

## Analiza proteina pšenice kapilarnom gel elektroforezom (CGE)

Danica Savanović<sup>1\*</sup>, Radoslav Grujić<sup>2</sup>, Aleksandra Torbica<sup>3</sup>, Jovo Savanović<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Univerzitet u Banjoj Luci, Tehnološki fakultet Banja Luka, Republika Srpska, BiH

<sup>2</sup>Univerzitet u Istočnom Sarajevu, Tehnološki fakultet Zvornik, Republika Srpska, BiH

<sup>3</sup>Univerzitet u Novom Sadu, Institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad, Srbija

<sup>4</sup>MI "DIM-DIM" d.o.o., Laktaši, Republika Srpska, BiH

ISSN 2232-755X

UDK: 633.11:547.96

DOI: 10.7251/GHTE18140235

Originalni naučni rad

Rad primljen: 27.11.2018.

Rad prihvaćen: 12.12.2018.

Rad dostupan od 31.12.2018.

na <https://glasnik.tf.unibl.org/>

### Ključne riječi:

analiza,

proteini pšenice,

kapilarna gel elektroforeza.

Proteini pšenice se smatraju najvažnijim komponentama koje utiču na pecivna svojstva brašna. Karakterišu se visokom heterogenošću i velikim rasponom molekulskih masa. Za razdvajanje i identifikaciju proteina mogu se koristiti različite tehnike. Cilj ovog rada je bio da se ispita mogućnosti primjene SDS-kapilarne gel elektroforeze (SDS-CGE) za analizu i kvantifikaciju proteina iz pšeničnog brašna. Razdvajanje proteina iz tijesta izrađenog od pšeničnog brašna vršeno je pomoću kapilarne elektroforeze (Agilent, CE 7100) uz korištenje SDS-MW Analysis Kit-a (Beckman Coulter). Podaci o migracionim vremenima i površinama pikova pojedinačnih proteina sa elektroforegrama su analizirani pomoću softvera ChemStation Software (Agilent Technologies, PaloAlto, CA). Na elektroforegramu, dobijenom nakon analize proteina, razdvojeno je 57 proteina različitih molekulskih masa, u rasponu od 10 kDa do 225 kDa. Najveći broj razdvojenih proteina je imao masu od 0 do 20 kDa (22 proteina), dok je broj razdvojenih proteina većih molekulskih masa bio mnogo manji (3 proteina mase od 100 do 150 kDa i 5 proteina su imali mase veće od 150 kDa). Ova metoda omogućava preciznu identifikaciju i kvantifikaciju proteina pšenice i može se koristiti za izučavanje promjena i ponašanja proteina pšenice u toku tehnoloških procesa proizvodnje.

### UVOD

Proteini žitarica imaju važnu ulogu u ishrani ljudi, zbog njihovog nutritivnog sastava i funkcionalnih svojstava. Peciva svojstva i kvalitet pšenice (*Triticum aestivum* L.) i pšeničnog brašna zavise od količine i kvaliteta proteina iz zrna pšenice. Proteini pšenice su grupa jedinjenja koja se po zastupljenosti u zrnu nalazi odmah poslije skroba. Procentualni udio proteina u zrnu pšenice se obično kreće od 8 do 15% (Shewry, 2009). Prema Osbornovoj klasifikaciji (Osborne, 1907) proteini pšenice se na osnovu rastvorljivosti dijele na četiri glavne grupe: albumini (rastvorljivi u vodi i razblaženim puferima), globulini (rastvorljivi u rastvorima soli), glijadini (rastvorljivi u 70-90% etanolu) i glutenini (rastvorljivi u razblaženim kiselinama ili bazama).

Molekulska masa pšeničnih proteina kreće se od 30 000 do više od 10 miliona Da (Wieser, 2007) i mogu se podijeliti na strukturno/metaboličke (neglutenske) i rezervne (glutenske) proteine (Shewry, 2003). Oko 15% proteina iz pšeničnog brašna je rastvorljivo u

vodi ili vodenim rastvorima soli (albumini ili globulini), dok preostalih 85% predstavlja rezervne proteine (Day, 2011), koji formiraju gluten. Proteini glutena su odgovorni što pšenično brašno proizvodi viskoelastično tijesto koje zadržava gas tokom fermentacije. Iako postoje izvjesne varijacije, gluten se obično sastoji od 52% glijadina i od 48% glutenina. Obe klase su komplikovane mješavine pojedinačnih proteina (Gianibelli et al., 2001; Guerrieri, 2004; Hallajian et al., 2009; Nawroz Abdul-Razzak Tahir, 2009; Wang et al., 2014a; Wang et al., 2014b).

