcę oznaczeniami podjednostek wysokocząsteczkowych glutenin) oraz ziarno pszenicy orkisz

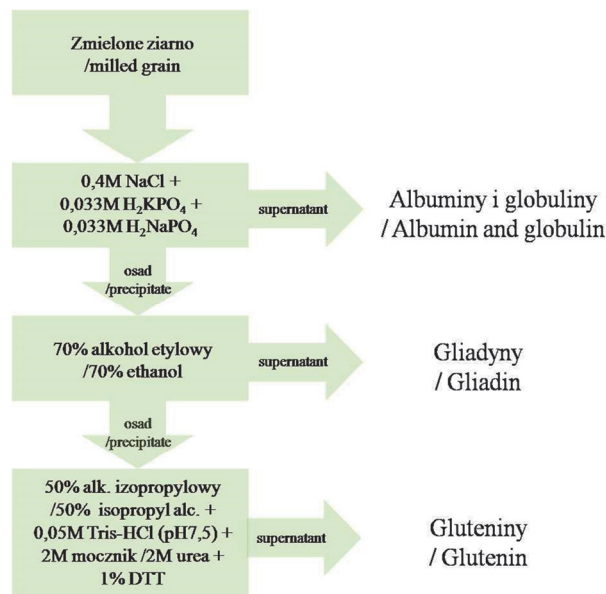
Table 1. Research material: grain of common wheat breeding lines (with markings of high molecular weight glutenin subunits as supplied by the breeder) and spelt wheat grain

Pszenica zwyczajna (<i>Triticum aestivum</i>) Common wheat	Pszenica orkisz (<i>Triticum spelta</i>) Spelt wheat
PT8 (N/7+8/5+10)	1A
PT14 (1/7+8/5+10)	4B
PT24 (2*/6+8/2+12)	8C
PT33 (N/7+8/5+10)	12D
PT36 (1/6+8/2+12)	15E
PT21 (1/7+9/2+12)	18F
PT37 (1/7/5+10)	Miks orkisz (MS)
PT44 (N/17+18/5+10)	-
PT47 (N/6+8/2+12)	-
PT56 (N/14+15/5+10)	-
Miks pszenic (MP) /Wheat mix	-

zostały dostarczone wraz z oznaczonymi, występującymi w nich wysokocząsteczkowymi podjednostkami białek gluteninowych (HMW) – tab. 1. Do badań wybrano linie, które zawierały wszystkie możliwe podjednostki HMW występujące w polskich odmianach pszenic. Dodatkowo utworzono dwie próbki będące mieszaniną materiału pochodzącego ze wszystkich linii hodowlanych w obrębie danego gatunku (zmieszano po 2 g zmielonego ziarna każdej z linii); próbki oznaczono MP (miks linii pszenicy zwyczajnej) oraz MS (miks linii pszenicy orkisz).

Izolacja białek zapasowych

Białka zapasowe izolowano dwiema metodami bazującymi na procedurach opisanych przez Salmanowicza [15] i Brzezińskiego [2]. Pierwszą metodę stosowano do izolacji frakcji białek według schematu przedstawionego na rys. 1. Frakcję albumin i globulin izolowano przy użyciu 0,4 M roztworu NaCl zawierającego 33 mM H_2KPO_4 i H_2NaPO_4 . Osad po izolacji przeznaczano do dalszej ekstrakcji białek gliadynowych, które izolowano przy użyciu 70-procentowego roztworu alkoholu etylowego (POCH, Polska). Pozostały osad wykorzystywano do ekstrakcji białek gluteninowych. W czasie ekstrakcji białek gluteninowych zredukowano je do podjednostek przy użyciu roztworu 50-procentowego alkoholu izopropylowego zawierającego 0,05 M Tris-HCl (pH 7,5; ROTH, Niemcy), 2 M mocznika (BioShop, Kanada) oraz 1 % DTT (ditiotreitrol,



Rys. 1. Schemat izolacji i frakcjonowania białek zapasowych

Fig. 1. Flow diagram of extraction and fractionation of storage proteins

ROTH, Niemcy). Następnie ekstrakty pochodzące z każdej frakcji strącano zmrożonym acetonem w stosunku 1 : 5. Białka po strąceniu oddzielano przez wirowanie i suszono. Otrzymane frakcje białek w całości rozpuszczano w roztworze obciążającym do elektroforezy (125 mM Tris-HCl, pH 8,0), zawierającym 3 % SDS (dodecylosiarczanu sodu, BioShop, Kanada), 4 % 2-meraktoetanolu (BioShop, Kanada), 10 % glicerolu (ROTH, Niemcy) oraz błękit bromofenyłowy (BioShop, Kanada) jako barwnik.

