



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

PHD ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Készítette:

Oszvald Mária

**A búza tartalékfehérjék tulajdonságainak in vitro és in vivo vizsgálata rizs
modell rendszerben**

Témavezetők:

Dr. Tömösközi Sándor

BME, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Dr. Tamás László

ELTE, Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék

Dr. Békés Ferenc

CSIRO, Plant Industry, Ausztrália

2007

BEVEZETÉS

A gabonafélék ősidőktől fogva nagy szerepet játszanak az emberi táplálkozásban. Napjainkban a lakosság energia-bevitelének mintegy 50 %-a, a fehérjebevitelnek pedig 45 %-a gabonafélékből származik. A gabonamagvak teljes fehérjetartalmának hozzávetőlegesen felét kitevő tartalék- vagy raktározási fehérjék az endospermiumban raktározódnak. A magfehérjék nem csak az élelmiszer- és a takarmányipar, hanem az alap kutatás számára is értékes anyagot képviselnek, mert génjeik a növény életciklusának csak pontosan meghatározott szakaszában működnek. A különböző biokémiai, biotechnológiai módszerek és elválasztástechnikák fejlődésének következtében a tartalékfehérjék vizsgálatára számos lehetőség kínálkozik.

A gabonafélék közül ma is az egyik legértékesebb és legnagyobb területen termelt gabona a búza, amelynek sütőipari minőségét illetve a tészta funkcionális tulajdonságait a liszt dagasztása során kialakuló siker fehérje-összetétele határozza meg. Ezért a búza tartalékfehérjéinek szerkezete, összetétele és reológiai viselkedése az egyik legszélesebb körben kutatott terület. A sikerfehérjék funkcionális tulajdonságainak közvetett vizsgálati módszereken alapuló meghatározása során az „alapliszt“-hez adagolt egyedi fehérjék hatását követhetjük, de a módszer alkalmazásának korlátja, hogy az „alapliszt“ endogén sikerfehérje komponensei befolyásolják a mérési eredményeket. A búza tartalékfehérjéinek vizsgálatára ideális megoldás lehet egy olyan liszt használata, mely nem tartalmazza a búzaliszt egyik komponensét sem. Ilyen „alapliszt” lehet például a rizsliszt.

A búza és a rizs tartalékfehérjéinek szerkezete és összetétele nagymértékben különbözik egymástól. Míg búza tartalékfehérjei zömében prolaminok –ezek hidratációja kapcsán jön létre a funkcionális sajátságok szempontjából alapvető jelentőségű siker –, a rizs raktározási fehérjei főleg globulinok. A kétféle fehérjetípus kombinálása modellrendszerekben számos elméleti és gyakorlati érdekességgel szolgálhat.

A búza tartalékfehérjék reológiai hatásvizsgálata mellett a lisztérzékenység problémájának megoldására is szolgálhat egy új tulajdonságokkal rendelkező, búza tartalékfehérjét is expresszázó rizs létrehozása. A búzaliszt és a belőle készült termékek az endospermium tartalékfehérjéinek egy része miatt ugyanis nem minden ember számára fogyaszthatók. Ellentétben a cöliákiával, a lisztérzékenység a víz - és a só oldható fehérjék egyes csoportjaihoz köthető allergiás betegség. Ezek a fehérjék a rizsben nincsenek jelen, így ha megfelelő prolamin fehérjékkel a rizs funkcionális tulajdonságait sikerül módosítani, akkor

ennek a növénynek a lisztje a lisztérzékenyek számára is fogyasztható kenyér előállítására lehetne alkalmas.

A rizs, mint modellnövény kiválasztását a munka során az is indokolja, hogy könnyen transzformálható, illetve a búza és a rizsfehérjék poszt-transzlációs mechanizmusa hasonló.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során a következő célok megvalósítására törekedtem:

1. Rizsfehérjék összetételének és a rizstészta funkcionális tulajdonságainak vizsgálata, különös tekintettel a dagasztási jellemzőkre.
2. A rizs liszt fehérje-összetételének és a rizstészta reológiai paramétereinek meghatározására alkalmas módszerek kidolgozása, illetve a búzaminősítésnél alkalmazott mikro módszerek adoptálása.
3. A búza tartalékfehérjék rizs modellben történő vizsgálatához szükséges redukciós/oxidációs módszer kidolgozása.
4. A fehérje-összetétel megváltoztatása a tartalékfehérjék *in vitro* adagolásával és inkorporációjával.
5. Búza tartalékfehérjék *in vivo* expressziója transzgenikus rizsvonalak létrehozásával.
6. Összefüggések keresése a megváltozott fehérje-összetétel és a funkcionális tulajdonságok között.

KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

-Öt magyar és hat ausztrál lisztminta beltartalmi értékeinek meghatározása után a fehérje-összetétel jellemzésére SDS-PAGE és SE-HPLC vizsgálatokat végeztem.

-A rizs lisztből készült tészta dagasztási tulajdonságainak meghatározására a búza minősítésére alkalmazott mikro technikák közül a mikro z-arm mixert (METEFÉM, Budapest) használtam.

-A rizs lisztkehez adagolt búza fehérje frakciókat különböző glutenin alléleket tartalmazó búzafajták (Mv Suba, G6, G7 és G8) HMW- illetve LMW glutenin alegységekben dúsított frakcióit több lépésben izoláltam.

-A különböző mennyiségű és típusú búza fehérje frakciók hatásának követésére addíciós/inkorporációs kísérleteket végeztem egy kiválasztott fajta rizsliszttel (Illadong) a mikro z-arm mixeren.

- a búza Glu1D-1d génnel a rizs genetikai transzformációját érett embrióból indukált kallaszon, génpuska (GENEBOOSTER, Gödöllő) segítségével végeztem

-A transzgén integrációját illetve a transzkripciót (vagyis a gén jelenlétét illetve annak aktív, átíródását) PCR illetve RT-PCR reakcióval igazoltam, míg a géntermék, a Dx5 HMW-GS fehérje expressziót SDS poliakrilamid gélelektroforézissel és western blot analízissel bizonyítottam.

- A mérési eredmények értékelését különböző statisztikai módszerekkel (korrelációs számítások, variancia analízis), a STATISTICA version 7.0 software (Statsoft Inc., USA) segítségével végeztem el.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A rizs fehérje-összetétele és funkcionális tulajdonságai közötti viszony tanulmányozására 11 fajtaazonos liszt tartalékfehérje összetétele és a rizslisztből készített tészta reológiai tulajdonságai közötti összefüggéseket tanulmányoztam. Mind a fehérjék analitikai jellemzése mind reológiai tulajdonságok elemzésekor számos eddig csak a búzakutatásban alkalmazott, a rizs vizsgálata során eddig nem használt paramétert adaptáltam illetve dolgoztam ki. A fehérjék oldhatósága illetve SE-HPLC-vel elkülöníthető frakciói mennyiségi viszonyai alapján két új, a funkcionális tulajdonságokkal szoros összefüggést mutató paraméter, az oldhatósági%, illetve a polimer-fehérjék méreteloszlásának jellemzésére alkalmas UPP% került bevezetésre.

2. A rizslisztből készíthető tészta dagasztási tulajdonságait a búzánál sikerrel alkalmazott mikro z-arm mixeres technikával jellemeztem. Munkám során a rizslisztek dagasztási tulajdonságainak jellemzésére egy ún. hidratációs paramétert vezettem be, mely a tészta kialakulás előtt a hidratációs időt jelenti. A rizstészta dagasztási paramétereit és a fehérjefrakciók relatív mennyisége közötti viszony tanulmányozása során bizonyítottam, hogy - a búzatészta tulajdonságaival analóg módon – szoros összefüggés mutatható ki a lisztben található nagyméretű polimerek UPP%-ban kifejezett mennyisége és a rizstészta dagasztási tulajdonságai között.

3. A búza tartalékfehérjék rizs modellben történő vizsgálatához kidolgoztam egy, az izolált fehérjefrakcióknak a rizspolimerbe történő *in vitro* beépítésére alkalmas módszert.

A rizsliszt polimerjeinek részleges redukcióját követően, az adagolt fehérjék az oxidációs lépése során a rizsfehérje alapú polimer integráns részévé válnak, módosítva ezzel a rizstészta fehérje-összetételét, a polimer fehérjék méreteloszlását illetve dagasztási tulajdonságait.

