

*Miglioramento delle caratteristiche qualitative delle
semole tramite la manipolazione della composizione
proteica della cariosside*

D. Lafiandra¹, C. Patacchini¹, S. Masci¹

¹ Dipartimento di Agrobiologia ed Agrochimica, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo.

1. Introduzione

Le prolammine (così chiamate per l'alto contenuto in prolina e glutammina) costituiscono l'80% circa delle proteine totali della cariossida dei frumenti e sono le principali responsabili delle caratteristiche tecnologiche degli impasti ottenuti da semole o farine. Le prolammine costituiscono il glutine e sono rappresentate principalmente da gliadine e glutenine. Le prime sono molecole monomeriche tipicamente classificate in alfa, beta, gamma e omega, in ordine di mobilità decrescente in elettroforesi acida. La condizione monomerica è dovuta all'assenza di residui cisteinici, come nel caso delle omega-gliadine, o alla presenza di soli legami disolfuro intra-molecolari (le rimanenti gliadine). Con il termine glutenine viene designato, invece, un complesso polimerico, costituito da subunità ad alto (HMW-GS) e a basso (LMW-GS) peso molecolare, stabilizzato da ponti disolfuro inter ed intramolecolari. Essi sono stati scarsamente caratterizzati a causa delle elevate dimensioni molecolari che possono essere dell'ordine di grandezza di diversi milioni. Tali dimensioni dipendono dalla quantità delle subunità gluteniniche costituenti, e dalle caratteristiche strutturali delle stesse, quali estensione del dominio ripetuto, e numero e posizione dei residui cisteinici. Dato il loro ruolo fondamentale nel determinare gli aspetti funzionali del glutine, risulta importante avere una conoscenza più dettagliata della composizione ed organizzazione dei polimeri gluteninici.

Le HMW-GS vengono a loro volta suddivise in subunità di tipo x e y, che differiscono sia nell'organizzazione del dominio centrale ripetuto, ricco in prolina e glutammina, che nel numero dei residui cisteinici; le subunità di tipo x hanno sempre quattro cisteine, tranne la subunità 1Dx5 che ne ha cinque, mentre le subunità di tipo y ne hanno sette (Shewry et al., 1992). Esse differiscono dalle altre proteine di riserva per il peso molecolare compreso tra 70.000 e 90.000 e per l'alto contenuto in glicina e un più basso contenuto in prolina.

Dallo studio della loro struttura secondaria è risultato che le HMW-GS hanno una regione centrale con conformazione a b-spirale, ricca di glutammina e prolina, amminoacidi responsabili dell'elasticità e flessibilità della struttura proteica mentre le regioni terminali, che presentano una conformazione ad a-elica, contengono i residui di cisteina coinvolti nella formazione di ponti disolfuro.

Nei frumenti teneri (AABBDD) le HMW-GS sono codificate dai geni presenti ai loci *Glu-1* situati sui bracci lunghi dei cromosomi 1A, 1B e 1D (*Glu-A1*, *Glu-B1* e *Glu-D1*); ognuno di questi loci è costituito da due geni strettamente associati che codificano per le due diverse subunità proteiche *x* con peso molecolare maggiore, ed *y* con peso molecolare minore. Tutte le cultivar di frumento tenero posseggono le subunità 1Bx, 1Dx e 1Dy; alcune presentano anche la subunità 1By e/o la 1Ax; la subunità 1Ay è sempre assente in frumenti teneri e duri, mentre è presente nei frumenti selvatici diploidi e tetraploidi, progenitori degli attuali frumenti coltivati. Quando si verifica la contemporanea assenza della subunità di tipo *x* ed *y* al locus *Glu-A1* si parla di allele nullo. Il polimorfismo presente a ciascun locus è stato descritto da Payne et al. (1984a), che stabilirono una numerazione per identificare le diverse varianti alleliche e definirono anche le correlazioni tra queste e le caratteristiche qualitative (panificabilità) dei frumenti teneri. Le combinazioni casuali dei possibili alleli presenti ai loci *Glu-A1*, *Glu-B1* e *Glu-D1* fa sì che il numero delle HMW-GS varia da 3 a 5 nei frumenti teneri e da 2 a 3 nei frumenti duri.