Izolacja białek zapasowych opisana przez Brzezińskiego [2] obejmowała ekstrakcję wszystkich białek zapasowych. Jako bufor ekstrakcyjny stosowano rozcieńczony wodą (w stosunku 1:1) 0,05 M Tris-HCl (pH 7,85) zawierający 4 % SDS (BioShop, Kanada), 10 % glicerolu (ROTH, Niemcy) oraz błękit bromofenyłowy (BioShop, Kanada) jako barwnik.

Oznaczenie stężenia, dobór stężenia białek

W celu optymalizacji wyników zgodnie z metodą Bradford [1] oznaczano stężenia białek występujących w każdej frakcji, przeprowadzono rozdziały elektroforetyczne i dobierano ilości białka optymalne dla każdej frakcji, nakładane na żel.

Rozdział elektroforetyczny

Rozdział elektroforetyczny prowadzono w aparacie BioRadProtean II xicell (BioRad, USA) w warunkach denaturujących – SDS-PAGE, dzięki czemu rozdział elektroforetyczny zachodził tylko ze względu na ciężar cząsteczkowy rozdzielanych białek, a nie ich ładunek. Stosowano dwa rodzaje żeli: zagęszczający i rozdzielający. Różniły się one między sobą zarówno wartością pH (odpowiednio: 6,8 i 8,9), jak i usieciowaniem (odpowiednio: 6 i 11 %). Na żele nakładano jednakowe ilości białek każdej frakcji, a mianowicie: wszystkie białka zapasowe – 450 µg, frakcja albumin i globulin – 40 µg, frakcje gliadynowa i gluteninowa – po 110 µg. Elektroforezę prowadzono w stałej temp. 12 °C. Przez pierwsze 15 min napięcie wynosiło 100 V, następnie zwiększano je do 300 V. Rozdział prowadzono do momentu wypłynięcia barwnika z żelu. Białka uwidoczniano na żelu roztworem barwiącym, który zawierał 0,08 % barwnika Coomassie Brilliant Blue G-250 (BioShop, Kanada), 8 % siarczanu amonu (BioShop, Kanada), 0,8 % kwasu ortofosforowego (POCH, Polska) oraz 20 % metanolu (POCH, Polska).

Badania przeprowadzono w dwóch etapach. Wstępnie porównywano białka uzyskane z miksów pszenic zwyczajnych z kolejnymi liniami pszenicy orkisz oraz miksem pszenicy orkisz. Następnie porównywano białka wszystkich linii hodowlanych pszenicy zwyczajnej z liniami hodowlanymi pszenicy orkisz. Dobór materiału do elektroforezy miał na celu wstępne sprawdzenie, czy w badanym materiale istnieje możliwość występowania markerów białkowych, a następnie szczegółową analizę białek występu-

jących we wszystkich próbkach pszenicy zwyczajnej (*T. aestivum*) i pszenicy orkisz (*T. spelta*).