Proteini pšeničnog zrna pokazuju visoku kompleksnost i različit međusobni stepen interakcije, zbog čega ih je teško okarakterisati. Za razdvajanje i identifikaciju proteina često se koristi Poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE) (Gupta & MacRitchie, 1991; Gupta & Shepherd, 1990; Khan et al., 2015; Mihálikova et al., 2016; Ssrensen et al., 1999). Ova metoda se može koristiti za određivanje nativnih i denaturisanih proteina. Kao alternativna tradicionalnoj slab-gel PAGE, razvijena je kapilarna gel elektroforeza (CGE) (Cota-Rivas & Vallejo-Cordoba, 1997; Hajba & Guttman, 2017; Zhu et al., 2012).

Elektroforeza je fizičko-hemijska metoda analize koja se koristi za razdvajanje komponenata iz smješe, a zasniva se na migraciji naelektrisanih čestica kroz rastvor pod dejstvom spoljašnjeg električnog polja. Kapilarna

\* Korespondentni autor: Danica Savanović, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, Vojvode Stepe Stepanovića 73, Banja Luka, B&H; email: danica.savanovic@tf.unibl.org

Rad je izložen na međunarodnom naučnom skupu XII Savjetovanje hemičara, tehnologa i ekologa Republike Srpske, novembar 2018.

elektroforeza (CE) obuhvata skup analitičkih postupaka različitih operativnih i separacionih karakteristika. Ovaj način razdvajanja i određivanja komponenata iz smjese koristi električno polje uspostavljeno u kapilari (Žunić, 2003). Osnovni princip tehnike jeste putovanje nabijenih čestica u rastvoru elektrolita pod djelovanjem električnog polja visokog potencijala (do 30 kV) u uskoj kapilari prema jednoj od elektroda. Djelovanjem električnog polja analiti putuju različitom brzinom zavisno od njihovog naboja i jonskog radijusa (Damić i Nigović, 2010).

Različite tehnike kapilarne elektroforeze omogućavaju korištenje praznih ili punjenih kapilara. U velikom broju slučajeva kapilare se pune sa poliakrilamidnim gelom. Ako se uzorak tretira sa puferom koji sadrži natrijumdodecilsulfat (SDS), onda je tehnika poznata kao kapilarna SDS elektroforeza (SDS-CGE). Ona ima sličnu moć razdvajanja proteina kao slab-gel-based SDS-PAGE. SDS-CGE ima niz prednosti u odnosu na tradicionalnu pločastu gel elektroforeza uključujući – detekciju unutar kapilare, velika moć razdvajanja, sposobnost tačne kvantifikacije proteina i određivanje molekulske mase i dr (Zhu et al., 2012). SDS-CGE obezbjeđuje brzo razdvajanje peptida i proteina iz kompleksnih smjesa kao što su meso, mlijeko, žitarice, kao i iz drugih prehrambenih proizvoda (Bonczar et al., 2016; Stepanova & Kasicka, 2016; Vallejo-Cordoba et al., 2010). Cilj ovog rada je bio da se ispita mogućnosti primjene SDS-kapilarne gel elektroforeze (SDS-CGE) za analizu i kvantifikaciju proteina pšenice.

## MATERIJALI I METODE

### Ekstrakcija proteina

Od namjenskog brašna T-500 pripremljen je standardni farinografski zamjes u količini od 300 g brašna (Farinograf – Brabender, Farinograph E, tip: 810130). Iz sirovog tijesta vršena je ekstrakcija ukupnih proteina. Uzorci tijesta (45 mg) su suspendovani u jednakim zapreminskim dijelovima pufera („*treatment buffer*“: 0,125 M tris-Cl pH 6,8, 4% natrijum dodecil sulfat, 20% glicerol, 10% 2-merkaptetanol) i dejonizovane vode, a zatim intenzivno homogenizovani 10 s pomoću Vortex-a (Velp, Italija). Dobijeni ekstrakt je centrifugiran 20 min na 14 000 obrtaja u minuti. Odliveni supernatant sadrži ukupne proteine.

### Kapilarna gel elektroforeza (CGE)

Razdvajanje proteina vršeno je pomoću kapilarne elektroforeze (Agilent, CE 7100) uz korištenje SDS-MW Analysis Kit-a (Beckman Coulter).

Sadržaj SDS-MW Analysis Kit-a je:

- 2 kapilare dužine 57 cm, 50 µm I.D;
- SDS-MW Gel pufer – odgovarajuće formulacije;
- SDS Sample pufer - 100 mM Tris-HCl pH 9,0 / 1% SDS;

- SDS Protein Standard (10 do 225 kDa);
- Interni standard (10 kDa);
- 0,1 N HCl;
- 0,1 N NaOH.

### Priprema SDS-MW standarda

Za pripremu SDS Mw standarda pomiješano je 10 µL MW Standarda sa 85 µL *Sample* pufera, 2 µL of internog standarda i 5 µL 2-merkaptetanola. Nakon laganog miješanja sadržaj je zagrijan 3 minuta na 100 °C (Thermo – Shaker, Biosan, TS100) i prije injektovanja ohlađen do sobne temperature.

