

Eigenschaften und Antigenität der aus Brot isolierten Gluteneiweisse

Von

M. SZABOLCS, S. CSORBA und M. HAUCK

Zentrales Forschungslaboratorium, Kinderklinik und Biochemisches Institut
der Medizinischen Universität, Debrecen

(Eingegangen am 15. Oktober 1977)

Aus dem wässrigen bzw. mit 0,01 M Essigsäurelösung verfertigten Extrakt des Brotes wurden Gluteneiweiße, Gliadin und Glutenin isoliert.

Mit Na-dodecylsulfat-Akrylamid-Gelelektrophorese wurde festgestellt, daß das Molekulargewicht der aus Brot isolierten Gliadine 30 000, 55 000 bzw. 35 000, 52 000 und das der Gluteneine 100 000, 80 000 bzw. 70 000 Dalton ausmacht. Inbezug auf die Aminosäurezusammensetzung sind die Gliadin- und Gluteneinfractionen einerseits einander, andererseits den aus Mehl isolierten Fraktionen ähnlich; sowohl der Glutaminsäure- (43,9% bzw. 38,4%) als auch der Prolingehalt (17,6% bzw. 16,5%) der Gliadin- und Gluteneinfractionen ist hoch. Das Absorptionsmaximum der aus Brot mit Essigsäureextraktion isolierten Gliadinfraktion liegt bei 275 nm, während sich das Absorptionsspektrum der Gluteneinfraction von dem des Gliadins in bedeutendem Maße unterscheidet. Die isolierten Gluteneiweiße reagieren mit dem Serum der Zöliakie-Kranken als Antigene.

Es konnte festgestellt werden, daß die Gluteneiweiße gegenüber der beim Brotbacken angewandten hohen Temperatur resistent sind, indem sie zumindest inbezug auf die untersuchten Parameter ihre ursprünglichen physikochemischen und immunochemischen Eigenschaften beibehalten.

Die Untersuchung der Gluteneiweiße des Weizens ist nicht nur in der Lebensmittelindustrie bzw. der Ernährungswissenschaft, sondern auch vom Standpunkt der theoretischen und klinischen Immunologie eine im Vordergrund des Interesses stehende Frage geworden, besonders seitdem DICKE [5] auf ihre Rolle im Zusammenhang mit dem Zöliakie-Syndrom bzw. SINGH und KAY [12] mit der Schizophrenie hingewiesen haben. Die Gluteneiweiße — Gliadin und Glutenin — sind bekanntlich weder in Wasser noch in neutraler Salzlösung löslich, während sie sich in 50–70%-

igem Alkohol, dünner Säure oder Lauge lösen.

Wie wir darüber früher berichteten [13], reagiert die von uns »A« genannte aus dem wässrigen Extrakt des Weizenmehls auf der Sephadex G-75 Säule mit Gelfiltration isolierte Fraktion mit dem Serum der Zöliakie-Kranken antigenartig; was die Aminosäurezusammensetzung und das Molekulargewicht anbelangt, entspricht die Fraktion A im wesentlichen den Weizen-Gliadinen.

Unsere Untersuchungen richteten sich auf die Klärung der Frage, ob bzw. inwiefern durch das Brotbacken

die physikochemischen Eigenschaften und die Antigenität der Gluteneiweiße beeinflusst werden.

MATERIAL UND METHODEN

Isolierung der Gluteneiweiße aus Brot mit Methode I. 50 g zerstückeltes Brot wurde in 500 ml Wasser suspendiert und die Suspension 120 Minuten bei Zimmertemperatur gründlich durchgemischt, sodann 14–16 Stunden im Kühlschrank (2–4°C) aufbewahrt. Zwecks Entfernung der unaufgelösten Teilchen wurde die Suspension durch einen gewaschenen Wattebausch gefiltert. Zunächst wurde die reine Suspension bis zur 66–68% Äthylalkohol-Endkonzentration mit 96%igem Alkohol versetzt und 1–2 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Es folgte die Entfernung des Stärkepräzipitats mittels Filtration. Zunächst wurde das Gluteneiweiß enthaltende Filtrat bei 38°C unter Vakuum mit Hilfe von Rotadest auf 10–12 ml einkonzentriert, während auch das Alkohol größtenteils verdampfte. Die Eiweißlösung (10–12 ml) wurde mit 3–4 ml 70%igem Alkohol versetzt und das pH mit 0,1 M Essigsäure auf 4 eingestellt. (Diese Manipulation hatte zur Folge, daß ein großer Teil des sich auf die Wand des Rotadest-Kolbens ausgefällten Eiweißes ebenfalls in die Lösung überging.) Die eiweißhaltige Alkohollösung wurde hier nach gegenüber 1,5–2 l demineralisiertes Wasser dialysiert und das während der Dialyse ausgefällte Präzipitat mit Zentrifugieren (3000 g, 25°C, 15 Minuten) entfernt. Des weiteren wurde der Supernatans angewandt. Aus 50 g Brot können etwa 70–90 mg Eiweiß isoliert werden.