4. A módszert olyan egyszerű addíciós kísérletekkel kiegészítve, ahol a redukciós/oxidációs lépés helyett a fehérjék egyszerű hozzáadagolása történik az alapliszthez, mód nyílt a fehérjék egyedi, illetve polimer-alegység formában megjelenő funkcionális tulajdonságainak összevetésére. A HMW és LMW glutenin alegységek beépítése a polimer szerkezetbe az addícióval ellentétes irányban változtatta meg a dagasztási paramétereket. Egyedi HMW glutenin alegységek (HMW-Bx6, Bx7 és By8) inkorporációja során mód nyílt a fehérje méretének és szerkezeti tulajdonságainak hatását összevetni a dagasztási paraméterek változásának mértékével. Az adagolás, illetve beépítés dagasztásra gyakorolt hatásával párhuzamosan a fehérjék polimer-kémiai tulajdonságait is vizsgálva megállapítottam az UPP% és a dagasztási jellemzők közötti kapcsolat fontos szerepét. A megnövekedett UPP% jobb dagasztási tulajdonságokat eredményezett.

5. A búza tartalékfehérjék a rizstészta dagasztási paramétereire gyakorolt hatásának tanulmányozására *in vivo* transzgénikus rizs vonalakat hoztam létre. A HMW-GS fehérjék közül, a minőségben betöltött meghatározó szerepe miatt, a Glu-1Dx5 HMW glutenin gént transzformáltam sikeresen rizsbe. A transzgén stabil öröklődése és expressziója több generációban is kimutatható volt. Az első generációs transzgénikus vonalakban expresszált HMW-1Dx5 fehérje mennyiségét az alkohol-oldható fehérjék 3-4%-ára becsülhető.

AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTÁSA

1. A rizs, mint modell rendszer alkalmas a búza tartalékfehérjéknek a technológiai paraméterek kialakításában betöltött szerepének a vizsgálatára. Az általunk kidolgozott módszer segítségével lehetővé vált különböző fehérjék hatásának tanulmányozása a rizstészta funkcionális tulajdonságaira.

2. A különböző búza tartalékfehérje frakciók beépítésére alkalmas rekonstrukciós technika új alternatívát jelent a lazított szerkezetű rizskenyér előállítására, másrészt hasznos *in vitro*

kísérleti bizonyíték arra, hogy az in vivo módszerekkel, genetikusan módosított, búza fehérje géneket tartalmazó rizs alkalmas lehet új típusú élelmiszerek előállítására. Az ilyen fehérjét tartalmazó rizsfajta olyan fogyasztói kör számára teremt lehetőséget sütőipari termékek fogyasztására, akik allergiás panaszai miatt eddig azokat nem élvezhették.

Folyóiratcikk idegen nyelvű folyóiratban

Oszvald M, Tömösközi S, Tamás L, Larroque O, Keresztényi E, Békés F. Characterization of Rice Proteins by Size Exclusion High Performance Liquid Chromatography and micro z-arm mixer. *Journal of Cereal Science*. 2007. doi:10.1016/j.jcs.2007.08.002.

Oszvald M, Tömösközi S, Jenes B, Békés F, Tamás L. Expression of the Dx5 High Molecular Weight glutenin subunit protein in transgenic rice. *Cereal Research Communication*. 2007. doi: 10.1556/CRC.35.2007.4.1.

Oszvald M, Tömösközi S, Tamás L, Békés F. Preliminary study to investigate the role of rice and added wheat protein in the mixing properties of different rice flours. *Acta Alimentaria*. 2007. (elfogadott)

Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent előadás összefoglaló

Oszvald M, Tömösközi S, Tamás L, Békés F. Functional studies of wheat storage proteins in model system, 5th European Young Cereal Scientist and Technologists Workshop, Turkey. 2006.06.04-07.

Oszvald M, Tömösközi S, Tamás L, Békés F. Functional studies of wheat storage proteins in model system. In: Lookhart, G.L., Ng, P.K.W. (Eds.), *Gluten Proteins 2006*. AACC International, Inc. St. Paul, pp.48-53.

Magyar nyelvű konferencia kiadványban megjelent előadás összefoglaló

Oszvald M, Tömösközi S, Tamás L, Békés F. Búza tartalékfehérjék vizsgálata modell rendszerben. In: XII. Növénynevelési Tudományos Napok, Bp. (Ed: Kertész Z.) Összefoglalók pp58. 2006.