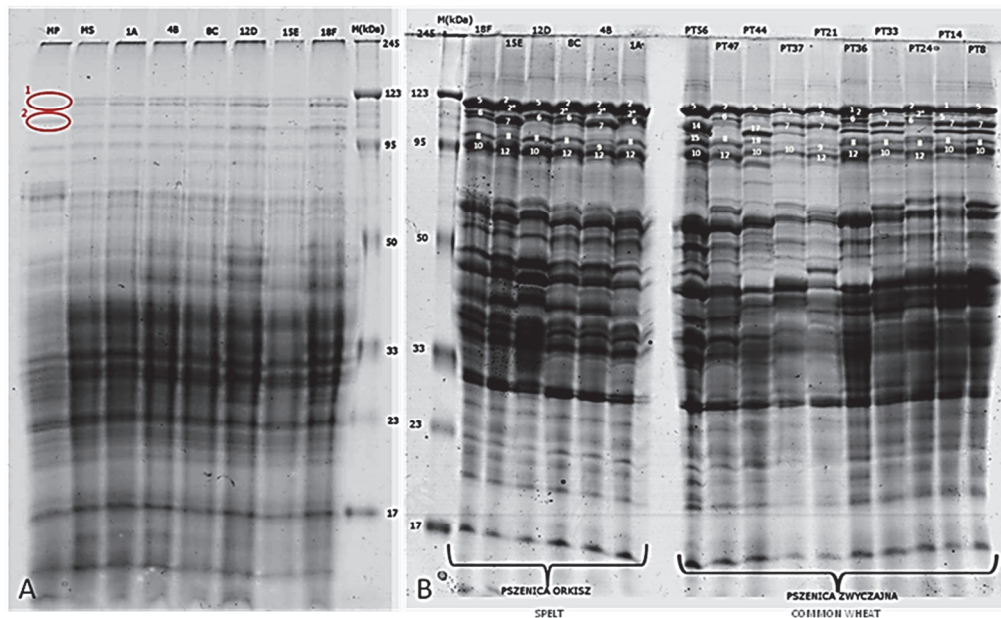
Wyniki i dyskusja

Polimorfizm białek zapasowych to jeden z ważniejszych czynników odpowiedzialnych za zmienność cech reologicznych oraz wypiekowych odmian i rodów pszenicy. Konsekwencją nietypowej budowy fizykochemicznej białek są specyficzne właściwości technologiczne orkiszu. *T. spelta* uważany jest za formę wysokobiałkową, jednak duża zawartość białka nie jest sprzężona z jego wysoką jakością. W efekcie gluten uzyskany z orkiszu cechuje się znaczną rozciągliwością, lecz słabą elastycznością [4, 18].

Na podstawie obrazu rozdziału wszystkich białek zapasowych badanego materiału (rys. 2A) zauważono wyraźne różnice ilościowe między poszczególnymi frakcjami. Znajdująca się w izolacie frakcja wysokocząsteczkowych glutenin była najmniej wyraźna. W miksie pszenic nie wykryto dwóch prążków, które znajdują się w każdej próbce orkiszu, jak i w miksie orkiszu (oznaczono to miejsce nr 1). Numerem 2 oznaczono miejsce, w którym zaobserwowano prążek w przypadku miksu pszenic niewystępujący w żadnej próbce orkiszu. Zaznaczone miejsca mogą być potencjalnymi markerami, służącymi do odróżnienia na obrazie elektroforetycznym prób pszenicy zwyczajnej od pszenicy orkisz.

Elastyczna sieć powstająca podczas formowania ciasta nazywana matrycą glutenową jest odpowiedzialna za właściwości reologiczne i technologiczne powstającego ciasta. Jakość glutenu jest w dużym stopniu determinowana przez rodzaj i jakość wysokocząsteczkowych podjednostek gluteninowych (HMW). Na rys. 2B i 5B oznaczono podjednostki gluteninowe orkiszu. Analiza obrazów wskazuje, że w pszenicy orkisz występują podobne zestawy HMW jak w pszenicy zwyczajnej. Jedną z przyczyn niekorzystnych cech technologicznych białek orkiszu jest m.in. wysoki stosunek frakcji o niskiej masie cząsteczkowej do frakcji cięższych (rys. 2 i 5). Nie należy jednak tych cech uogólniać do całego gatunku, ponieważ wśród form orkiszu można obserwować zróżnicowane właściwości technologiczne [4, 9].

Obraz rozdziału elektroforetycznego frakcji albumin i globulin ziarna wszystkich linii pszenicy zwyczajnej i orkisz (rys. 3) nie pozwolił na zidentyfikowanie miejsc mogących być markerami. Stwierdzono jedynie występowanie różnic intensywności prążków, które mogą być związane z odmienną zawartością poszczególnych białek w obu gatunkach.