Isolierung der Gluteneiweiße aus Brot mit Methode II. Das Verfahren ist eine Modifikation der von BECKWITH und Mitarb. [3] beschriebenen Methode. 100 g zerstückeltes Brot wurden in 1000 ml 0,01 M Essigsäure 120–180 Minuten kräftig umgerührt, sodann für 14–16 Stunden in den Kühlschrank (2–4°C)

gestellt. Demnach wurde die Suspension durch vierschichtigen Gaze gefiltert und das Filtrat in einer Kühlzentrifuge (MSE 25 Super-Speed) bei 4°C 120 Minuten mit 25 000 g zentrifugiert. Das Präzipitat (größtenteils Stärke) wurde verworfen, und aus dem reinen Supernatans wurden die Gluteneiweiße bei einer 0,2 M NaCl Endkonzentration ausgefällt. Das Präzipitat wurde in 0,01 M Essigsäurelösung gelöst, mit 96%igem Äthylalkohol bis zu einer Endkonzentration von 66–68% versetzt und das pH mit N KOH-Lösung auf 6,5–6,8 eingestellt. Nachdem das Gemisch eine Nacht in kaltem Zimmer stand, präzipitierte sich das Glutenin, während das Gliadin in aufgelöstem Zustand blieb. Nach erneutem Zentrifugieren (2000 g, 4°C, 45 Minuten) und Zurücklösen des Gluteninpräzipitats in 0,01 M Essigsäure und Dialyse gegenüber 0,01 M Essigsäurelösung stand uns das isolierte Glutenin zur Verfügung.

Zunächst wurde der Alkoholgehalt des Gliadin enthaltenden Supernatans mittels Zugabe von kaltem, ionfreiem Wasser auf 35–37% herabgesetzt, die Lösung einige Stunden auf 0°C abgekühlt (bei einer um 2–3°C höheren Temperatur klärt sich die Suspension auf), in der BECKMANSchen präparativen Ultrazentrifuge mit 100 000 g 50 Minuten zentrifugiert, das ausgefällte Gliadin in 0,01 M Essigsäure gelöst und gegenüber 0,01 M Essigsäure dialysiert. Mit der Methode können aus 100 g Brot 80–90 mg Gliadin und 50–60 mg Glutenin isoliert werden.

Polyakrylamid-Gelelektrophorese

Die Homogenität der aus dem Brot isolierten Eiweiße wurde unter Anwendung einer 7%igen Polyakrylamid-Gelkonzentration + Tris-Glycinpuffers (pH 8,3, Ionstärke 0,05) kontrolliert.

Natrium dodecylsulfat-Polyakrylamid-Gelelektrophorese (pH = 7)

Diese Methode [13] diente zur Untersuchung des Molekulargewichts bzw. der

molekulargewichtgerechten Homogenität der Polypeptidketten der aus dem Brot isolierten Eiweiße.

Die Analyse des Absorptionsspektrums der Eiweiße erfolgte mit Hilfe des Spektrophotometers Opton PM 2 DL. Der Eiweißgehalt wurde mit dem Biuretverfahren bestimmt.

Aminosäureanalyse

Zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Glutenin und Gliadin diente unsere vorangehend beschriebene Methode [13].

Agardiffusion

Das Antigen (Gliadin, Glutenin) wurde mit NaCl-Lösung auf 0,6–0,7 mg Eiweiß/ml Konzentration verdünnt und zwar so, daß die NaCl-Endkonzentration 0,9% ausmache (die unter Wirkung der NaCl-Lösung entstandene Trübung der Antigenlösung läßt stufenweise nach). Nach einigen Stunden wurde diese Antigenlösung mit auf 50–55 °C aufgewärmte 3%ige wäßrige Agarlösung vermischt (hiernach betrug die Eiweißkonzentration der Lösung 0,3–0,35 mg/ml, die NaCl-Konzentration 0,45% und die Agarkonzentration 1,5%) und je 2,2 ml wurden auf Objektträger pipettiert. Am darauffolgenden Tag wurden in das Agar Löcher mit einem Durchmesser von 4 mm gebohrt und in diese Löcher die aus den Seren verschiedener Individuen — Normalpersonen, Zöliakiekranken usw. — gefertigte unterschiedliche — 1 : 4, 1 : 8, 1 : 12, 1 : 16, 1 : 32 — Verdünnungen gemessen (in diesen verdünnten Seren betrug die Endkonzentration des Kochsalzes ebenfalls 0,45%). Nach 24 Stunden wurde diese Manipulation wiederholt. In der Zwischenzeit haben wir die Objektträger in der Feuchtkammer, bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Am Ende der 48stündigen Inkubationszeit wurden die sich an der Bildung des Immunpräzipitats nicht beteiligenden Eiweiße aus dem Agar mit 0,45%iger Kochsalzlösung ausgewaschen,

