

Ph. D. ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Szabó Erzsébet

Okl. biomérnök

**Enzimes hidrolízis, nem termikus, új tartósítási eljárás és környezeti
változások hatása élelmiszerfehérjék mintázatára
és immunreaktív jellegére**

Dr. Hajós Gyöngyi
egyetemi magántanár
témavezető

Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet
Táplálkozástudományi Osztály
Budapest
2006

Bevezetés és célkitűzés

A növekvő népesedés, a változó környezeti hatások és fogyasztói igények mind-mind újabb megoldandó feladatokat jelentenek a különböző tudományterületek szakemberei számára. A megoldásokhoz az élelmiszer-tudományban pl. az adott céloknak leginkább megfelelő, vagy új nyersanyagok kiválasztásával, kíméletesebb, gazdaságosabb technológiák kifejlesztésével, meghatározott célcsoportok kiszolgálásával járulhatunk hozzá.

Hagyományos és reform táplálékaink alapanyaga napjainkban is a jelentős fehérje és energiaforrásként szolgáló gabona-, hús- és tejtermékek. Ezen alapanyagok minőségét a „termőföldtől az asztalig” számos tényező alakítja. Az alapanyagok és késztermékek minőségét befolyásoló tényezők hatásainak vizsgálata az élelmiszerbiztonság és az egészségmegőrző táplálkozás szempontjából egyaránt nélkülözhetetlen.

A gabonák humán táplálkozásban betöltött fontos szerepe nagy energiatartalmuk mellett, jó tárolhatóságuknak és a belőlük készült termékek széles választékának köszönhető. Dolgozatom fő témájaként a különböző gabonák (búza és tritikále) minőségét meghatározó kvalitatív és kvantitatív fehérje-összetétel környezeti faktorok hatására bekövetkező változásának nyomon követésével foglalkozom. A környezeti stresszhatások ugyanis olyan mértékben zavarhatják meg a növények anyagcseréjét, ami végső soron a produktivitás csökkenéséhez vezet. Ez a termesztett növények esetében komoly termés kiesést jelenthet. Ennek kivédésére régóta alkalmazott módszer az egyes stresszoroknak jobban ellenálló fajták kiválasztása és nemesítése.

A növényi anyagcsereválaszok sokfélék lehetnek, egyesek a géntranszkripció *túl- és alul-*szabályozásának következményei (pl. a hősokkfehérjék), míg más esetekben a stressz multigén családok egyes tagjainak expresszióját változtatja meg (pl. az antioxidáns génekét). A génexpressziós és az anyagcsere változások, illetve azok kölcsönhatásai eredményezik a növény alkalmazkodását (Szigeti, 2002).

Kutatásaim során arra kerestem a választ, hogy egy agronómiai faktor, az emelt dózisu fungicid kezelés, ezen kívül a nagy hidrosztatikus nyomáskezelés és az enzimes módosítás hogyan befolyásolhatja az alapanyagok minőségi paramétereit meghatározó fehérje-összetételt, és a fehérjék biológiai aktivitását. Kísérleteimben a tebukonazol és propikonazol hatóanyagú fungicidek hatását vizsgáltam 2004-ben, 1 búza és 2 tritikále fajtával. A nagy hidrosztatikus nyomáskezelés hatásának vizsgálatát sertéshús alappasztával, az enzimesen módosított epitópok vizsgálatát nátrium-kazeináttal végeztem.

Anyagok és módszerek

A vizsgált minták

Nátrium-kazeinát hidrolizátumok:

A kereskedelmi nátrium-kazeinát izolátumból (SCI) (Laktopol, Suwalki, Lengyelország) kétlépéses eljárással készített hidrolizátumokat Dr Barbara Wróblewska (Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Lengyelország) bocsátotta rendelkezésemre. Az enzimes bontáshoz pronázt (*Streptomyces griseus* eredetű proteáz, széles spektrumú, Sigma), papaint (EC 3.4.24.4), valamint alkalázt (2,4L FG, *Subtilisina carlsberg*, Novo Nordisk) alkalmazott. A kétlépéses hidrolízist az egyes enzimekre optimális körülmények között végezték.