### Priprema uzoraka proteina

Određivanje koncentracije proteina u ekstraktu vršena je metodom po Lowry-u (1951). Uzorci ekstrahovanih proteina su najprije profiltrirani kroz filtere veličine pora 0,2 µm, a zatim rastvoreni u SDS puferu do ukupne zapremine od 95 µL. Koncentracija proteina u rastvoru je bila u rasponu od 0,2 mg/mL do 2 mg/mL. Zatim je dodano 2 µL internog standarda i 5 µL 2-merkaptetanola. Sadržaj je lagano promiješan i nakon toga zagrijavan 3 minute na 100°C (Thermo – Shaker, Biosan, TS100), kako bi se obezbijedila denaturacija prisutnih proteina. Pripremljeni rastvor proteina je prije injektovanja ohlađen do sobne temperature.

### Vršenje analiza

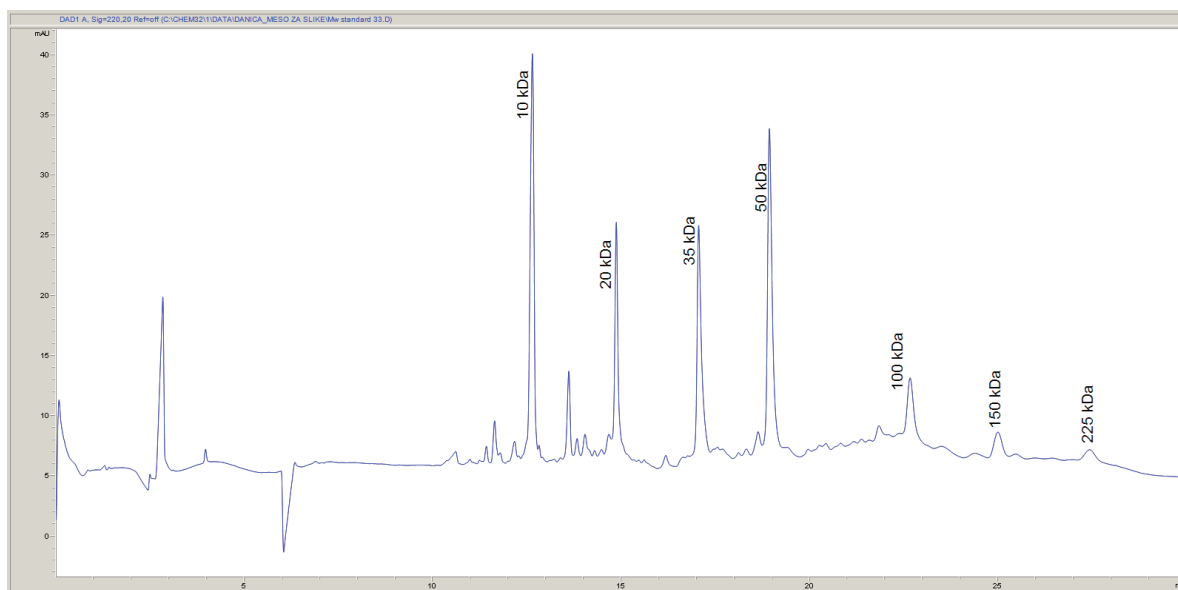
Razdvajanje proteina je vršeno u kapilari unutrašnjeg promjera 50 µm, ukupne dužine 33 cm, a efektivne dužine 23,50 cm. Za punjenje kapilare korišten je SDS gel pufer, odgovarajućeg sastava.

Jednom dnevno, kapilara je kondicionirana primjenom sljedećih postupaka:

- Ispiranje sa 0,1 N NaOH, pod pritiskom 2 bara, u trajanju od 10 minuta;
- Ispiranje sa 0,1 N HCl, pod pritiskom 2 bara, u trajanju od 5 minuta;
- Ispiranje sa ultra čistom vodom, pod pritiskom 2 bara, u trajanju od 2 minuta;
- Punjenje kapilare sa SDS-gel puferom, pod pritiskom 4 bara, 10 minuta;
- Nakon toga ulazne elektrode se kratko urone u vodu, u trajanju od 2 sekunde.

Prije svakog injektovanja, kapilara je kondicionirana primjenom sljedećih postupaka:

- Ispiranje sa 0,1 N NaOH, pod pritiskom 4 bara, u trajanju od 3 minuta;
- Ispiranje sa 0,1 N HCl, pod pritiskom 2 bara, u trajanju od 1 minuta;
- Ispiranje sa ultra čistom vodom, pod pritiskom 2 bara, u trajanju od 1 minuta;



Slika 1. Elektroforegram dobijen nakon razdvajanje proteina poznatih molekulske masa (Mw standard)  
Figure 1. Electropherogram obtained after separation of known molecular weight proteins (Mw standard)

- Punjenje kapilare sa SDS-gel puferom, pod pritiskom 4 bara, 10 minuta;
- Nakon toga ulazne elektrode se kratko urone u vodu, u trajanju od 2 sekunde.