die Objektträger getrocknet, mit Säurefuchsin gefärbt, differenziert, usw.

ERGEBNISSE

Im ersten Teil der Versuche wurden die mit der Methode I aus Brot isolierten Eiweiße auf Sephadex G-75-Säule fraktioniert (Abb. 1). Im oberen Teil der Abbildung 1 sieht man das Elutionsdiagramm (M), der mit der in unserer vorangehenden Mitteilung [13] beschriebenen Methode aus Mehl extrahierten Eiweiße, während im unteren Teil das Elutionsdiagramm der aus Brot (B) mit der Isolierungsmethode I extrahierten Eiweiße, dargestellt ist. Die beiden Elutionsdiagramme unterscheiden sich voneinander nur darin, daß aus den aus Brot isolierten Eiweißen den Eiweißen mit niedrigem Molekulargewicht, den einige Ketten-glieder enthaltenden Polypeptiden und Nukleotiden entsprechende Fraktion D fehlt. Unzweifelhaft ist dagegen die Anwesenheit der Fraktion A, die sich als Antigen verhält [4].

Die nach Akrylamid-Gelelektrophorese gefertigten Densitogramme der aus Mehl und Brot extrahierten Eiweiße unterstützen die bei der Gel-filtration ermittelten Ergebnisse (Abb. 2). Im Gegensatz zum Densitogramm M findet man auf dem Densitogramm B keine in Richtung der Anode wandernde Komponenten mit niedrigem Molekulargewicht, während die für die Antigenität verantwortlichen Komponenten auf den Polyakrylamid-Gelen in Kathodenähe dort erscheinen, wie bei den kontrollhalber aus Mehl extrahierten Eiweißen.

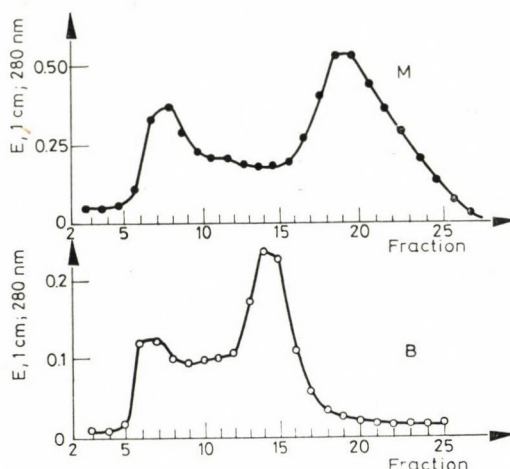


ABB. 1. Elutionsdiagramm der aus Mehl (M) und aus Brot (B) mit Wasser extrahierten Eiweiße bei Gelfiltration auf Sephadex G-75-Säule. Die Elution erfolgte mit NaN_3 -haltigem (0,005%) demineralisiertem Wasser. Parameter der Gelsäule: Durchschnitt 1,6 cm, Höhe: 30 cm, Volumen: 60,5 cm^3 . Elutionsgeschwindigkeit: 20 ml/St, Volumen der eluierten Fraktionen: je 2,5 ml

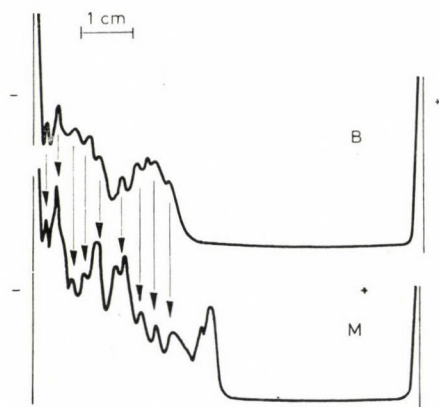


ABB. 2. Polyakrylamid-Gelelektrophorese und nach der Färbung gefertigte Densitogramme der mit Wasser aus Mehl (M) und aus Brot (B) extrahierten Eiweiße. (Weitere Angaben s. [4])

In der Folge haben wir das Molekulargewicht der aus Brot extrahierten mit dem Serum der Zöliakiekranken antigenartig reagierenden Fraktion A mittels Na-dodecylsulfat-Polyakrylamidgel-Elektrophorese bestimmt. Auf den Densitogrammen der aus Mehl (M) bzw. Brot (B) isolierten

Fraktionen A waren Komponenten mit fast übereinstimmenden Molekulargewichten — 50 000—56 000 bzw. 30 000—35 000 Dalton — ersichtlich (Abb. 3).