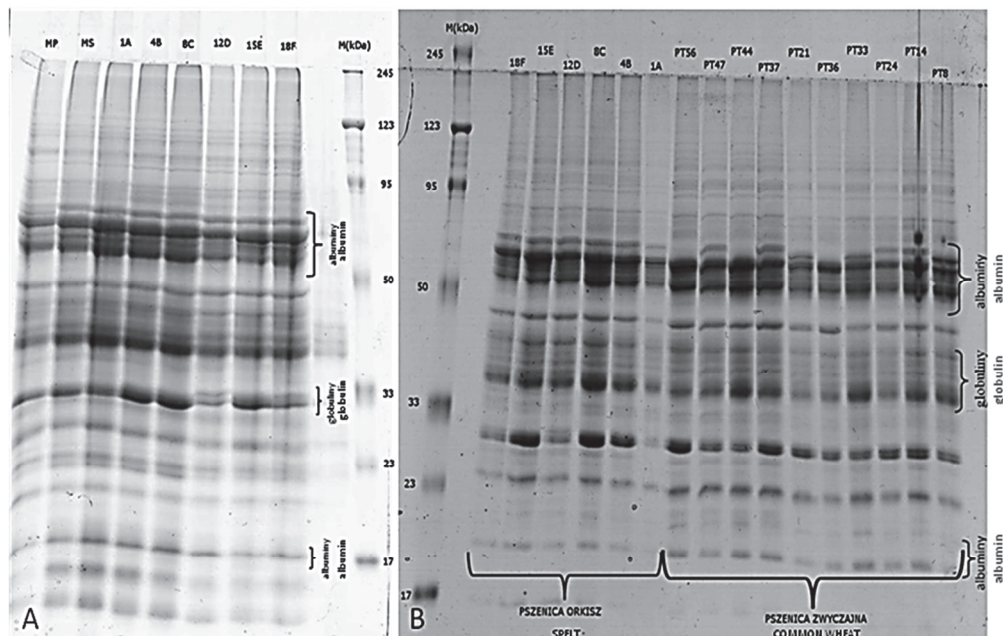


Rys. 2. A. Obraz rozdziału elektroforetycznego białek zapasowych ziarna wyizolowanych z: MP – miks pszenicy zwyczajnej, MS – miks pszenicy orkisz, 1A, 4B, 8C, 12D, 18F – linii hodowlanych *T. spelta*. Na obrazie zaznaczono miejsca potencjalnego występowania markerów. B. Obraz rozdziału elektroforetycznego białek ziarna wyizolowanych ze wszystkich linii hodowlanych pszenicy orkisz (1A – 18F) oraz pszenicy zwyczajnej (PT8 – PT56), z zaznaczonymi jednostkami HMW glutenin

Fig. 2. A. Electrophoregram of storage proteins extracted from: MP – mix of common wheat; MS – mix of spelt wheat; 1A, 4B, 8C, 12D, 18F – breeding lines of *T. spelta*. In the image, areas with potential occurrence of protein markers are marked. B. Electrophoregram of proteins extracted from all the breeding lines of spelt wheat (1A – 18F) and common wheat (PT8 – PT56) with HMW glutenin subunits marked

Kolejną frakcją białek ziarna poddaną elektroforezie były gliadyny (rys. 4). W ścieżce oznaczonej jako miks pszenicy zwyczajnej (MP) zlokalizowano 3 potencjalne miejsca występowania markera. Numerem 1 oznaczono miejsce, w którym nie występuje prążek znajdujący się we wszystkich próbkach pszenicy orkisz. Numerem 2 i 3 oznaczono miejsca, w którym znajdują się białka niewykryte w żadnej próbce orkiszu.