Injektovanje je vršeno elektrokinetički primjenom napona -5 kV, 20 sekundi, i nakon toga ulazne elektrode su kratko uronjene u vodu (2s). Razdvajanje je vršeno tokom 30 minuta, primjenom napona od -16,5 kV.

Nakon završene analize kapilara je kondicionirana na sljedeći način:

- Ispiranje sa 0,1 N NaOH, pod pritiskom 4 bara, u trajanju od 15 minuta;
- Ispiranje sa 0,1 N HCl, pod pritiskom 3,5 bara, u trajanju od 5 minuta;
- Ispiranje sa ultra čistom vodom, pod pritiskom 3,5 bara, u trajanju od 10 minuta;

Detekciona talasna dužina je bila 220 nm s propusnosti od 20 nm (bez referentne talasne dužine), i vrijeme odziva od 1 sekunde. Za sve reagense, korištene su staklene vijale zapremine 2 ml. Zapremina punjenja reagenasa je bila 1,20 ml, osim za vijale u koje je punjena voda zapremine 1,6 ml i 3 vijale za ostatke reagenasa (0,1 N NaOH, 0,1 N HCl/voda i SDS gel pufer) su sadržavale 0,6 ml vode. Zamjena SDS gel pufera je vršena nakon svake sekvence od 6 do 8 injektovanja.

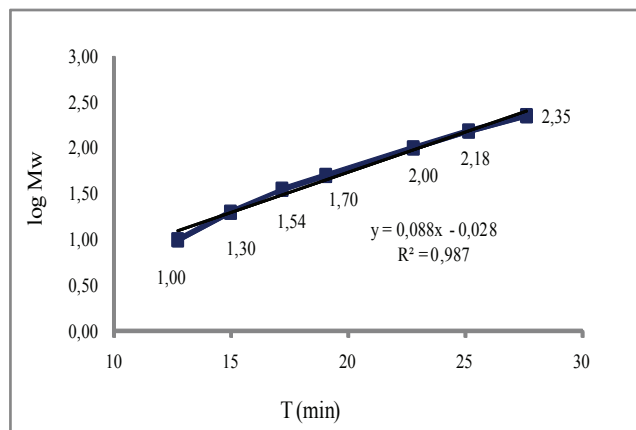
Tokom vršenja analiza proteina kapilarnom gel elektroforezom (CGE) najprije je vršeno injektovanje pripremljenog Mw standarda, a zatim pripremljenih uzoraka. Standard sadrži 7 proteina poznatih molekulske masa (10 kD, 20 kD, 35 kD, 50 kD, 100 kD, 150 kD i 225 kD). Razdvajanje proteina poznatih

Tabela 1. Migraciona vremena proteina poznatih molekulske masa (Mw standard)

Table 1. Migration times of known molecular weight proteins (Mw standard)

Mw (kDa)	log Mw	T (min)
10	1,00	12,71
20	1,30	14,95
35	1,54	17,15
50	1,70	19,04
100	2,00	22,80
150	2,18	25,15
225	2,35	27,60

molekulske masa (Mw standarda) je vršeno u toku 30 minuta. Na Slici 1. prikazan je elektroforegram standarda poznatih molekulske masa (Mw). Na osnovu migracionih vremena i poznatih molekulske masa dobijena je kalibraciona kriva koja je korištena za procjenu molekulske masa nepoznatih proteina (Tabela 1, Slika 2). Korištena tehnika je omogućila razdvajanje i identifikaciju proteina u rasponu od 10 kDa do 225 kDa. Podaci o migracionim vremenima i površinama pikova pojedinačnih proteina sa elektroforegrama su analizirani pomoću softvera (ChemStation Software, Agilent) za obradu podataka na aparatu Kapilarna elektroforeza CE 7100, Agilent.