Mit der Isolierungsmethode II haben wir aus dem mit 0,01 M Essigsäure verfertigten Brotextrakt mit

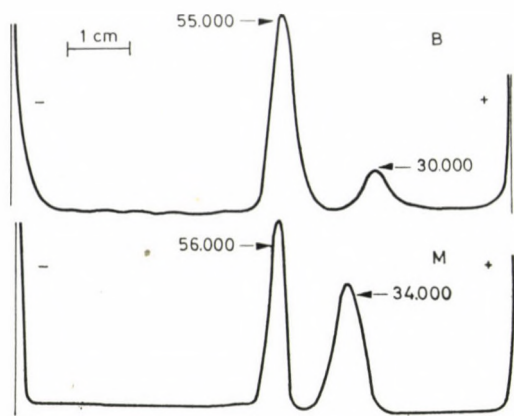


ABB. 3. Densitogramme der aus dem wässrigen Extrakt des Mehls (M) bzw. des Brotes (B) mittels wiederholter Gelfiltration isolierten Fraktionen A, nach mit Natrium-dodecylsulfat-Polyakrylamid-Gelelektrophorese (pH 7,0) und Färbung. (Weitere Angaben s. [13])

der weiteren Fraktionierung der bei einer Kochsalzkonzentration von 0,2 M präzipitierbaren Gluteneiweiße, unter gut definierbaren Verhältnissen Glutenin- und Gliadin-Fractionen abge sondert und die Eigenschaften bzw. die Antigenität dieser Fractionen untersucht.

Das mit 0,01 M Essigsäure hergestellte Brotextrakt (Abb. 4, 1) enthält weniger ein niedrigeres Molekulargewicht aufweisende, in Richtung der Anode wandernde Eiweißkomponenten als das wässrige Extrakt (Abb. 2, B). Dies ist aus dem Vergleich der Densitogramme 1 bzw. B der Abbildungen 4 bzw. 2 deutlich zu entnehmen. Auf dem nach Elektrophorese der aus dem Essigsäureextrakt bei 0,2 M Kochsalzkonzentration abgetrennten Gluteneiweiße verfertigten Densitogramm findet man bereits keine anodwärts wandernden Komponenten mit niedrigerem Molekulargewicht (Abb. 4 »2«). Diese Tatsache spricht dafür, daß diese

Eiweiße bei einer Kochsalzkonzentration von 0,2 M bereits nicht ausgefällt werden. Das Densitogramm der isolierten Gliadinfraktion (Abb. 4, Densitogramm 4) ist dem der Glutenfraktion (Abb. 4, Densitogramm 2) ähnlich. Da die Gluteninfraktion bei der Akrylamid-Gelelektrophorese nicht wandert, oder wahrscheinlich wegen ihres hohen Molekulargewichts nicht in das Gel gelangt, sind auf dem Densitogramm (Abb. 4, Densitogramm 3) keine Eiweißkomponenten ersichtlich. Aus diesem letzterwähnten Umstand kann auch darauf gefolgert werden, daß anlässlich der Elektrophorese des Extrakts bzw. der Eiweiße der Glutenfraktion (Gelkonzentration 7%, pH = 8,3, Elektrodenpuffer) auf den Densitogrammen weder die Gluteninfraktion, noch ihre Komponenten in Erscheinung treten. Diese Feststellung stimmt mit den Literaturangaben überein, laut deren das Glutenin nicht einmal bei der Stärke-Gelelektrophorese wandert [1, 15]. Nach NILSEN