Húsminták:

A nagy hidrosztatikus nyomáskezelés fehérje-mintázatra gyakorolt hatását sertéshúsból készült, só és paprikát nem tartalmazó, kolbász alappasztával vizsgálatával végeztem el.

A kiindulási minta a sertéshúson kívül nagyobb mennyiségben (kb. 30%) szalonnát, valamint kisebb mennyiségben fűszereket tartalmazott (0,3%). A keveréket 20 percig 600 MPa nyomáson kezelték, Stansted „Food Lab 900” típusú készülékben.

A kontroll és kezelt mintákból a karbamid-oldható fehérjéket használtam a további vizsgálatokhoz.

Gabonaminták:

A vizsgálatokban használt gabonaminták (Tisza búza, Marko és Bogo tritikále) a Gabonatermesztési Kutató Közhasznú Társaság (Szeged) telepéről származtak:

A vegyszeres kezelést propikonazol, valamint tebukonazol hatóanyagú szerekkel végezték. Két alkalommal, az aratás előtt 51 nappal (virágzás idején) propikonazzal 0,6 l/ha, illetve 43 nappal (kalászás idején), tebukonazzal 1,5 l/ha emelt dózist alkalmazva permetezték a növényeket.

A gabonaszemeket Hagberg-Perten darálón őrölték meg, 0,8 mm perforációs méretű szita használatával.

Gabonafehérjék oldhatóság szerinti frakcionálása

Munkám során a gabonafehérjék kinyerésére Osborne-féle (1907) frakcionálást alkalmaztam, azzal a módosítással, hogy a víz- és só-oldható frakciót (albumin- globulin) együtt nyertem ki.

Na- dodecil- szulfát poliakrilamid gél elektroforézis (SDS-PAGE)

A kapott frakciók fehérjéinek molekulatömeg szerinti elválasztása Na- dodecil- szulfát poliakrilamid gél elektroforézissel (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) történt, Bio-Rad Mini-PROTEAN 3 Cell készüléken. Triklór-ecetsavas fixálást követően a fehérjék detektálásához Coomassie festést alkalmaztam.

Kétdimenziós elektroforézis (2-DE)

A kétdimenziós elektroforetikus fehérjetérképeket PROTEAN IEF Cell és PROTEAN II xi 2-D (Bio-Rad) készülékekből álló rendszerrel készítettem. Az első dimenzióban izoelektromos fókuszálással történt az elválasztás, immobilizált pH- gradienst tartalmazó gélekben (IPG strip, pH:3,0-10,0, 5,0-8,0 vagy 6,0-11,0). A második dimenzióban a molekulatömeg szerinti elválasztás SDS- PAGE módszerrel történt, a mintáknak megfelelő akrilamid tartalmú gélben.

Elektroforetikus blot technika és immunreakció

Az elektroforetikus elválasztás után a fehérjefrakciókat Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) készülék segítségével nitrocellulóz membránra vittük át. Az antigén-antitest komplexek kimutatásához humán szérumokat, illetve nyúlban termeltetett szérumokat használtunk. A vizsgálatokhoz felhasznált humán szérumok klinikailag igazolt háttérű tej- és gabona-allergiás betegektől származtak.

Szoftveres kiértékelés

A kapott géleket Gel Doc 2000 (Bio- Rad) rendszerrel dokumentáltam, a képekről Quantity One 4. 3. 0. (SDS- PAGE esetén) és PDQUEST 7. 1. 0. (2- DE esetén) szoftver segítségével gyűjtöttem adatokat. A szoftver tartalmazza a molekulatömeg és izoelektromos pont szerinti kalibrálás lehetőségét.

Tömegspektrometria

A 2-DE gélekből kivágott mintákat redukálás (ditiotreitól) és alkilálás (jóacetamid) után tripszinnel emésztették. Extrakció után a mintákat MALDI-TOF MS készüléken (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany) DHB (2,5-dihidroxi-benzoészav) mátrixban analizálták.