Le LMW-GS rappresentano un complesso molto eterogeneo di proteine con peso molecolare compreso tra 20.000 e 45.000, comprendente subunità designate di tipo B, C e D. Le tipiche LMW-GS appartengono prevalentemente al gruppo B, mentre i gruppi C e D corrispondono a gliadine modificate nel numero di cisteine, caratteristica che le ha rese funzionalmente subunità gluteniniche e quindi parte del polimero gluteninico. In particolare, le subunità C sono rappresentate principalmente da gliadine modificate di tipo alfa, beta e gamma (Masci et al., 2002), mentre le subunità D sono omega-gliadine che hanno acquisito un residuo cisteinico per mutazione (Masci et al., 1993; 1999). I geni codificanti per le LMW-GS sono essenzialmente presenti ai loci *Glu-3* (*Glu-A3*, *Glu-B3* e *Glu-D3*), situati sul braccio corto dei cromosomi omeologhi del gruppo 1 e più o meno strettamente associati ai loci *Gli-1* che controllano la sintesi delle gliadine.

Le gliadine contribuiscono alla viscosità dell'impasto, mentre le glutenine sono responsabili dell'elasticità e della tenacità (Veraverbeke e Delcour, 2002). In particolare, la quantità e le dimensioni dei polimeri gluteninici sono positivamente correlate con le proprietà tecnologiche degli impasti (MacRitchie e Lafiandra, 1997). Queste caratteristiche dei polimeri gluteninici dipendono perciò dalla capacità delle singole subunità componenti di formare polimeri più o meno estesi. Sulla base di tale capacità, le subunità gluteniniche vengono funzionalmente suddivise in tre gruppi:

(i) gli “allungatori di catena” che, possedendo due residui cisteinici liberi per formare due legami disolfuro intermolecolari, sono in grado di allungare linearmente il polimero gluteninico. A questa categoria corrispondono principalmente le tipiche LMW-GS e alcune HMW-GS;

(ii) i “ramificatori di catena”, che posseggono tre o più residui cisteinici per la formazione di legami covalenti intermolecolari, contribuendo così all'accrescimento non lineare dei polimeri gluteninici. Probabilmente alcune varianti alleliche di HMW-GS sono in grado di esplicare questo ruolo (10);

(iii) i “terminatori di catena” che, possedendo un unico residuo di cisteina libero, interferiscono con la crescita del polimero gluteninico durante le fasi di maturazione della cariosside. Le gliadine modificate (LMW-GS appartenenti ai gruppi C e D) presumibilmente svolgono questo ruolo. Benché tutte le proteine di riserva contribuiscano a determinare le caratteristiche qualitative degli impasti, vi sono delle differenze esercitate dalle diverse classi proteiche a seconda del prodotto finale considerato: ad esempio, la composizione in HMW-GS è fondamentale nel determinare le caratteristiche panificatorie del frumento tenero, mentre le LMW-GS lo sono per le proprietà pastificatorie del frumento duro. In particolare, queste ultime presentano due principali forme alleliche nel frumento duro: le LMW-1, tipiche delle cultivar di frumento duro di qualità più scadente, e le LMW-2, caratteristiche invece delle cultivar migliori (Payne et al., 1984b; Pogna et al., 1988). Le LMW-2 sono notevolmente più abbondanti delle LMW-1 (Masci et al., 1995), e la quantità di LMW-GS sembra essere il fattore determinante delle differenze qualitative tra LMW-1 e LMW-2, sebbene differenze strutturali non possano essere del tutto escluse. L'elevato numero di varianti alleliche esistenti per le subunità gluteniniche ad alto e basso peso molecolare ha permesso di evidenziare il loro diverso ruolo nell'influenzare le caratteristiche funzionali degli impasti modulando le dimensioni dei polimeri gluteninici. Le basi molecolari che determinano le differenze qualitative associate alle diverse varianti alleliche sono oggetto di studio approfondito da parte di numerosi gruppi di ricerca.

2. Caratterizzazione delle subunità di tipo C e loro controllo cromosomico

L'impiego di tecniche elettroforetiche e cromatografiche ha permesso una buona caratterizzazione delle HMW-GS e LMW-GS di tipo B. Al contrario, le subunità di tipo C pur rappresentando dal 20 al 40% delle LMW-GS totali sono state scarsamente studiate per la mancanza di protocolli idonei per il loro isolamento. Recentemente, utilizzando concentrazioni crescenti di 1-propanolo è stato possibile separare le LMW-GS di tipo C dalle altre subunità gluteniniche nella cultivar di frumento tenero Chinese Spring (Masci et al., 2002). Tale frazione è stata caratterizzata mediante sequenze amminoacidiche N-terminali, cromatografia liquida ad alta prestazione e separazioni elettroforetiche. I risultati hanno permesso di confermare la validità del protocollo nell'ottenere una frazione arricchita di subunità C costituita, prevalentemente, da subunità gliadiniche modificate di tipo alfa/beta e gamma.

