



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

Kapilláris elektroforézis alkalmazása búzafehérjék érésdinamikai és fajtaazonosítási vizsgálataira

c. PhD értekezés tézisei

Készítette:

Scholz Éva
okleveles vegyész

Témavezető:

Prof. Salgó András
Tanszékvezető egyetemi tanár

Konzulens:

Baranyáné Dr. Ganzler Katalin
Osztályvezető
Készítmény Fejlesztési Főosztály
Fejlesztési Analitikai Osztály
Richter Gedeon Rt.

2004

BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS

Az elválasztástechnikában régóta nagy szerepet játszó hagyományos elektroforézises és kromatográfias elválasztások mellé az utóbbi néhány évtizedben felsorakozott a kapilláris elektroforézis is, ami egyre szélesebb körben elterjedt módszer többek között az élelmiszeranalitika és a biokémia területén.

Az élelmezés szempontjából kiemelkedő jelentőségű búza a világ egyik legértékesebb és legnagyobb területen termesztett gabonaféléje. Sok faja, fajtája és változata létezik, amelyek jó alkalmazkodóképességüknek köszönhetően tág éghajlati határok között terjedtek el, illetve termesztethők.

A búza fehérje-összetételét régóta kutatják különféle elválasztástechnikai módszerekkel. A kapilláris elektroforézis e területen való alkalmazása olcsó, gyors elválasztásokat tesz lehetővé; illetve reményt ad a fehérjék finomszerkezetének kutatására, a fehérjék kölcsönhatásainak tisztázására. A finomszerkezet vizsgálata fontos információkat nyújt az érés során bekövetkező változásokról; illetve jól alkalmazható fehérje alapú fajtaazonosításra, ami a gabonavizsgálati területen általánosan felmerülő analitikai igény.

A búza sokrétű felhasználhatósága szükségessé teszi a lisztérzékenység (ami egy –a táplálékban található gliadinok bizonyos szekvenciáinak hatására fellépő– abnormális immunválasz), illetve az abban szerepet játszó fehérjék vizsgálatát.

Munkámmal a kapilláris elektroforetikus módszerek gabonakémiai területen való alkalmazásához kívántam hozzájárulni.

Dolgozatom célja a kapilláris elektroforézis alkalmazhatóságának vizsgálata volt a búzafehérje analitika különböző területein.

- Kapilláris elektroforetikus módszerek kidolgozását tűztem ki célul búzafehérjék, illetve egy gliadin-analóg fehérje elválasztására.
- Célom volt különböző tenyésztési csoportba tartozó búzafajták esetén, az érés teljes folyamatának nyomon követése kapilláris elektroforézissel, az egyes Osborne frakciók fehérje-komponenseinek változásait követve.
- Vizsgálni kívántam a kapilláris elektroforézis búza fajtaazonosításra való alkalmasságát a magyarországi búzafajták körében, az eredményeket korszerű statisztikai módszerekkel kiértékelve.
- Célul tűztem ki a –lisztérzékenységben szerepet játszó– gliadin analóg BM180 fehérje vizsgálatát, ahol a fehérje jelenlétének kimutatása, a tisztítási folyamat nyomon követése volt a vizsgálatok célja.

VIZSGÁLT MINTÁK, ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Az érésdinamikai vizsgálatokhoz a Magyar Tudományos Akadémia Mezőgazdasági Kutatóintézetének (Martonvásár) tenyészkeretjéből származó, szabadföldi termesztésű búzákat használtam, a fehérjék (albuminok, gliadinok, gluteninek) izolálása módosított Osborne frakcionálással történt.

A fajtaazonosítási vizsgálatok során a Gabonatermesztési Kutató Kht (Szeged) és a Magyar Tudományos Akadémia Mezőgazdasági Kutatóintézetének (Martonvásár) búzafajtáit használtam, a gliadinok izolálása etanolos extrakcióval történt.

A gliadin analóg BM180 fehérjét egér EHS (Engelberth-Holm-Swarm) tumorsejt homogenátumból Tris pufferrel extraháltam és ammónium-szulfátos kicsapással dúsítottam.

A kapilláris elektroforetikus vizsgálatok során manuális és automata kapilláris elektroforézis készüléket alkalmaztam.

A búzafehérjéket kapilláris zónaelektroforézissel, polimert és acetonitrilt tartalmazó savas foszfát pufferben; a gliadin analóg BM180 fehérjét 10%-os dextrán gélben kapilláris gélelektroforézissel választottam el.