Az adatbázis keresést a világhálón <http://prospector.ucsf.edu> címen elérhető programcsomag MS_Fit programja segítségével végezték, az NCBI nr.2005.01.06 adatbázis felhasználásával.

Az α -amiláz enzim aktivitás-mérése

A minták α -amiláz enzim aktivitását Megazyme enzimteszt (Megazyme International Ireland Ltd., Bray, Ireland) segítségével, a leírás szerint határoztam meg.

Statisztikai program

Az eredmények statisztikai értékeléséhez MINITAB 13 programot (State College, PA) használtam fel.

Új tudományos eredmények

1. A kazeinből különböző enzimes (papain, pronáz és alkaláz) módosításokkal kapott peptidkeverékek komponenseit 10 kDa alatti molekulatömeg tartományban detektáltam, és immunreakcióval kimutattam, hogy az alkaláz-papain, és a pronáz-alkaláz enzimekkel készült hidrolizátumok relatív immunreaktivitása jelentősen csökkent.
2. Igazoltam, hogy nyomáskezelés (600 MPa) hatására változott a vizsgált sertéshús alappaszta urea-oldható fehérjéinek összetétele: a kétdimenziós elektroforézissel elválasztott fehérjéknél a 34-50 kDa és pI: 7,0-9,0 közötti tartományban detektált igen intenzív foltok a nyomáskezelést követően nem, illetve csökkent intenzitással voltak láthatók, tehát a kezelés a sertéshús fehérjék konformációs változásait idézte elő.
3. A kolbászpaszta urea-oldható fehérje frakciójának immun-reaktív jellege csökkenést mutatott a 600 MPa nyomáskezelés hatására. A nyomáskezelés a sertéshús fehérjék építő szerkezeteinek módosulását okozta.
4. *Triticum aestivum* búzában hősokk fehérje70 (AAB99745), kitináz C (JN0884) és xilanáz inhibitor (CAD19479) fehérjék IgE reaktivitását mutattam ki.

5. Megállapítottam, hogy a vizsgálatba vont Tisza búza, Marko és Bogo tritikále fajták emelt dózisú fungicid kezelésekre adott válaszreakciói különböznek. A Tisza búza víz- és só-oldható fehérjének eloszlása eltérést mutatott 5,0-9,0 pI és 30-60 kDa, valamint 5,0-8,0 pI és 22 kDa alatti tartományokban a fungicid kezelést követően. A Marko tritikále fehérje-mintázata nem változott a kezelés hatására. A legtöbb eltérést az érzékeny Bogo fajta mutatta.
6. Megállapítottam, hogy az emelt dózisú fungicid (tebukonazol és propikonazol) kezelés a Bogo tritikále fehérje-összetételének változását okozta. Az emelt dózisú fungicid (propikonazol és tebukonazol) kezelés dimer α -amiláz inhibitorok és endogén α -amiláz/szubtilizin inhibitorok szintézisét idézte elő a Bogo tritikále mintában, az α -amiláz enzimaktivitás szignifikánsan csökkenése mellett. Két endogén α -amiláz/szubtilizin inhibitor és két proteináz inhibitor izoform mennyisége növekedett.
7. Megállapítottam, hogy a Bogo tritikále víz- és só-oldható frakciójában az emelt dózisú fungicid kezelést követően három fehérje immun-reaktivitása erősödött (MW: 15-16 kDa, pI: 6,6-6,7 és MW: 29-30 kDa, pI: 10,0), valamint két újonnan megjelent fehérje IgE reaktivitást mutatott (MW: 23-24 kDa, pI: 5,8-6,2).
8. Kimutattam, hogy a Bogo tritikále alkohol-oldható frakciójában az emelt dózisú fungicid (tebukonazol és propikonazol) kezelést követően különbség fehérjék jelentek meg a 75 kDa molekulatömegű, és 7,0-8,0 izoelektromos pontú tartományban. A szekalin prekurzorként azonosított fehérjék csak az emelt dózisú fungicidekkel kezelt mintában voltak detektálhatók. A fertőzöttségi adatokat tekintve, a Bogo minta kezeletlen csoportja 10%-ban volt fuzáriummal fertőzött, ami egyik oka lehet a fehérjetérképekben talált különbségeknek. Feltételezésem szerint az érzékeny fajta tritikále (Bogo) a biotikus stresszre (fuzárium-fertőzés) érzékenyebben reagált,

mint az abiotikusra (fungicid kezelés). Valószínűnek tartom, hogy a biotikus stressz következtében gátolt volt a szekalin prekursorok képződése.