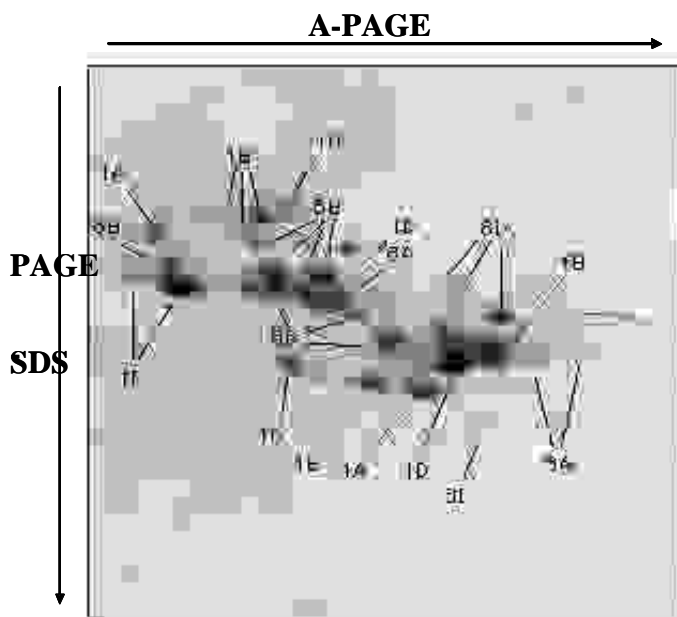


Fig. 1. Separazione elettroforetica bidimensionale (A-PAGE/SDS-PAGE) delle LMW-GS di tipo C presenti nella cultivar di frumento tenero Chinese Spring e localizzazione cromosomica dei geni corrispondenti.

La separazione elettroforetica bidimensionale (A-PAGE X SDS-PAGE) della suddetta frazione permette di identificare oltre trenta differenti componenti (Fig. 1); inoltre l'impiego di linee aneuploidi disponibili per la varietà di frumento tenero Chinese Spring ne ha permesso la loro assegnazione cromosomica. In particolare i geni responsabili della sintesi delle subunità di tipo C risultano presenti sui bracci corti dei cromosomi omeologhi 1 e 6, così come accade per le gliadine classiche. L'analisi di linee segreganti, ottenute da incroci che differivano nella composizione gliadinica e delle LMW-GS di tipo C, hanno permesso di stabilire uno stretto linkage tra i geni che controllano la sintesi dei due gruppi di proteine.

Successive analisi bidimensionali delle subunità C presenti in numerose varietà di frumenti duri hanno permesso di rilevare notevole polimorfismo che si sta attualmente impiegando per accertare la possibile influenza di queste particolari componenti del glutine sulle proprietà tecnologiche degli sfarinati prodotti da frumenti duri e teneri.

3. Manipolazione della composizione HMW-GS dei frumenti duri

Le subunità HMW rappresentano solo il 5-10% delle proteine totali dell'endosperma ma sono molto importanti dal punto di vista funzionale in quanto sono le maggiori responsabili dell'elasticità del glutine.