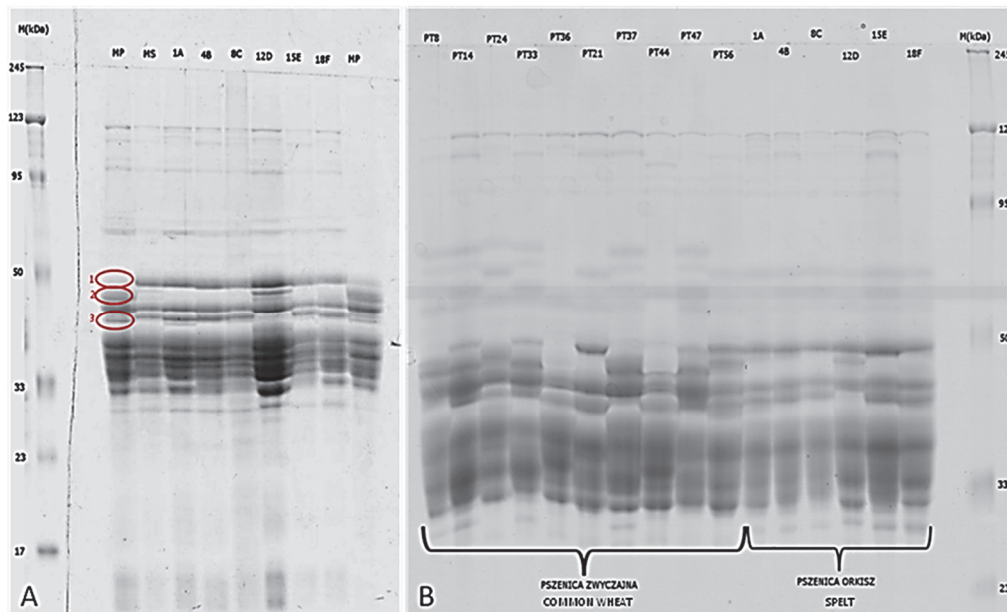
Za jedną z cech charakterystycznych orkiszu uważa się brak kilku prążków zlokalizowanych w strefie wolno migrujących ω -gliadyn określanych symbolem ω -1.2 (w celu odróżnienia od szybciej migrujących w warunkach elektroforezy A-PAGE frakcji ω -5) [5]. Podobne zjawisko zaobserwowali Waga i wsp. [18], jednak częstotliwość charakterystycznych wariantów białkowych była zbyt mała, aby można je było



Rys. 3. A. Obraz rozdziału elektroforetycznego albumin i globulin ziarna wyizolowanych z: MP – miks pszenicy zwyczajnej; MS – miks pszenicy orkisz; 1A, 4B, 8C, 12D, 18F – linii hodowlanych *T. spelta*. B. Obraz rozdziału elektroforetycznego albumin i globulin ziarna wyizolowanych ze wszystkich linii hodowlanych pszenicy orkisz (1A – 18F) oraz pszenicy zwyczajnej (PT8 – PT56)

Fig. 3. A. Electrophoregram of albumin and globulin extracted from: MP – common wheat mix; MS – spelt wheat mix; 1A, 4B, 8C, 12D, 18F – breeding lines of *T. spelta*. B. Electrophoregram of albumin and globulin from all the breeding lines of spelt wheat (1A – 18F) and common wheat (PT8 – PT56)

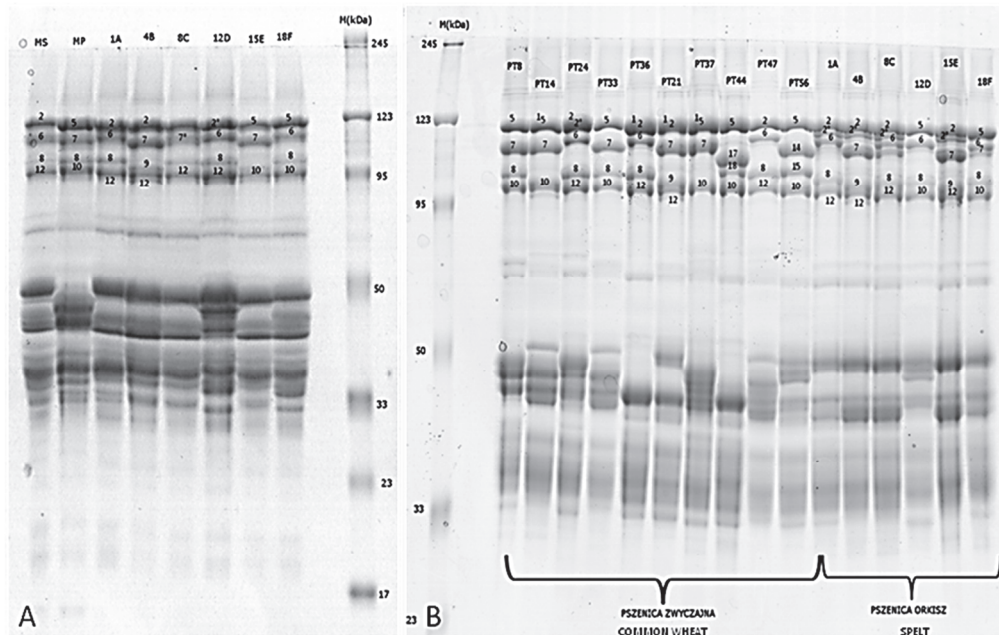
uznać za cechę specyficzną. Po przeprowadzeniu rozdziału frakcji gliadyn (rys. 4B) wszystkich badanych linii pszenic nie udało się potwierdzić obecności markera widocznego na rys. 5A. Koenig i wsp. [7] przebadali ziarno 62 odmian pszenicy orkisz i potwierdzili występowanie czterech białkowych markerów gatunkowych zlokalizowanych we frakcji gliadyn orkisz. Badania te wykonano przy wykorzystaniu techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej w systemie odwróconych faz – jako etapu frakcjonowania białek. Wymienieni autorzy poddali białka redukcji i identyfikacji przy użyciu spektrometru mas MALDI-ToF. Na podstawie występowania poszczególnych markerów oraz charakterystyki białek zapasowych dokonali podziału badanych odmian orkisz na typowe dla swojego gatunku oraz podobne do pszenicy orkisz.