Slika 2. Kalibraciona kriva za procjenu molekularskih masa nepoznatih proteina

Figure 2. Calibration curve for estimating the molecular weights of unknown proteins

Tabela 2. Broj ukupnih proteina dobijenih razdvajanjem pomoću CGE, iz uzoraka sirovog tijesta  
Table 2. Number of total proteins obtained by separation using CGE, from samples of raw dough

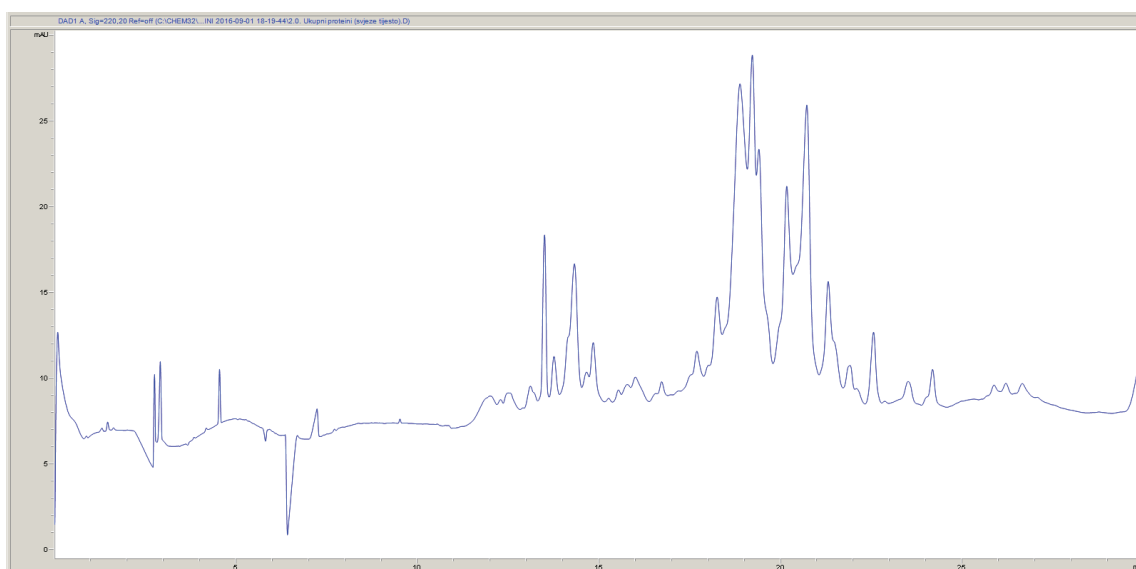
Masa proteina/ Protein weight (kDa)	Broj razdvojenih proteina/ Number of separated protein
0-20	22
20-50	17
50-100	10
100-150	3
>150	5
<i>Ukupno 57</i>	

## REZULTATI I DISKUSIJA

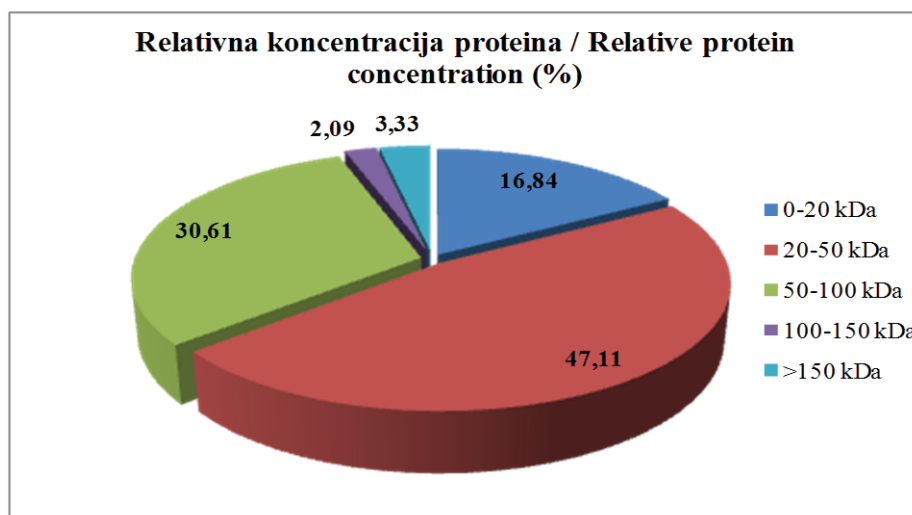
Za pripremu tijesta korišten je uzorak pšeničnog brašna. Na Slici 3. prikazan je elektroforegram dobijen nakon razdvajanja proteina iz sirovog tijesta. Za razdvajanje proteina korištena je kapilarna gel elektroforeza, pri čemu je proces razdvajanja trajao 30 min. Kvalitativna analiza proteina podrazumijeva određivanje molekularskih masa razdvojenih proteina a kvantitativna određivanje koncentracije svakog razdvojenog proteina. Broj ukupnih proteina pšenice dobijenih razdvajanjem pomoću kapilarne gel elektroforeze CGE prikazan je u Tabeli 2. Ukupan broj pikova dobijenih nakon CGE razdvajanja proteina iz pšeničnog sirovog tijesta bio je 57. Proteini pšeničnog brašna se karakterišu visokom heterogenošću i velikim rasponom molekularskih masa.