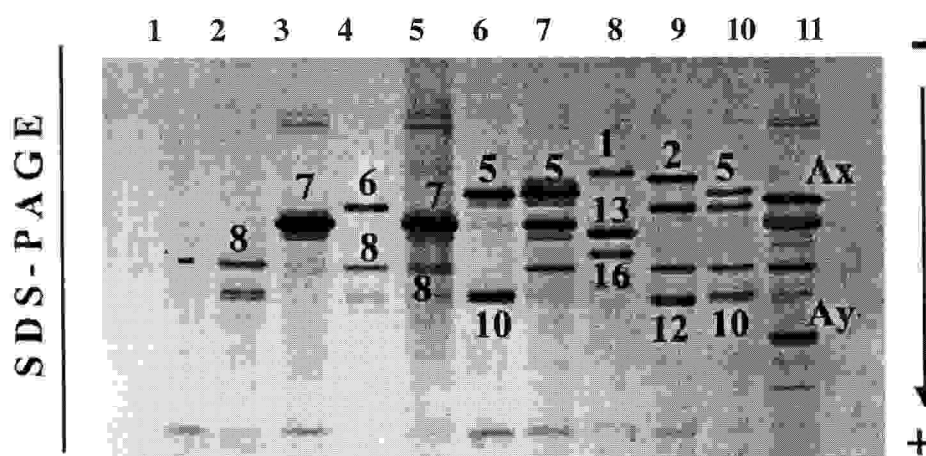


Fig. 2. Separazione elettroforetica di genotipi di frumento duro modificati nella composizione delle HMW-GS. Nella foto sono riportati genotipi in cui il numero delle HMW-GS varia da zero a quattro. In 4 e 5 sono riportati gli alleli più comunemente presenti nelle varietà di frumento duro.

Il ruolo delle subunità gluteniniche ad alto peso molecolare nell'influenzare le caratteristiche qualitative degli impasti ottenuti da farine di frumento tenero è abbastanza noto, tipo e numero di subunità influenzano le caratteristiche reologiche degli impasti grazie alla loro capacità di influenzare le dimensioni dei polimeri gluteninici. La situazione non è altrettanto definita in frumento duro (AABB) a causa della limitata variabilità esistente al locus *Glu-B1* e la quasi costante presenza di allele nullo al locus *Glu-A1*. Per incrementare tale variabilità sono state prodotte linee isogeniche, usando come genitori ricorrenti alcune varietà di frumento duro italiane, in cui con metodologie classiche e/o innovative (ingegneria cromosomica, trasformazione) la composizione in subunità gluteniniche ad alto peso molecolare è stata opportunamente modificata (Fig. 2). Utilizzando accessioni di *T. dicoccoides* in cui entrambe le subunità associate al locus *Glu-A1* sono presenti è stato possibile ottenere linee di frumenti duri con quattro HMW-GS (Fig. 2-11); prove qualitative hanno messo in evidenza caratteristiche superiori di tali linee, rispetto alle varietà di partenza (Ciaffi et al., 1995).

Sempre in frumento tenero, le glutenine HMW-GS presenti sul braccio corto del cromosoma 1D influenzano, anche se non in modo esclusivo, molte delle proprietà reologiche che rendono il glutine del frumento tenero più adatto alla panificazione rispetto a quello dei frumenti duri. In particolare due varianti alleliche sono presenti al locus *Glu-D1* designate 5+10 e 2+12, la prima associata a caratteristiche qualitative superiori rispetto alla seconda.

Tramite ingegneria cromosomica, segmenti cromosomici contenenti geni codificanti per le coppie 5+10 o 2+12, normalmente associate al locus *Glu-D1* in frumento tenero, sono state traslocati sul cromosoma 1A della varietà di frumento duro Svevo, sostituendo la situazione nulla al locus *Glu-A1*. (Fig. 2-9, 10).

Poichè la linea con la traslocazione 1D/1A che coinvolge la coppia 5+10 è stata reincrociata con Svevo un numero sufficiente di volte, tale linea è stata moltiplicata e sottoposta ad analisi biochimiche e qualitative. In particolare sono state effettuate analisi cromatografiche per studiare l'effetto delle subunità 5+10 sulle dimensioni dei polimeri gluteninici ed analisi reologiche con micromixografo (Tab 1).

I parametri cromatografici della cultivar Svevo, ottenuti mediante cromatografia ad esclusione molecolare, non sono molto differenti, per quanto riguarda le proteine polimeriche totali (%Peak1) e le proteine monomeriche (%Peak2 e %Peak3), da quelli ottenuti per la linea isogenica derivata. Al contrario una differenza significativa esiste quando si considera la % di proteine polimeriche non estraibili (%UPP) che risulta superiore nella linea

contenente la coppia 5+10 rispetto a Svevo. Tale parametro, indicativo della presenza di polimeri gluteninici di dimensioni molecolari più elevate, risulta consistente con la forza degli impasti come dedotta da prove mixografiche; infatti il tempo di sviluppo dell'impasto ottenuto dalla linea isogenica risulta superiore a Svevo.