Rys. 4. A. Obraz rozdziału elektroforetycznego gliadyn wyizolowanych z ziarna z zaznaczonymi potencjalnymi miejscami występowania markerów: MP – miks pszenicy zwyczajnej; MS – miks pszenicy orkisz; 1A, 4B, 8C, 12D, 18F – linie hodowlane *T. spelta*. B. Obraz rozdziału elektroforetycznego frakcji gliadyn ziarna wyizolowanych ze wszystkich linii hodowlanych pszenicy orkisz (1A – 18F) i pszenicy zwyczajnej (PT8 – PT56)

Fig. 4. A. Electrophoregram of gliadins with selected areas of potential occurrence of protein markers and gliadins were extracted from: MP – mix of common wheat; MS – mix of spelt wheat; 1A, 4B, 8C, 12D, 18F – breeding lines of *T. spelta*. B. Electrophoregram of gliadins from all the breeding lines of spelt wheat (1A – 18F) and common wheat (PT8 – PT56)

Ostatnią frakcją, w której poszukiwano markerów, były wysokocząsteczkowe gluteniny. W obrazie rozdziału elektroforetycznego (rys. 5) oprócz frakcji glutenin wysokocząsteczkowych o masie cząsteczkowej $(90 \div 123) \cdot 10^3$ Da wystąpiła także frakcja gliadyn o masie $(33 \div 50) \cdot 10^3$ Da. Na rys. 5. zaznaczono rozpoznane podjednostki gluteninowe. Nie wszystkie udało się zidentyfikować ze względu na to, że prążki nie mają wyraźnych granic i są dość gęsto ułożone. Pośród tej frakcji nie znaleziono prążków, które mogłyby być markerami. W miksie pszenicy zwyczajnej, jak i w miksie orkiszu nie znaleziono prążków odpowiadających wszystkim podjednostkom występującym w poszczególnych próbkach składających się na miks. Prawdopodobnie jest to skutkiem tego, że niektóre podjednostki występują rzadziej w badanych liniach, a więc ich stężenie jest niższe i nie są zauważalne na obrazie elektroforetycznym. W analizie obrazów elektroforetycznych nie wykazano występowania potencjalnego markera białkowego w tej frakcji białek zapasowych.