U cilju lakšeg izučavanja elektroforegrama korisno ih je podijeliti na nekoliko grupa, koje se razlikuju prema molekularskoj masi: I grupa ispod 20 kDa, II grupa 20-50 kDa, III grupa 50-100 kDa IV grupa 100-150 kDa i VI grupa preko 150 kDa. Relativna koncentracija razdvojenih proteina određena je kao odnos površine pripadajućeg pika i ukupne površine svih pikova na elektroforegramu.

U prvoj grupi izolovanih proteina (molekulska masa manje od 20 kDa) potpuno je bilo razdvojeno 22 pika (čija je ukupna relativna koncentracija bila 16,84%), u drugoj grupi (od 20 kDa do 50 kDa) bilo je razdvojeno 17 pikova (ukupna relativna koncentracija 47,11%), u trećoj grupi (od 50 kDa do 100 kDa) je bilo razdvojeno 10 pikova (ukupna relativna koncentracija 30,61%), u



Slika 3. Elektroforegram dobijen nakon elektroforetskog razdvajanja proteina pšenice iz sirovog tijesta  
Figure 3. Electropherogram obtained after electrophoretic separation of wheat protein from raw dough



Slika 4. Relativna koncentracija ukupnih proteina dobijenih razdvajanjem pomoću CGE, iz uzoraka sirovog tijesta  
Figure 4. Relative concentration of total proteins obtained by separation using CGE, from samples of raw dough

četvrtoj grupi (od 100 kDa do 150 kDa) izdvojena su 3 pika (ukupna relativna koncentracija 2,09%) i u petoj grupi (više od 150 kDa) bilo je razdvojeno 5 pikova (ukupna relativna koncentracija 3,33%) (Tabela 2, Slika 4).

Proteini se smatraju najvažnijim komponentama koje utiču na pecivna svojstva brašna. Analiza hemijskog sastava zrna pšenice, kao pokazatelja tehnološkog kvaliteta pšenice je veoma bitna kako bi se dobila potpuna slika o sortnim karakteristikama i informacija o pšenici kao sirovini za perad. Kvalitet brašna u najvećoj mjeri zavisi od tehnološkog kvaliteta pšenice kao polazne sirovine. Kvalitet brašna, kao i reološka i funkcionalna svojstva tijesta, najviše zavise od proteina pšenice, čiji značaj leži u sposobnosti glutena da formira tijesto određenih reoloških karakteristika (Weipert, 2006). Međutim, sadržaj glijadina i glutenina, njihovih subjedinica, kao i međusobnog odnosa ovih proteinskih frakcija, je od ključnog značaja za reološka svojstva tijesta i svojstva gotovog proizvoda. Sadržaj i svojstva proteinskih frakcija su sortna karakteristika, ali u velikoj mjeri zavise od faktora spoljne sredine koja svojim dejstvom utiče na sadržaj proteinskih podjedinica i proteinskih grupa, udio i strukturu polimernih proteina, sadržaj specifičnih proteina, polimerizaciju, ali i proteolizu (DuPont & Altenbach, 2003). Većina albumina i globulina pšenice su monomerni proteini čija je molekulska masa uglavnom manja od 30 kDa, iako neki albumini imaju molekulska masa od oko 60 kDa (Shomer et al., 1995).

Glijadini su monomerni proteini, molekulske mase od 30 do 75 kDa. Za glijadine je poznato da imaju ekstenzivan genetski polimorfizam i zbog toga se koriste za identifikaciju sorti pšenice (Guerrieri, 2004). Glijadini utiču na viskoznost i rastegljivost glutena. Jedinstvena svojstva glutena pšenice su posljedica formiranja glutenskog kompleksa između glutenina i glijadina (Guerrieri, 2004).

Glutenini su polimerni proteini povezani disulfidnim vezama i spadaju među najveće proteine koji se mogu naći u prirodi (Gianibelli et al., 2001). Glutenini su daleko veći nego gliadini. Imaju više lanaca i sastoje se od mnogih podjedinica. Na osnovu elektroforetske pokretljivosti gluteninske podjedinice se dijele na gluteninske podjedinice velikih molekulskih masa (HMW-GS) i gluteninske podjedinice malih molekulskih masa (LMW-GS). Veličine gluteninskih podjedinica velikih molekulskih masa, određene SDS-PAGE-om (*Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), kreću se u rasponu vrijednosti od 80 do 120 kDa, a veličine gluteninskih podjedinica malih molekulskih masa kreću se u rasponu vrijednosti od 30 do 50 kDa (Gianibelli et al., 2001).

Primjenom kapilarne gel elektroforeze u ovom radu, izvršeno je razdvajanje proteina molekulskih masa u rasponu od 10 kDa do 225 kDa. Na osnovu dobijenih podataka može se konstatovati da je najveći broj razdvojenih proteina imao masu od 0 do 20 kDa (22 proteina), dok je broj razdvojenih proteina većih molekulskih masa bio mnogo manji (3 proteina mase od 100 do 150 kDa i 5 proteina su imali mase veće od 150 kDa) (Tabela 2). Osim toga, ustanovljeno je da su proteini molekulskih masa od 20 do 50 kDa činili nešto manje od polovine ukupnih razdvojenih proteina pšenice (47,11%), dok su u sirovom pšeničnom tijestu najmanje bili zastupljeni proteini većih molekulskih masa (2,09% proteina sa molekulskim masama od 100 do 150 kDa i 3,33% proteina su imali molekulske mase veće od 150 kDa) (Slika 4).