9. A kezeletlen és az emelt dózisu fungicidekkel kezelt Bogo tritikále alkohol-oldható egyes fehérjéinek IgA- és IgE reaktivitása humán szérumokkal szemben különbözőnek bizonyult: IgA reaktivitásában eltérést detektáltam 6,0-7,1 izoelektromos pont és 33-40 kDa molekulatömeg tartományban. A kezeletlen Bogo mintában detektált, kb. 8,5 izoelektromos pontú, 30-32 kDa, valamint a 40-45 kDa molekulatömegű fehérjék IgE-kötő képessége jelentős csökkenést mutatott, míg a kb. 6,5 izoelektromos pontú, 36 kDa molekulatömegű fehérjék immunreaktivitása az emelt dózisu fungicid kezelést követően nőtt az alkalmazott egyéni szérummal szemben.

Az eredmények gyakorlati alkalmazásának lehetőségei

Eredményeim hozzájárulnak a stresszfehérjék kimutatásához, azonosításához, az enzimes módosításoknak, a nem termikus új tartósítási eljárásnak és a környezeti változásoknak a fehérjék minőségi összetételére gyakorolt hatásai megismeréséhez, a növényi allergének előrejelzéséhez és nyomon követéséhez, továbbá adatokat szolgáltatnak a növénynevelési munkákhoz, a fajtakiválasztáshoz az élelmiszerbiztonság és az egészségmegőrző táplálkozás tükrében.

Felhasznált irodalom:

- Adler-Nissen, J. (1986): Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier: Applied Science, London.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
- Osborne, T. B. (1907): The Proteins of the Wheat Kernel. Carnegie Institute, Washington, D. C.
- Szigeti, Z. (2002): Növények és a stressz. In: Növényélettan (Ed.: Láng Ferenc), ELTE Eötvös Kiadó.

A témával kapcsolatban megjelent közlemények:

1. Hajós, Gy., **Szabó, E.**, Janáky, T. (2004): Two-dimensional Electrophoresis, MALDI TOF MS and Blotting for Identification and Characterisation of PR-Proteins in Wheat Cultivar. *Chromatographia*, Vol. 60, S257-S259. *impakt faktor: 1,145.*
2. Wróblewska, B., Jedrychowski, L., Hajós, Gy., **Szabó, E.** (2005): Properties of an enzymatic hydrolysate obtained from sodium caseinate isolate as a hypoallergenic formula. *Polish Journal of Environmental Studies*, Vol. 14, pp. 411-416. *impakt faktor: 0,366 (2004).*
3. Hajós, Gy., **Szabó, E.**, Farkas, J. (2003): High pressure effects on structure and immunological crossreactivity of meat proteins. *Acta Alimentaria*, Vol. 32, pp. 47-54. *impakt faktor: 0,299.*
4. Wróblewska, B., Jedrychowski, L., **Szabó, E.**, Hajós, Gy. (2005): The reduction of cow milk proteins immunoreactivity by two-step enzymatic hydrolysis. *Acta Alimentaria*, Vol. 34 (3), pp. 307-315. *impakt faktor: 0,214 (2004).*

Egyéb közlemények:

1. **Szabó, E.**, Hajós, Gy., Matuz, J. (2002): Identification of major allergens of cereal proteins by electrophoretic methods. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* Vol. 11/52, SI 2, pp. 131-134.
2. Hajós, Gy., **Szabó, E.**, Daood, H.G., Cuadrado, C., Muzquiz, M. (2005): Effect of emerging technologies on the nutritionally active factors of Lupin seed products. Eds.: E. van Santen and G.D. Hills. *Proceedings of the 11th International Lupin Conference, Guadalajara, Jalisco, Mexico, 4-5 May, 2005.* pp. 2-6.
3. Bóna, L., Adányi, N., **Szabó, E.**, Hajós, Gy. (2006): Selenium in wheat and triticale grains. (Eds.: M. Szilágyi, K. Szentmihályi). *Proceedings of the International Symposium on Trace Elements in the Food Chain, Budapest, 25-27 May, 2006.* pp. 45-50.