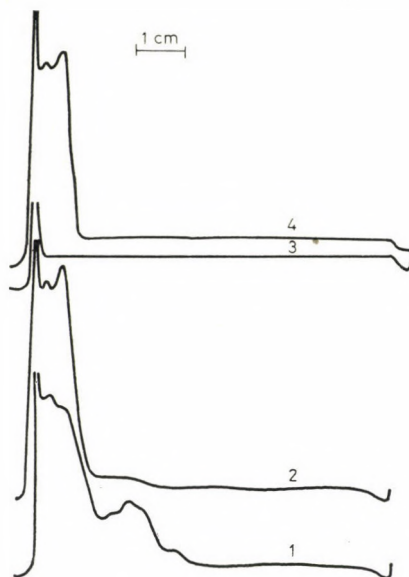


ABB. 4. Densitogramme der aus dem Essigsäureextrakt des Brots mit der Methode II isolierten Eiweiße nach Polyakrylamid-Gelelektrophorese und Färbung. 1. Essigsäureextrakt; 2. Glutenfraktion; 3. Gluteninfraktion; 4. Gliadinfraktion

und Mitarb. [10] schwankt nämlich das Molekulargewicht des Glutenins zwischen einigen 10 000 und 1 Million. Dieses hohe Molekulargewicht ist nicht auf die physikalische Aggregation zurückzuführen, es ist vielmehr die Folge der durch die zwischen den SH-Gruppen der Zysteine entstehende Kreuzbindung — Disulfidbindung — bedingten Entwicklung der Polymerstruktur [14].

Anlässlich der zwecks Bestimmung des Molekulargewichts durchgeführten Na-dodecylsulfat-Akrylamid-Gelelektrophorese wurden die in den Gluteneiweißen befindlichen Disulfidbrücken in der Anwesenheit von Na-dodecylsulfat mit Merkaptoethanol reduziert; im Laufe dieser Manipulation zerfiel das Polymermolekül in Polypeptidketten. In der Gluten-

fraktion können mit abnehmendem Molekulargewicht, in zunehmender Menge Polypeptidketten — mit einem Molekulargewicht von 100 000, 80 000, 52 000 und 36 000 Dalton — beobachtet werden (Abb. 5, Fraktion 1). Die Gluteninfraktion enthält die Eiweißkomponenten mit höherem Molekulargewicht (Abb. 5, Fraktion 2) und die Gliadinfraktion diejenigen mit niedrigerem Molekulargewicht (Abb. 5, Fraktion 3). Diese Angaben sprechen ebenfalls dafür, daß das Glutenin — trotz der Reduktion der Disulfidbrücken — ein Eiweiß mit verhältnismäßig hohem Molekulargewicht ist, und demzufolge ohne Reduktion und Denaturierung im Polyakrylamid- bzw. Stärkegel nicht wandert.

Das Absorptionsspektrum von Gliadin und Glutenin wurde im 0,01 M

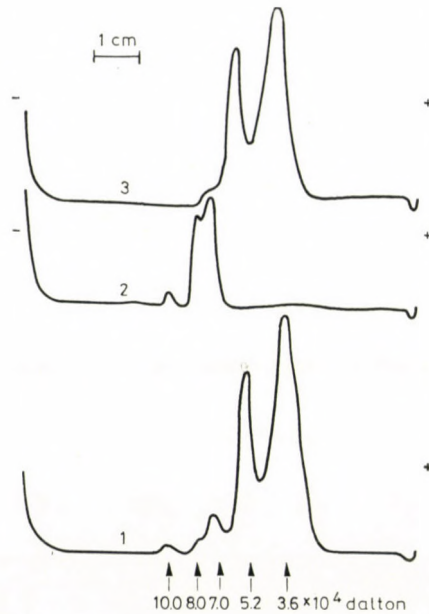


ABB. 5. Densitogramme der aus dem Essigsäureextrakt des Brots mit der Methode II isolierten Fraktionen: 1. Gluten, 2. Glutenin, 3. Gliadin, nach Natrium-dodecylsulfat-Polyakrylamid-Gelelektrophorese (pH 7) und Färbung

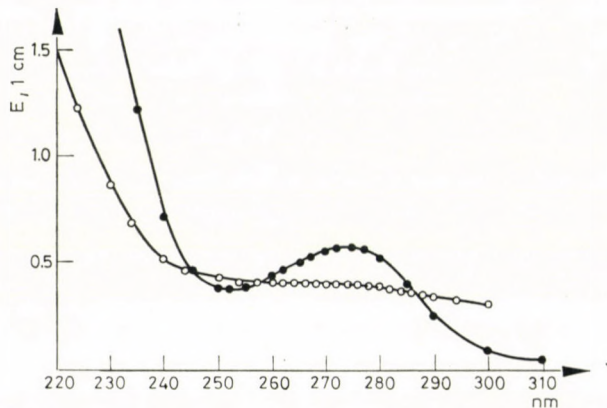


ABB. 6. Absorptionsspektrum von aus dem Essigsäureextrakt des Brots isolierten Gliadins und Glutenins. ●-● 0,79 mg/ml Gliadin; ○-○ 0,76 mg/ml Glutenin