## ZAKLJUČAK

Elektroforetsko razdvajanje proteina pomoću kapilarne gel elektroforeze (CGE) je jednostavno, brzo i efikasno.



Ova metoda omogućava veoma preciznu identifikaciju i kvantifikaciju važnih proteina. Nakon razdvajanja proteina u kapilari i određivanja migracionog vremena, korištenjem odgovarajućeg softvera, CGE omogućava računanje molekulskih masa i relativne koncentracije proteina pšenice, iz sirovog tijesta.

Analizom proteina iz pšeničnog sirovog tijesta, pomoću kapilarne gel elektroforeze, razdvojeno je 57 proteina različitih molekulskih masa, u rasponu od 10 kDa do 225 kDa. Od ukupne koncentracije razdvojenih proteina, proteini molekulskih masa od 20 do 50 kDa su imali najveću koncentraciju u iznosu od 47,11%.

## LITERATURA

- Bonczar, G., Walczycka, M., & Duda, I. (2016). The changes of proteins fractions shares in milk and fermented milk drinks. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 15(4), 379–389. DOI: 10.17306/J.AFS.2016.4.36.
- Cota-Rivas, M., & Vallejo-Cordoba, B. (1997). Capillary electrophoresis for meat species differentiation. *Journal of Capillary Electrophoresis*, 4, 4, 195–199.
- Damić, M., & Nigović, B. 2010. Kapilarna elektroforeza u farmaciji, *Farmaceutski glasnik* 66, 4, 195–207.
- Day, L. (2011). Wheat gluten: production, properties and applicatio, In: G. O. Phillips, P. A. Williams (Eds.), *Proteins: structure and function* (pp 267-288.). Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.
- DuPont, F. M. & Altenbach, S. B. (2003). Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *Journal of Cereal Science*, 38, 133-146. DOI: 10.1016/S0733-5210(03)00030-4.
- Gianibelli, M.C., Larroque, O.R., MacRitchie, F., & Wriegly, C.W. (2001). Biochemical, Genetic, and Molecular Characterisation of Wheat Endosperm Proteins. Online review, American Association of Cereal Chemists, 1-20. DOI: 10.1094/CHEM.2001.78.6.635.
- Guerrieri, N. (2004). Cereal proteins. In: R. Y. Yada (Ed.), *Proteins in food processing* (pp. 176-196). Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.
- Gupta, R.B., & MacRitchie, F. (1991). A rapid one-step one-dimensional SDS-PAGE procedure for analysis of subunit composition of glutenin in wheat. *Journal of Cereal Science*, 14, 105-109. DOI: 10.1016/S0733-5210(09)80130-6.
- Gupta, R. B., & Shepherd, K. W. (1990). Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutenin. 1. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid wheats. *Theoretical and Applied Genetics*, 80, 65–74. DOI: 10.1007/BF00224017.
- Hajba, L., & Guttman, A. 2017. Recent advances in column coatings for capillary electrophoresis of proteins, *Trends in Analytical Chemistry*, 90, 38-44. DOI: 10.1016/j.trac.2017.02.013.
- Hallajian, M. T., Varasteh Mirshamsi, M., Naserian Khiabani, B., Majdabadi, A., & Pirvali Biranvand N. (2009). Designing polymorphic ISSR primers in order to study x and y types glutenin subunits in 1D locus controlling favorable baking quality of bread wheat. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, 1 (3), 075-079. DOI: 5F416F02840.
- Khan, S., Memon, A. N., Ghanghro, A. B., & Nabi, G. (2015). Characterization of Wheat protein (Albumin) in different varieties of wheat cultivated in Sindh through SDS-PAGE Electrophoresis. *Sindh Univ. Res. Jour. (Sci. Ser.)*, 47 (2), 361-366.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Miháliková, D., Gálová, Z., Petrovičová, L. & Chňapek, M. (2016). Polymorphism of proteins in selected slovak winter wheat genotypes using SDS-PAGE. *Journal of Central European Agriculture*, 17(4), 970-985. DOI: 10.5513/JCEA01/17.4.1800.
- Nawroz Abdul-Razzak Tahir. (2009). Polymorphism of Protein Fractions as Biochemical Markers for Identification of Wheat Varieties. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 2(4), 159 – 166.
- Osborne, T. B. (1907). *The proteins of the wheat kernel*. Washington, DC: Carnegie Inst.
- Shewry, P.R. (2003). Wheat gluten proteins. In: P.R. Shewry, G.L. Lookhart (Eds.), *Wheat Gluten Protein Analysis* (pp. 1-17.). Minnesota, USA: St Paul.
- Shewry, P.R. (2009). Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60, 1537-1553. DOI: 10.1093/jxb/erp058.
- Shomer, I., Lookhart, G., Salomon, R., Vasiliver, R., & Bean, S. (1995). Heat Coagulation of Wheat Flour Albumins and Globulins, their Structure and Temperature fractionation. *Journal of Cereal Science*, 22, 237–249. DOI: 10.1006/jcrs.1995.0060.
- Ssrensen, H., Ssrensen, S., Bjerregaard, C., & Michaelsen S. (1999). *Chromatography and capillary electrophoresis in food analysis*. Cambridge, England: The Royal Society of Chemistry.