A fajtaazonosítási eredmények értékeléséhez Excel, Statistica és PQS (Polar Qualification System) programokat használtam. A statisztikai elemzésnél a főkomponens- és a csoport analízis módszerét alkalmaztam.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A kapilláris elektroforetikus módszerkidolgozás és -optimalás folyamán új -az irodalomban eddig nem alkalmazott- kapilláris mosási eljárást dolgoztam ki savas foszfát pufferben végzett zónaelektroforézis esetén, melynek során acetonitril—1-propanol—acetonitril kombináció alkalmazása bizonyult optimálisnak a kapillárisfalra tapadt fehérjék eltávolítása érdekében.

2. Érésdinamikai vizsgálatokat végeztem különböző tenyészidő csoportba tartozó búzafajták (Bánkúti 1201, Martonvásári 23 és Martonvásári 15) esetén. Kapilláris elektroforézissel elsőként követtem végig az érés teljes folyamatát az egyes Osborne frakciók (albuminok, gliadinok, gluteninek) fehérje-finomszerkezete változásainak vizsgálatával.

Kísérleteim során megállapítottam, hogy az albuminok már az első mintavétel idején (12 nappal a virágzás után) jelen voltak, a gliadinok és a gluteninek később jelentek meg (23-29 nappal a virágzás után). Az albumin fehérjék megjelenése az elektroferogramokon hasonló időskálát követett a különböző búzafajták esetén; a virágzást követő 33-38. naptól kezdődően kialakuló albumin fehérje-mintázatok is hasonlóak voltak.

A gliadinok a gluteninek előtt jelentek meg, és a gliadin akkumuláció inkább az érés kezdeti szakaszára (virágzás utáni 23-38. nap), a gluteninek felhalmozódása pedig egy későbbi szakaszra (virágzás utáni 33-47. nap) volt jellemző. A gliadinok és gluteninek fő tömegének szintézise egyaránt 1,5-2 hét alatt ment végbe.

A gliadinok koncentrációja az érés során ugrásszerűen nőtt meg a virágzást követő 23-29. napon, lassan növekedett a virágzást követő 33-38. napig, majd nagyjából állandósult. A fajtára jellemző gliadin mintázat már a fehérjék megjelenésekor felismerhető volt, és az érés során csak kissé változott. Ez a mintázat fajtánként eltérő volt, de a Martonvásári fajták esetén igen hasonlóan mutatkozott.

A gluteninek koncentrációja a gliadinokkal ellentétben csak lassan emelkedett; eltérő dinamikájú glutenin felhalmozódást tapasztaltam a különböző búzafajták esetében. A fajtára jellemző glutenin mintázat az érés folyamán fokozatosan alakult ki, nagyobb változékonyságot mutatva a gliadinok fehérjemintázatának változásához képest. A két Martonvásári fajta fehérje-mintázata itt is hasonlóan mutatkozott.

3. Búza fajtaazonosítási vizsgálatokat végeztem kapilláris elektroforézissel. A magyarországi búzafajták kapilláris elektroforetikus fajtakatalógusa összeállításának kezdő lépéseként elsőként végeztem el hat különböző magyarországi búzafajta gliadin frakciójának vizsgálatát. Az eredmények értékelését statisztikai módszerrel, polár minősítő rendszerrel és vizuálisan végeztem el. A vizuális kiértékelés alacsony mintaszám esetén megfelelőnek mutatkozott. Polár minősítő rendszerben a fajták többsége megkülönböztethető volt egymástól. A statisztikai kiértékelés során a csoportanalízis és az elektroferogramok közti hasonlóság számítása lehetővé tette a fajták nagy biztonsággal történő meghatározását.

4. Vizsgáltam a lisztérzékenységben szerepet játszó BM180 fehérjét. Az SDS-kapilláris gélelektroforetikus rendszer alkalmasnak bizonyult a gliadin homológ bazális membránfehérje tisztítási folyamatának nyomon követésére a minta tisztítási folyamata során. Vizsgálataim eredményeképpen megállapítottam, hogy a tisztítással és frakcionálással nyert minta a BM180 fehérjének megfelelő molekulatömegtartományban kevés fehérjét tartalmazott. A BM180 fehérje igen érzékenynek bizonyult, könnyen bomlott. Az általam alkalmazott zónaelektroforetikus rendszerben a BM180 fehérjét tartalmazó frakció fehérjének elektroforetikus viselkedése a kis mozgékonyaságú gliadinokéval egyezett meg.

AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTÁSA

Az elért eredményeket összefoglalva megállapítható, hogy a kapilláris elektroforézis búzafehérjék analitikai vizsgálatára széleskörűen alkalmazható, legyen szó fiziológiai folyamatok nyomon követéséről, fajtaazonosításról vagy molekulatömeg szerinti elválasztásról.

Az érésdinamikai folyamatok további kapilláris elektroforetikus vizsgálata közelebb visz az érés során lejátszódó folyamatok jobb megértéséhez, és az egyes búzafehérje frakciók alegységszerkezetének és érés alatti változásainak pontosabb ismeretéhez.

A magyarországi búzák fajtakatalógusának elkészítése gyakorlati segítséget nyújt a nemesítők és a kutatók számára; a Magyarországon vetett búzafajták -kapilláris elektroforetikus vizsgálatának eredményeiből összeállított- adatbázisa alapján kapilláris elektroforézissel a magyarországi búzák fajtája gyorsan, kis költséggel határozható majd meg.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

Folyóiratcikk külföldi, idegen nyelvű folyóiratban

1. Eva Scholz, Gabor Pogány, Katalin Ganzler and Gordon W. Laurie: Characterization of a basement membrane protein (BM180) using capillary electrophoresis. Journal of Capillary Electrophoresis, Vol. 4, Issue 6, Nov/Dec 1997, 287-292
2. E. Scholz, K. Ganzler, Sz. Gergely, A. Salgó: Separation of the Unique Proteins of Wheat Protein Fractions by Capillary Electrophoresis. Chromatographia, 2000, 51, S130-S134
3. E. Scholz, K. Ganzler, Sz. Gergely, A. Salgó: Use of Capillary Electrophoresis to Monitor Wheat Maturation. Chromatographia, 2002, 56, S127-S130

Folyóiratcikk Magyarországon megjelenő, idegen nyelvű folyóiratban

4. M. Rakszegi, É. Scholz, M. Kárpáti, K. Ganzler, R. Lásztity, Z. Bedő: Study of the LMW glutenin composition of some old Hungarian wheat cultivars using capillary electrophoresis. Cereal Research Communications, 2000, Vol. 28, No. 3, 417-424
5. É. Scholz, K. Ganzler, Sz. Gergely, A. Salgó: Applicability of capillary electrophoresis in protein separations with regard to wheat and wheat analogous proteins. Periodica Polytechnica Ser. Chem. Eng., 2002, Vol. 46, No. 1-2, 51-58

Idegen nyelvű előadás

6. Salgó A., Gergely Sz., Scholz É.: Detection of Physiological Processes in Wheat by NIR 10th International Conference on Near-infrared Spectroscopy, Kyongju (2001. 06. 10-15.)

Magyar nyelvű előadás

7. Scholz Éva, Baranyáné Dr. Ganzler Katalin, Pogány Gábor, Laurie G.W.: Gliadin jellegű fehérjék vizsgálata kapilláris elektroforézissel. MTA Élelmiszertudományi Komplex Bizottsága, Magyar Élelmiszeripari Tudományos Egyesület, Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet 286. Tudományos Kollokviuma (1997. 10.31.)
8. Scholz Éva, Gergely Szilveszter, Ganzler Katalin, Salgó András: Búzafehérjék vizsgálata kapilláris elektroforézissel. MTA Élelmiszertudományi Komplex Bizottsága, Magyar Élelmiszeripari Tudományos Egyesület, Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet 297. Tudományos Kollokviuma (2000.02.25.)

9. Scholz Éva, Ganzler Katalin, Gergely Szilveszter, Salgó András: Elválasztástechnikai módszerek alkalmazása búza érésdinamikai folyamatainak követésében XIII. Élelmiszertudományi Konferencia (2000.05.25-26.)

Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent idegen nyelvű előadás

10. Gergely Sz., Scholz É., Salgó A.: Detection of physiological processes in wheat using near infrared spectroscopy Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 10th International Conference, edited by R.K. Cho and A.M.C. Davies, p. 173-177, NIR Publications, 2002 (ISBN 0 9528666 3 3)
11. Scholz É., Ganzler K., Gergely Sz., Salgó A.: Capillary Electrophoresis in Wheat Protein Separations ICC Conference 2002 (Novel Raw Materials, Technologies and Products - New Challenge for the Quality Control) Edited by A. Salgó, S. Tömösközi and R. Lásztity, p. 184-192, Budapest University of Technology and Economics, 2002 (ISBN 963 420 719 7)
12. Gergely Sz., Scholz É., Salgó A.: NIR: A Tool for Detection of Maturation Process in Wheat Proceeding of International Wheat Quality Conference, Manhattan, Kansas, USA. Ed. O.K. Chung and J.L Steele, Grain Industry Alliance, pp. 447. 2003.

Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent idegen nyelvű összefoglaló

13. Scholz É., Pogány G., Ganzler K.: Characterisation of a Basement Membrane Protein (BM 180) using Capillary Electrophoresis. Balaton Symposium'97 on High Performance Separation Methods p.241 (1997.)
14. Scholz E., Ganzler K., Salgó A.: Separation of Wheat Protein Fractions using High-Performance Capillary Electrophoresis. Balaton Symposium'99 on High Performance Separation Methods p.181. (1999.)
15. Scholz E., Ganzler K., Gergely Sz., Salgó A.: Monitoring wheat maturation process by capillary electrophoresis Balaton Symposium'01 on High Performance Separation Methods p.149. (2001.)

Magyar nyelvű konferencia kiadványban megjelent előadás összefoglaló

16. Scholz Éva, Baranyáné Dr. Ganzler Katalin, Pogány Gábor, Laurie G.W.: Gliadin jellegű fehérjék vizsgálata kapilláris elektroforézissel. MTA Élelmiszertudományi Komplex Bizottsága, Magyar Élelmiszeripari Tudományos Egyesület, Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet 286. Tudományos Kollokviuma p.1. (1997)
17. Scholz Éva, Gergely Szilveszter, Ganzler Katalin, Salgó András: Búzafehérjék vizsgálata kapilláris elektroforézissel. MTA Élelmiszertudományi Komplex Bizottsága, Magyar Élelmiszeripari Tudományos Egyesület, Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet 297. Tudományos Kollokviuma (2000.)

18. Scholz Éva, Ganzler Katalin, Gergely Szilveszter, Salgó András: Elválasztástechnikai módszerek alkalmazása búza érésdinamikai folyamatainak követésében XIII. Élelmiszertudományi Konferencia p.54. (2000.)
19. Rakszegi M., Scholz É., Kárpáti K., Ganzler K.: Gabonafehérjék elválasztása kapilláris elektroforézises módszerrel Magyar Elválasztástudományi Társaság, Elválasztástudományi Vándorgyűlés 1998. p.27.

Idegen nyelvű poszter

20. Scholz É., Pogány G., Ganzler K., Laurie G.W.: Characterisation of a Basement Membrane Protein (BM 180) using Capillary Electrophoresis Balaton Symposium'97 on High Performance Separation Methods (1997.09.3-5.)
21. Scholz É., Pogány G., Ganzler K., Laurie G.W.: Characterisation of a Basement Membrane Protein (BM 180) using Capillary Electrophoresis 22nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, St. Louis, Missouri, USA (1998.05.2-8.)
22. Scholz E., Ganzler K., Gergely Sz., Salgó A.: Separation of Wheat Protein Fractions using High-Performance Capillary Electrophoresis Balaton Symposium'99 on High Performance Separation Methods (1999.)
23. Gergely Sz., Scholz É., Salgó A.: NIR: A Tool for Detection of Maturation Process in Wheat 2nd International Wheat Quality Conference, Manhattan (2001. 05. 20-24.)
24. Scholz E., Ganzler K., Gergely Sz., Salgó A.:Monitoring wheat maturation process by capillary electrophoresis. Balaton Symposium'01 on High Performance Separation Methods (2001.)
25. Scholz E., Ganzler K., Gergely Sz., Salgó A.:Capillary Electrophoresis in Wheat Protein Separations ICC 2002 Conference (2002.05.26-29.)

Magyar nyelvű poszter

26. Rakszegi M., Scholz É., Kárpáti K., Ganzler K.: Gabonafehérjék elválasztása kapilláris elektroforézises módszerrel Magyar Elválasztástudományi Társaság, Elválasztástudományi Vándorgyűlés 1998. 09.30-10.2.