Rys. 5. A. Obraz rozdziálu elektroforetycznego glutenin ziarna wyizolowanych z: MP – miks pszenicy zwyczajnej, MS – miks pszenicy orkisz, 1A, 4B, 8C, 12D, 18F – linii hodowlanych *T. spelta*. B: Obraz rozdziálu elektroforetycznego glutenin wyizolowanych z ziarna wszystkich linii hodowlanych pszenicy orkisz (1A – 18F) i pszenicy zwyczajnej (PT8 – PT56)

Fig. 5. A. Electrophoregram of glutenins in grains extracted from: MP – mix of common wheat; MS – mix of spelt; 1A, 4B, 8C, 12D, 18F – breeding lines of *T. spelta*. B. Electrophoregram of glutenins extracted from all the breeding lines of spelt wheat (1A – 18F) and common wheat (PT8 – PT56)

Obrazy frakcji albumin i globulin oraz gliadyn przedstawiają głównie pożądane frakcje (rys. 3 i 4). W przypadku frakcji glutenin (rys. 5) zaobserwowano także frakcję gliadynową. Może mieć na to wpływ umiejscowienie niskocząsteczkowych podjednostek gluteninowych mających podobną masę jak gliadyny. Na taki obraz wpływ może mieć także znaczna heterogeniczność gliadyn i glutenin. Ich podjednostki mają podobny skład oraz sekwencje aminokwasów, co decyduje o tym, że zarówno gluteniny, jak i gliadyny są rozpuszczalne w 70-procentowym etanolu po uprzedniej redukcji. Niemniej jednak uzyskane obrazy elektroforetyczne pozwalają na skuteczną identyfikację podjednostek HMW glutenin.

Opisywane w literaturze markery genetyczne, odpowiedzialne za kodowanie białek zapasowych, dają nadzieję na znalezienie różnic białkowych w pszenicy zwyczajnej i orkisz. Do osiągnięcia tego celu niezbędne wydaje się inne podejście metodyczne, optymalizujące metody ekstrakcji i frakcjonowania białek zapasowych oraz umożli-

wiające skuteczniejszą identyfikację jakościową i ilościową różnic międzygatunkowych.

Wnioski

1. Uzyskane wyniki badań nie pozwoliły na identyfikację markera białkowego odróżniającego pszenicę zwyczajną od pszenicy orkisz.
2. Odnalezienie i identyfikacja markerów białkowych mogłaby pozwolić na zmniejszenie czasu i kosztów identyfikacji zafałszowań ziarna orkiszu, a także pozwoliłaby na szersze badania dotyczące specyficznych białek występujących w produktach orkiszowych.

Literatura

- [1] Bradford M.M.: Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248-254.
- [2] Brzeziński W.: Katalog elektroforetyczny odmian zbóż zarejestrowanych w Polsce. *Wiadomości Odmianoznawcze*, 2003, **78**, 1-101.
- [3] Büren M., Stadler M., Lüthy J.: Detection of wheat adulteration of spelt flour and products by PCR. *Eur. Foods Res. Technol.*, 2001, **212**, 234-239.
- [4] Callejo M., Vargas-Kostiuk M.-E., Rodríguez-Quijano M.: Selection, training and validation process of a sensory panel of bread analysis: Influence of cultivar on the quality of breads made from common wheat and spelt wheat. *J. Cereal Sci.*, 2015, **61**, 52-62.
- [5] Federman G.R., Goecke E.U., Stainer A.M.: Research note: Detection of adulteration of flour of spelt (*Triticum spelta* L.) with flour of wheat (*Triticum aestivum* L. emend. Fiori et. Paol.) by electrophoresis. *Plant Var. Seeds*, 1992, **5**, 123-125.
- [6] Knüpfner H., Morrison L.A., Filatenko A.A., Hammer K., Morgounov A., Faberová I.: English translation of the 1979 Russian taxonomic monograph of *Triticum* L. by Dorofeev et al. Project progress report. *Schriften zu Genetischen Ressourcen*, 2004, **22**, 282-283.
- [7] Koenig A., Konitzer K., Wieser H., Koehler P.: Classification of spelt cultivars based on differences in storage protein composition from wheat. *Food Chem.*, 2015, **168**, 176-182.
- [8] Kohajdová Z., Karovičová J.: Nutritional value and baking applications of spelt wheat. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 2008, **7** (3), 5-14.
- [9] Krawczyk P., Ceglińska A., Kardialik J.: Porównanie wartości technologicznej ziarna orkiszu z pszenicą zwyczajną. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, **5** (60), 43-51.
- [10] Mayer F., Haase I., Graubner A., Heising F., Paschke-Kratzin A., Fischer M.: Use of polymorphisms in the γ -gliadin gene of spelt and wheat as a tool for authenticity control. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**, 1350-1357.
- [11] Nawracała J.: Genetyczne podstawy hodowli pszenicy (*Triticum aestivum* L.). W: *Zarys genetyki zbóż. Tom I. Jęczmień, pszenica i żyto* Red. A.G. Górny. Wyd. IGR PAN, Poznań 2004, ss. 181-327.
- [12] Onishi I., Hongo A., Saskuma T., Kawahara T., Kato K., Miura H.: Variation and segregation for rachis fragility in spelt wheat *Triticum spelta* L. *Genet. Resour. Crop Ev.*, 2006, **53**, 985-992.
- [13] Pruska-Kedzior A., Kedzior Z., Klockiewicz-Kaminska E.: Comparison of viscoelectric properties of gluten from spelt and common wheat. *Eur. Food Res. Technol.*, 2008, **227**, 199-207.
- [14] Rubal-Mendieta N.L., Dekeyser A., Delacroix D.L., Mignolet E., Larondelle Y., Meurens M.: The oleate/palmitate ratio allows the distinction between wholemeals of spelt (*Triticum spelta* L.) and winter wheat (*T. aestivum* L.). *J. Cereal Sci.*, 2004, **39**, 413-415.