A témával kapcsolatos előadások:

1. Hajós, Gy., **Szabó, E.**, Gelencsér, É., Matuz, J., Polgár, M. (2001): Gabonafehérjék potenciális allergén aktivitásának kimutatása és módosítása. (Orális előadás). *A Magyar Táplálkozástudományi Társaság XXVI. Vándorgyűlése Táplálkozás Allergia Diéta 6. évf. 5. sz. 15. old.*
2. **Szabó, E.**, Hajós, Gy., Matuz, J. (2002): Identification of major allergens of cereal proteins by electrophoretic methods. (Oral presentation). *International Workshop on Food Supplementation in Food Allergy and Immunity, August 30 –September 1, 2002., Mierki/Olsztyn, Poland. Book of Abstracts, pp.16.*
3. **Szabó, E.**, Hajós, Gy. (2004): Az élelmiszer allergia aktuális kérdései. A potenciális gabona allergének in vitro nyomon-követésének lehetőségei. (Orális előadás). *IZ-FESZT 2004., Élelmiszerek és Kertészeti Termékek Szakkiállítása és Vására, Budapest, Budapesti Corvinus Egyetem, 2004. október 8.*
4. **Szabó, E.**, Bóna, L., Hajós, Gy. (2005): Környezeti tényezők hatása magyar tritikále fajták fehérje-összetételére. (Effect of environmental factors on protein composition of different varieties of hungarian triticale.) (Orális előadás). *Lippai János- Ormos Imre- Vas Károly Tudományos Ülésszak, Budapest, 2005. október 19-21., Összefoglalók: 226-227. old.*

5. **Szabó, E.**, Szanics, E., Hajós, Gy., Matuz, J. (2001): Identification of Major Allergens of Cereal Proteins by Two-dimensional Electrophoretic Analysis and Immunoblotting Method. (Poster presentation). Balaton Symposium '01 On High Performance Separation Methods, September 2-4 Siófok. Book of Abstracts, P-72.
6. **Szabó, E.**, Nagy-Gasztonyi, M., Hajós, Gy., Matuz, J. (2002): Traceability of Major Allergens of Cereal Proteins. (Poster presentation). ICC Konferencia, Budapest, May 26-29. 2002. Book of Abstracts, pp. 96.
7. **Szabó, E.**, Hajós, Gy., Matuz, J. (2002): Identification of major allergens of cereal proteins by electrophoretic methods. (Poster presentation). EURO FOOD TOX V., Olsztyn, Poland, August 28-30. 2002. Book of Abstracts, pp. 53.
8. Hajós, Gy., **Szabó, E.**, Tömösközi-Farkas, R. (2002): Allergenic potential of food proteins. (Poster presentation). CE Food Congress, Ljubljana, September 22-25, 2002. Book of Abstracts, pp. 55.
9. **Szabó, E.**, Hajós, Gy., Matuz, J. (2002): Gabonafehérje-allergének elválasztása és azonosítása elektroforetikus módszerekkel. (Poszter). Elválasztástudományi Vándorgyűlés, 2002. október 16-18., Lillafüred. Előadás és poszterkivonatok, pp. 53.
10. **Szabó, E.** (2003): Characterization, by electrophoresis, of allergens in wheat grains from different cultivars. (Poster presentation). FOSARE Seminar Series 2 on Food Allergy and Intolerance, Including Methods to Predict Allergenicity (SAFE Consortium), Brüsszel, 19-20 June, 2003. Book of Abstracts, pp. 32.
11. **Szabó, E.**, Szamos, J., Hajós, Gy., Pauk, J. (2003): Reproducibility of two-dimensional electrophoretic patterns of wheat protein fractions. (Poster presentation). 5. BALATON SYMPOSIUM on High-performance separation methods 2003, september 3-5, Siófok, Hungary. Book of Abstracts, pp. 93.
12. Hajós, Gy., **Szabó, E.**, Janáky, T. (2003): Electrophoretic characterization and identification of heat shock proteins from wheat cultivars. (Poster presentation). 5. BALATON SYMPOSIUM on High-performance separation methods 2003, september 3-5, Siófok, Hungary. Book of Abstracts, pp. 33.
13. **Szabó, E.**, Hajós, Gy., Pauk, J. (2004): Electrophoretic characterization of allergens in wheat grain fractions from different cultivars. (Poster presentation). 9th International Symposium on Immunological, Chemical and Clinical Problems of Food Allergy, Budapest, Hungary, 18-21. April. Book of Abstracts, pp. 174.
14. Wróblewska, B., Jedrychowski, L., **Szabó, E.**, Hajós, Gy. (2004): The reduction of cow milk proteins immunoreactivity by two-step enzymatic hydrolysis. (Poster presentation). 2nd Central European Congress of Food, Budapest, 26-28 April, 2004. Book of Abstracts, pp. 236.
15. **Szabó, E.**, Székely, R., Hajós, Gy., Bóna, L. (2004): Reproducibility of the electrophoretic characterisation of wheat grain albumin-and globulin fractions. (Poster presentation). 2nd Central European Congress of Food, Budapest, 26-28 April, 2004. Book of Abstracts, pp. 237.
16. Bóna, L., Kisbocskói, N., Hussein, D., Farkas, R., **Szabó, E.**, Hajós, Gy. and Acs, E. (2006): Antioxidants in triticale grains. 6th International Triticale Symposium. Stellenbosch, South Africa, 3-7 September 2006. *Book of Abstracts* pp. 38.