- Stepanova, S., & Kasicka, V. (2016). Recent applications of capillary electromigration methods to separation and analysis of proteins. *Analytica Chimica Acta*, 933, 23-42. DOI: 10.1016/j.aca.2016.06.006.
- Vallejo-Cordoba, B., Rodríguez-Ramírez, R., & González-Córdova, A.F. (2010). Capillary electrophoresis for bovine and ostrich meat characterization. *Food Chemistry*, 120(1), 304-307. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.09.080.
- Wang, P., Chen, H., Mohanad, B., Xu, L., Ning, Y., Xu, J., Wu, F., Yang, N., Jin, Z., & Xu, X. (2014a). Effect of frozen storage on physico-chemistry of wheat gluten proteins: Studies on gluten-, glutenin- and gliadin-rich fractions. *Food Hydrocolloids*, 39, 187-194. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2014.01.009.
- Wang, P., Xu, L., Nikoo, M., Ocen, D., Wu, F., Yang, N., Jin, Z., & Xu, X. (2014b). Effect of frozen storage on the conformational, thermal and microscopic properties of gluten: Comparative studies on gluten-, glutenin- and gliadin-rich fractions. *Food Hydrocolloids*, 35, 238-246. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2013.05.015.
- Weipert, D. (2006). Fundamentals of rheology and spectrometry, In: L. Popper, W. Schafer, W. Freund (Eds.), *Future of flour a compendium of flour improvement* (pp. 117-146.). Germany: Clenze, Agrimedia.
- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24, 115-119. DOI: 10.1016/j.fm.2006.07.004
- Zhu, Z., Lu, J. J., & Liu, S. (2012). Protein Separation by Capillary Gel Electrophoresis: A Review. *Analytica Chimica Acta*, 709. DOI: 10.1016/j.aca.2011.10.022.
- Žunić, G. (2003). Kapilarna elektroforeza - nov metodološki pristup analizi molekula i izazov za biohemičare. *Vojnosanitetski preglad*, 60, 733-739.

## Analysis of wheat proteins by capillary gel electrophoresis (CGE)

Danica Savanović<sup>1\*</sup>, Radoslav Grujić<sup>2</sup>, Aleksandra Torbica<sup>3</sup>, Jovo Savanović<sup>4</sup>

<sup>1</sup>University of Banja Luka, Faculty of Technology Banja Luka, Republic of Srpska, B&H

<sup>2</sup>University of East Sarajevo, Faculty of Technology Zvornik, Republic of Srpska, B&H

<sup>3</sup>University of Novi Sad, Institute of Food Technology Novi Sad, Serbia

<sup>4</sup>MI "DIM-DIM" d.o.o., Laktaši, Republic of Srpska, B&H

**Key words:**  
analysis,  
wheat proteins,  
capillary gel  
electrophoresis.

Wheat proteins are considered to be the most important components that affect the baking quality of flours. They are characterized by high heterogeneity and a wide range of molecular masses. Various techniques may be used for the separation and identification of proteins. The aim of this paper was to investigate application possibilities of high performance SDS-capillary gel electrophoresis (SDS-CGE) for the analysis and quantification of proteins in wheat flour. Separation of protein from a wheat flour dough was carried out using capillary electrophoresis (Agilent, CE 7100) and the SDS-MW Analysis Kit (Beckman Coulter). Migration time and peak area of individual protein molecule in the electropherogram were analyzed using ChemStation Software (Agilent Technologies, PaloAlto, CA). On the electropherogram, obtained after protein analysis, 57 proteins of various molecular masses ranged from 10 kDa to 225 kDa were separated. The biggest number of separated proteins had a mass from 0 to 20 kDa (22 proteins), while the number of separated proteins of larger molecular masses was much smaller (3 proteins had masses from 100 to 150 kDa and 5 proteins had masses greater than 150 kDa). This method enables precise identification and quantification of wheat protein and can be used to study changes and behavior of wheat protein during the technological processes of production.