- [15] Salmanowicz B.P., Dylewicz M., Nowak J. Wpływ składu wysokocząsteczkowych podjednostek gluteninowych pszenicy na wybrane właściwości reologiczne ciasta. W: Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych Red. B. Naganowska, P. Kachlicki, P. Krajewski. Wyd. IGR PAN, Poznań 2009, ss. 173-183.
- [16] Slageren M.W.: Wild wheats: A monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. & Spach) Eig (*Poaceae*). Wageningen Agricult. Univ. Papers, 1994, **7 (94)**, p. 513.
- [17] Sulewska H.: Wpływ wybranych zabiegów agrotechnicznych na plonowanie i skład chemiczny ziarna formy ozimej orkiszu pszennego (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*). Pamiętnik Puławski, 2004, **35**, 285-292.
- [18] Waga J., Stachowicz M., Karska K.: Polimorfizm białek gliadynowych i gluteninowych a zmienność cech technologicznych u mieszańców orkiszu i pszenicy zwyczajnej. Biul. Inst. Hodow. Aklim. Roś., 2009, **253**, 103-116.
- [19] Wiwart M., Suchowilska E., Lajszner W., Graban Ł.: Identification of hybrids of spelt wheat and their parental forms using shape and color descriptors. Comp. Elect. Agric., 2012, **83**, 68-76.

SPECIES-SPECIFIC PROTEIN MARKERS AS POTENTIAL MOLECULAR TOOL FOR AUTHENTICITY CONTROL OF SPELT PRODUCTS

S u m m a r y

The growing interest in organic food causes the popularity increase in products made from spelt wheat grain, which are characterized by good nutritional values. Because of the high similarity between common wheat and spelt wheat, it is difficult to distinguish them in flour products; so, it seems advisable to search for species-specific markers that could facilitate the distinction between them.

In the paper, an attempt was made to distinguish between the common wheat (*Triticum aestivum*) and the spelt wheat (*Triticum spelta*) on the basis of electrophoretic analyses of storage proteins found in kernels. The research material consisted of the kernels of 10 common wheat breeding lines and of 8 spelt wheat breeding lines. Fractionation techniques of wheat storage proteins were applied to isolate proteins. Next, electrophoretic separations were performed of the subsequent fractions of proteins: albumins and globulins, gliadins, and glutenins. After the completed electrophoresis, the gels were stained and there were compared the protein profiles obtained from *T. aestivum* and *T. spelta* to identify potential protein markers. Based on the results obtained, it is not possible to unmistakably determine the occurrence of a protein marker that distinguishes the common wheat from the spelt wheat. However, those results might provide a basis to discuss the application of more advanced electrophoretic techniques (A-PAGE and 2D electrophoresis) in order to develop markers.

The results as presented in the paper could help develop a method to identify protein subunits being specific for spelt wheat facilitating the detection of food adulteration.

Key words: common wheat, spelt wheat, electrophoresis of proteins, food adulteration, species-specific protein markers ☒