Egyéb előadások:

1. Gelencsér, É., Hajós, Gy., Jánosi, A., **Szabó, E.**, Pauk, J., Polgár, M. (2001): PAT rezisztenciát hordozó transzgenikus búza cöliákiás szérumokkal szembeni keresztaktivitásának vizsgálata. (Orális előadás). A Magyar Táplálkozástudományi Társaság XXVI. Vándorgyűlése Táplálkozás Allergia Diéta 6. évf. 5. sz. 15. old.
2. **Szabó, E.**, Hajós, Gy., Matuz, J., Polgár, M. (2003): Búzafehérje hidrolizátumok biológiai aktivitása. (Orális előadás). A Magyar Táplálkozástudományi Társaság XXVIII. Vándorgyűlése, Gyula, 2003. szeptember 11-13.
3. Hajós, Gy., **Szabó, E.**, Matuz, J. (2003): Gabonafélék és ököbúza fehérjeszerkezete és allergén jellege. (Orális előadás). A Magyar Táplálkozástudományi Társaság XXVIII. Vándorgyűlése, Gyula, 2003. szeptember 11-13.
4. Bona, L., Kisbocskói, N., Hussein, D., Farkas, R., **Szabó, E.**, Hajós, Gy. and Acs, E. (2006): Antioxidants in triticale grains. (Oral presentation). 6th Internationale Triticale Symposium. Stellenbosch, South Africa, 3-7 September 2006. Book of Abstracts, pp. ?
5. Gelencsér, E., Hajós, Gy., Jánosi, A., **Szabó, E.**, Pauk, J. (2002): Nutritional evaluation of transformed wheat. (Poster presentation). CE Food Congress, Ljubljana, September 22-25. 2002. Book of Abstracts, pp. 28.
6. Nagy, A., **Szabó, E.**, Hajós, Gy., Pauk, J., Gelencsér, É. (2006): Qualitative and quantitative composition of herbicide treated transgenic wheat lines. (Poster presentation). First International Congress Nutrition and Food Safety: Evaluation of Benefits and Risks. Budapest, 11-24 June 2006. Book of Abstracts, pp. 96.