Essigsäure enthaltenden Medium untersucht. Das Absorptionsmaximum von Gliadin liegt bei 275 nm (Abb. 6). In den in verschiedenen Jahreszeiten, vom September bis Juni gefertigten

Präparaten schwankt der Wert von $E_{280}^{1\%}$ zwischen 6,5 und 8,05. Für die aus in essigsäure- und ureahaltigem Lösungsmittel gelöstem Mehl präparierte Gliadinfraktion haben MERE-

TABELLE I
Aminosäurezusammensetzung von Glutenin und Gliadin

Aminosäure	Glutenin		Gliadin		Aminosäure	Glutenin		Gliadin	
	L ⁺	S	S	L ⁺⁺		L ⁺	S	S	L ⁺⁺
Mol %					Mol %				
Lys	1,15	0,90	1,40	1,50	Gly	9,10	4,77	2,20	3,00
His	1,50	1,35	1,48	1,70	Ala	3,30	1,80	2,00	3,40
Arg	3,20	1,44	1,81	1,80	Val	4,00	2,98	2,52	4,80
Cys			1,34						
Asp	2,00	1,98	1,60	2,90	Met	1,30	2,25	0,55	1,10
Thr	2,70	1,89	1,60	2,10	Ile	3,30	3,61	3,40	4,20
Ser	5,40	4,86	5,53	5,40	Leu	6,15	6,05	5,80	7,70
Glu	36,40	38,41	43,90	37,50	Tyr	2,40	2,70	2,10	2,70
Pro	14,30	16,50	17,60	15,00	Phe	3,80	8,44	5,10	4,20

L⁺ : Gluteninwerte aus der Mitteilung von WU und DIMLER [16]

S : Aminosäurezusammensetzung von Brot-Glutenin und -Gliadin (eigene Isolierungsangaben)

L⁺⁺ : Aufgrund der Aminosäurezusammensetzung der III. Fraktion (Gliadin) berechnete Werte (BECKWITH und Mitarb. [3])

DITH und WREN [9] ähnliche Werte gefunden. Das Absorptionsspektrum von Glutenin unterscheidet sich in bedeutendem Maße von dem des Gliadins bzw. von dem der Eiweiße im allgemeinen (Abb. 6). Die Absorption, die sich zwischen 230–260 nm verringert, bleibt bis 260–280 nm praktisch unverändert. Hierzu sei erwähnt, daß während das Gliadin in einem 0,01 M essigsäurehaltigen Medium bei der zur Aufnahme des Absorptionsspektrums angewandten Eiweißkonzentration von 0,8 mg/ml eine vollkommen reine Lösung ergab, die Gluteninlösung bei derselben Eiweißkonzentration mit identischem Essigsäuregehalt keineswegs als rein bezeichnet werden konnte.

Im Interesse der weiteren Charakterisierung der mit der Isolierungs-

methode II aus Brot hergestellten Gliadin- und Gluteninpräparate haben wir auch ihre Aminosäurezusammensetzung bestimmt (Tab. I). Wie aus Tabelle I ersichtlich, sind die aus Brot isolierten Glutenin- und Gliadinfraktionen der von BECKWITH und Mitarb. [3] aus Mehl isolierten Gliadinfraktion (Fraktion III) sehr ähnlich. Alle drei Fraktionen verfügen über einen hohen Glutaminsäure- (38–44%) und Prolingehalt (16,5–17,6%). Im Laufe der Aminosäureanalyse wurde auch der Ammoniakgehalt der Präparate bestimmt und aus diesem Wert auf das proportionale Verhältnis von Glutamin + Asparagin (Amidierungsgrad) gefolgert. Die im Laufe der Aminosäureanalyse der Gliadinpräparate bestimmte Glutaminsäure + Asparaginsäure – die

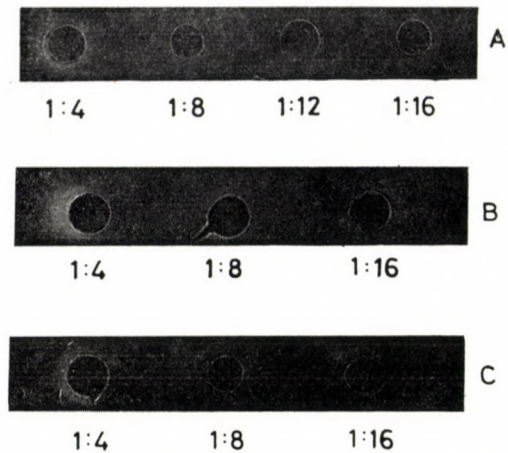


ABB. 7. Immunreaktionen des aus Essigsäureextrakt des Brots mit Methode II isolierten Glutenins und Gliadins mit den aus Zöliakiekranken (A, B) und Normalpersonen (C) stammenden Seren. Antigen im Agar A: Glutenin, B: Gliadin, C: Gliadin