Magyar nyelvű előadás

Oszvald M, Jenes B, Tömösközi S, Békés F, Tamás L. 1Dx5 gén expressziója transzgénikus rizsben. VII. Magyar Genetikai Kongresszus. Balatonfüred, 2007. ápr. 15-17.

Oszvald M, Jenes B, Tömösközi S, Tamás L. A fehérje összetétel megváltoztatása gabonafélék szemtermésében géntechnológiai módszerekkel. Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ Tudományos Napok, Gödöllő, 2003.

Jenes B, Pónyi T, Szilvási A, Oszvald M, Oreifig AS, Bedő Z, Tamás L. Gabonafélék minőségjavítása biotechnológiai módszerrel, különös tekintettel a rizsliszt minőségére. Mezőgazdasági Biológiatechnológiai Kutatóközpont Tudományos Napok, Gödöllő, 2001. nov.

Magyar nyelvű konferencián poszter:

Oszvald M, Tömösközi S, Tamás L, Békés F. Gabonafehérjék összetételének in vitro módosítása és hatásai a funkcionális tulajdonságokra. XIII. Növénynevelési Tudományos Napok, Bp. (Ed: Kiss J, Heszki L) Összefoglalók pp. 117. 2007.

Folyóiratcikk idegen nyelvű folyóiratban

Oszvald M, Kang TJ, Tömösközi S, Tamás C, Tamás L, Kim TG, Yang MS. Expression of a synthetic neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus fused with synthetic B subunit of Escherichia coli heat labile enterotoxin in rice endosperm *Molecular Biotechnology*. 2007. 35 (3): 215-223.

Oszvald M, Gárdonyi M, Tamás C, Tömösközi S, Jenes B, Tamás L. Characterisation of a wheat endosperm specific HMW glutenin promoter in an intron containing transformation cassette. *In vitro cellural and develp. (elfogadott)*.

Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent előadás összefoglaló

Oszvald M, Szilvási A, Jenes B, Tamás L. Effects of new endosperm specific promoters in cereals. 4th International Conference of PhD Studies (Eds: Laszlo Lehoczky and Laszlo Kalmar). University of Miskoc, Innovation and Technology Transfer Center, Hungary, Miskolc. pp 105-108. 2003.

Oszvald M, Gárdonyi M, Jenes B, Tömösközi S, Juhász A, Tamás L. Development and improvement of endosperm specific promoters for foreign protein expression in cereal seed. Proceeding of 10th International Wheat Genetic Symposium. Editors: N.E.Pogna, M. Romano, E.A. Pogna, G. Galterio. 2 volume: 899-901 .2003.

Oszvald M, Kang TJ, Kim TG, Tömösközi S, Jenes B, Tamás L, Yang MS. Expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in rice endosperm to produce edible vaccine. In: Proc. 2nd Conference on Bioreactor Technology (Eds. Sorvar S. and Toldi O.) FinMed, Finland, Saarisalke, pp 86-94. 2006.

Magyar nyelvű előadás

Tamás L, Oszvald M, Tamás C, Tömösközi S, Kang ZJ, Yang MS, Jenes B. Az egyszikű növények alternatív célú alkalmazása-ehető vakcina előállítása rizsben géntechnológiai módszerekkel. XIII. Növénynevelési Tudományos Napok, Bp. (Ed: Kiss J, Heszki L) Összefoglalók pp.23. 2007.

Oszvald M, Kang TJ, Jenes B, Kim TG, Tamás L, Yang MS. Vakcinák előállítása rizsben. Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Tudományos Napok, Gödöllő, 2006. nov.

Tamás L, Gárdonyi M, Oszvald M, Tamás C, Jenes B. Búza endospermium specifikus kiméra promóterek tanulmányozása tranziens rendszerben. In: XII. Növénynevelési Tudományos Napok, Bp. (Ed: Kertész Z.) Összefoglalók pp169. 2006.

Oszvald M, Szilvási A, Jenes B, Tömösközi S, Bedő Z, Tamás L. Új típusú endospermium specifikus promóterek létrehozása, hatásának tanulmányozása gabonanövényekben V. Magyar Genetikai Kongresszus, 2003.