Composizione Gluteninica	%Peak 1	% Peak 2	%Peak 3	%UPP	Mixographic peak dev. time (min)
7+8	47.2	41.9	10.9	54.1	5.1
7+8/5+10	49.8	40.0	10.2	62.1	15.0

Tab. 1. Parametri cromatografici e reologici della cultivar di frumento duro Svevo e linea isogenica derivata con la coppia di subunità 5+10.

Oltre alle linee sopra descritte, sono in fase di realizzazione altre linee isogeniche caratterizzate da composizione in HMW-GS particolare. Ad esempio saranno presto disponibili linee totalmente prive di HMW-GS (Fig. 2-1) o con singola subunità di tipo y o x (Fig. 2-2,3). Tali materiali serviranno a chiarire ulteriormente il ruolo delle HMW-GS nell'influenzare le caratteristiche tecnologiche degli sfarinati ottenuti da frumento duro.

4. Conclusioni

Gli studi condotti negli ultimi decenni, accoppiati all'impiego di tecnologie innovative, hanno permesso di chiarire le basi genetiche e molecolari delle caratteristiche qualitative nei frumenti duri e teneri. Le HMW-GS possono essere opportunamente modificate, impiegando approcci diversi, permettendo l'ottenimento di materia prima con caratteristiche qualitative superiori e possibilità di sviluppo di nuovi prodotti. Resta da approfondire il ruolo di alcune componenti del glutine, come le subunità C, nell'influenzare le caratteristiche tecnologiche degli sfarinati; a tal proposito, l'impiego di materiale genetico opportunamente sviluppato risulterà determinante come avvenuto per le HMW-GS e LMW-GS.

Bibliografia

- Ciaffi M., Lafiandra D., Turchetta T., Ravaglia S., Bariana H., Gupta R. e MacRitchie F. (1995), *Bread baking potential of durum wheat lines expressing both x- and y-type subunits at the Glu-A1 locus*. Cereal Chem. 72:465-469.
- MacRitchie F. e Lafiandra D. (1997), *Structure-functionality relationships of wheat proteins*, in Food Proteins and their Applications (S. Damodaran, ed.) Marcel Dekker, New York, pp.293-324
- Masci S., Lafiandra D., Porceddu E., Lew E. J. L., Tao H. P. e Kasarda D. D. (1993), *D Glutenin subunits: N-Terminal Sequences and Evidence for the Presence of Cysteine*. Cereal Chem. 70:581-585.
- Masci S., Lew E.J.L., Lafiandra D., Porceddu E., Kasarda D. D. (1995), *Characterization of low-molecular-weight glutenin subunits in durum wheat by RP-HPLC and N-Terminal sequencing*. Cereal Chem. 72:100-104.
- Masci S., Rovelli L., Monari A. M., Pogna N. E., Boggini G., Lafiandra D. (2000), *Characterization of a LMW-2 type durum wheat cultivar with poor technological properties*, in 'Wheat Gluten' (P.R. Shewry and A.S. Tatham eds.), RSC, pp. 16-19.
- Masci S., Egorov T. A., Ronchi C., Kuzmicky D. D., Kasarda D.D. e Lafiandra D. (1999), *Evidence for the presence of only one cysteine residue in the D-type Low-Molecular-Weight subunits of wheat glutenin*. J. Cereal Sci. 29:17-25.
- Masci S., Rovelli L., Kasarda D. D., Vensel W. H., Lafiandra D. (2002), *Characterisation and chromosomal localisation of C-type low molecular weight glutenin subunits in the bread wheat cultivar Chinese Spring*. Theor. Appl. Genet. 104:422-428.
- Payne P. I., Jackson E. A. e Holt L. M. (1984a), *The association between g-gliadin 45 and gluten strength in durum wheat varieties, A direct causal effect on the result of genetic linkage*. J Cereal Sci 2:73-81.
- Payne P. I., Jackson E. A. e Holt L. M. (1984b), *Wheat storage proteins: their genetics and their potential for manipulation by plant breeding*. Phil. Trans. Roy. Soc., London, B 304:359-371.
- Pogna N., Lafiandra D., Feillet P. e Autran J. C. (1988), *Evidence for a direct causal effect of low molecular weight glutenin subunits on gluten viscoelasticity in durum wheats*. J Cereal Sci 7:211-214.
- Shewry P. R., Halford N. G. e Tatham A. S. (1992), *High Molecular Weight Subunits of Wheat Glutenin*. J. Cereal Sci. 15:105-120.
- Veraverbeke W. S e Delcour J. A. (2002), *Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 42:179-208.