45,5% des gesamten Aminosäuregehalts ausmacht — besteht zu 53–60% aus Glutamin + Asparagin. Was die Gluteninpräparate anbelangt, ließ sich feststellen, daß 80–90% der Glutaminsäure + Asparaginsäure aus Glutamin-Asparagin besteht. Unter der Teilnahme der im Glutamin und Asparagin befindlichen Amidgruppen können sich Wasserstoffbindungen entwickeln, welche unter Berücksichtigung der in den Gluteneiweißen anwesenden verhältnismäßig großen Zahl der Amidgruppen — nebst anderen Verbindungen (Ion-, Hydrophobbindung, usw.) — auch in der Bestimmung der Eiweißstruktur eine wichtige Rolle spielen.

Die Immunreaktion von Glutenin und Gliadin — dessen Aminosäurezusammensetzung aus Tabelle I ersichtlich ist — mit dem Serum von Zöliakiekranken veranschaulicht Abbildung 7 (Abb. 7 A, B). Die erwähnten Gluteneiweiße ergeben als Antigene

selbst in Serumverdünnungen von 1 : 12 bzw. 1 : 16 positive Immunreaktionen. Gleichzeitig reagiert das Kontroll-Normalserum nur in einer Verdünnung von 1 : 4 (Abb. 7, C) — manchmal 1 : 8 — aber im Vergleich zum Zöliakieserum mit identischer Verdünnung nur mit halber Intensität.

BESPRECHUNG

Durch den Prozeß des Brotbackens werden die Eigenschaften der im Mehl befindlichen Eiweiße — die sich voneinander in mancher Beziehung unterscheiden (z. B. — Wasser- und Salzlöslichkeit) — von ihrer Empfindlichkeit abhängig auf unterschiedliche Weise beeinflusst. In der Technologie der Brotherstellung ist das Backen der wichtigste Prozeß. Während der 60–90minütigen Backdauer beträgt, bei einer Ofentemperatur von rund 200°C die Temperatur im Brotinne-

ren 100°C. Ein großer Teil der Eiweiße wird aber bekanntlich im Laufe einer kurzen Wärmebehandlung mit nur 40–50°C denaturiert [8]. Laut unserer Versuchsdaten sind die Gluteneiweiße resistent gegenüber der Wärmedenaturation. Was Mobilität, Verhalten bei der Elektrophorese (Abb. 2, 4) Molekulargewicht (Abb. 3, 5) und Aminosäurezusammensetzung (Tab. I) anbelangt, besteht zwischen den aus Brot hergestellten Gluteneiweißen und den aus Mehl isolierten Gluteneiweißen kein bzw. ein nur minimaler Unterschied. Nach den Literaturangaben zeigen die Gliadine der Samen der Grasarten — deren Molekulargewicht zwischen 35 000–60 000 Dalton liegt — eine ähnliche Aminosäurezusammensetzung [1, 2, 6, 11]. Mit der Isolierungsmethode I können in erster Linie Eiweiße mit einem Molekulargewicht von 35 000–60 000 Dalton — d. h. Gliadine — isoliert werden (Abb. 3), während die mit der Methode II isolierten Fraktionen in bezug auf das Molekulargewicht sowohl den Gliadinen, als auch den Gluteninen ähnlich sind. Dieser Umstand ermöglichte, daß wir nebst den physikochemischen Eigenschaften des Gliadins auch die des Glutenins untersuchen. Wie darauf WU und DIMLER [16] hingewiesen haben, sind das aus Mehl isolierte Gliadin und Glutenin hinsichtlich ihrer Aminosäurezusammensetzung einander ähnlich. Wie aus Tabelle I ersichtlich, bezieht sich diese Feststellung auch auf die von aus Brot isolierten Gliadin- und Gluteninfraktionen. Die Unterschiede manifestieren sich vor allem in dem

Molekulargewicht der Polypeptidketten (Abb. 5, 2, 3) und dem Absorptionsspektrum der Fraktionen (Abb. 6). Aus Abbildung 7 geht hervor, daß die aus Brot isolierten Gliadin- und Gluteninfraktionen mit den von Zöliakiekranken stammenden 1:12 bzw. 1:16 verdünnten Seren als Antigene reagieren, während mit den von Normalpersonen stammenden Seren nur in Verdünnungen von 1:4 — bzw. selten 1:8 — positive Immunreaktionen ergeben [in mehreren Fällen gaben auch die im Verhältnis 1:12, 1:16 verdünnten, von verschiedenen Kranken (Myelom, Schizophrenie, Schilddrüsentumor) stammende Seren positive Reaktionen mit den Gluteneiweißen; diese positiven Reaktionen waren aber nicht unbedingt konsequent. Unseres Erachtens könnte die Frage, ob es sich in diesen Fällen um echte bzw. konsequente Reaktionen handelt, durch eine serienweise Untersuchung der Seren der an den erwähnten Krankheiten leidenden Patienten geklärt werden].

Die angeführten Versuchsergebnisse liefern einen Beweis dafür, daß die mit Pepsin und Trypsin nicht oder nur in geringem Maße hydrolysierbaren [7] Gluteneiweiße auch gegenüber der beim Brotbacken dauerhaft angewandten hohen Temperatur resistent sind, indem sie ihre ursprünglichen physiko- und immunochemischen Eigenschaften sowie ihre nährungsphysiologische Bedeutung beibehalten.

*

Unser herzlicher Dank gebührt Frau E. KOROM und Frl. M. DEBRECZENI für ihre technische Hilfe.

LITERATUR

1. ALTSCHUL, A. M., YATSU, L. Y., ORY, R. L., ENGELMAN, M.: Seed proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **17**, 113 (1966).
2. BECKWITH, A. C., WALL, J. S., DIMLER, R. J.: Amide groups as interaction sites in wheat gluten proteins: Effects of amide-ester conversion. *Arch. Biochem.* **103**, 319 (1963).
3. BECKWITH, A. C., NIELSEN, H. C., WALL, J. S., HUEBNER, F. R.: Isolation and characterization of a high molecular weight protein from wheat gliadin. *Cereal Chem.* **43**, 14 (1966).
4. CSORBA, S., SZABOLCS, M., KÁVAI, M., JEZERNICZKY, J., SZABÓ, B.: Über die Antigenität des Gliadins und die Antikörper gegen Gliadin. *Acta paediat. Acad. Sci. hung.* **16**, 249 (1975).
5. DICKE, W. K.: Coeliakie. Dissertation, Utrecht 1950.
6. EWART, J. A. D.: Sodium dodecyl sulphate electrophoresis of wheat gliadins. *J. Sci. Fd Agric.* **24**, 685 (1973).
7. FRAZER, A. C.: The present state of knowledge on the celiac syndrome. *J. Pediat.* **57**, 262 (1960).
8. LEHNINGER, A. L.: Biochemistry. Worth Publishers Inc. New York 1970, p. 134.
9. MEREDITH, O. B., WREN, J. J.: Determination of molecular weight distribution in wheat flour proteins by extraction and gel filtration in dissociating medium. *Cereal Chem.* **43**, 169 (1966).
10. NIELSON, H. C., BABCOCK, G. E., SENTI, F. R.: Molecular weight studies on glutenin before and after disulfide-bond splitting. *Arch. Biochem.* **96**, 252 (1962).
11. SEXSON, K. R., WU, Y. V.: Molecular weights of wheat gamma₁ and gamma₂ gliadins in various solvents. *Biochim. biophys. Acta. (Amst.)* **263**, 651 (1972).
12. SINGH, M. M., KAY, S. R.: Wheat gluten as a pathogenic factor in schizophrenia. *Science* **191**, 401 (1976).
13. SZABOLCS, M., CSORBA, S., KÁVAI, M., FRANCIA, I., SZABÓ, B.: Eigenschaften des Gliadins und der Antikörper gegen Gliadin bei Zöliakie. *Acta paediat. Acad. Sci. hung.* **18**, 155 (1977).
14. TAYLOR, N. W., CLUSKEY, J. E.: Wheat gluten and its glutenin component: Viscosity, diffusion and sedimentation studies. *Arch. Biochem.* **97**, 399 (1962).
15. WOYCHIK, J. H., BOUNDY, J. A., DIMLER, R. J.: Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Arch. Biochem.* **94**, 477 (1961).
16. WU, Y. V., DIMLER, R. J.: Hydrogen ion equilibria of wheat glutenin and gliadin. *Arch. Biochem.* **103**, 310 (1963).

Dr. M. SZABOLCS
 Zentrallaboratorium
 H-4012 Debrecen
 Pf. 3. Ungarn