

HÁROMFÁZISÚ MEGOSZLÁS ALKALMAZÁSA ÉLELMISZERFEHÉRJÉK VIZSGÁLATÁBAN

dr Szamos Jenő

**Budapest
2004**

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Dr. Fekete András, DSc
egyetemi tanár
Budapesti Corvinus Egyetem

Témavezető: Dr. Hajós Gyöngyi, DSc
egyetemi magántanár
Táplálkozástudományi Osztály
Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet

A doktori iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Doktori Tanács 2004. december 3. -ki határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Farkas József, MHAS, Budapesti Corvinus Egyetem

Tagjai

Salgó András, DSc, BMGE, Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

Sas Barnabás, CSc, OÉVI

Opponensek

Korány Kornél, CSc, ÉK Budapesti Corvinus Egyetem

Simonné Sarkadi Livia, CSc, BMGE, Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

Titkár

Maráz Anna, CSc, Budapesti Corvinus Egyetem

TARTALOMJEGYZÉK

I. BEVEZETÉS	1
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
II.1. Fehérjék frakcionálása kisózással és szerves oldószerekkel	3
II.2. Frakcionálás vizes kétfázisú rendszerekkel	5
II.3. Frakcionálás hőmérséklet-indukált fázissztválással	5
II.4. Frakcionálás háromfázisú extrahálással	6
II.5. Háromfázisú megoszlás	6
II.5.1. A HFM és alkalmazása enzimmtisztításra	6
II.5.2. A HFM alkalmazásának kiterjesztése	7
II.5.3. A HFM paramétereinek vizsgálata	8
II.5.3.1. A rendszer összetételének hatása	9
II.5.3.2. A pH szerepe	10
II.5.3.3. A moltömeg hatása	10
II.5.3.4. A fehérjekoncentráció és összetétel befolyása	10
II.5.3.5. A hőmérséklet befolyása	10
II.5.3.6. A fehérjék visszaoldódásából levonható következtetések	11
II.5.4. A HFM alkalmazhatósága ipari enzimek tisztítására	12
II.5.5. A HFM alkalmazása nagy tisztaságú tormaperoxidáz tisztítására	13
II.5.6. Különböző sók alkalmazása a HFM-ben	14
II.5.7. A HFM alkalmazástechnikai kiterjesztése	15
II.5.8. A határfelületi feszültség hatása	17
II.5.9. A határfelület vándorlásának vizsgálata	19
II.5.10. A szulfation kitüntetett szerepe a HFM-ben	20
II.5.11. DNS tisztítása háromfázisú megoszlással	22
II.5.12. Kvalitatív analízis a HFM közép rétegek mérése alapján	24
II.5.13. A fehérjeleválás mechanizmusa a HFM-ben	26
II.5.14. Fehérje jelenlétének detektálása HFM-el	27
II.5.15. HFM alkalmazása bioaktív réteg előállítására	27
II.5.16. A HFM legújabb alkalmazásai	29
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	31
III.1. Anyagok	31
III.1.1. A vizsgált minták	31

III.1.2. A fehérjék izolálásához használt vegyszerek	31
III.1.3. A háromfázisú megoszláshoz használt vegyszerek	31
III.1.4. Az elektroforézisekhez használt vegyszerek	31
III.2 Eszközök	32
III.3. Módszerek	33
III.3.1. Fehérjeoldatok készítése tisztított fehérjékből (ovalbumin, β -laktoglobulin)	33
III.3.2. Kioldható összes fehérje izolálása kukoricalisztból	33
III.3.3. Ponty szarkoplazma fehérjék izolálása	33
III.3.4. Mintakészítés elektroforézishez a HFM-mel kapott középrétegekből	34
III.3.5. Fehérjetartalom meghatározása	35
III.3.6. HFM rendszerek készítése ovalbumin és β -laktoglobulin vizsgálatához	36
III.3.7. Kukorica- és pontyfehérjék vizsgálata háromfázisú rendszerekben	36
III.3.8. A <i>terc</i> -butil-alkoholos fázis spektrofotométeres vizsgálata	37
III.3.9. Nem egyensúlyi pH-grádiens elektroforézis (NEpHGE) lemez formátumban	37
III.3.10. NEpHGE-SDS-elektroforézis	37
III.3.11. A fehérjék detektálása	38
IV. EREDMÉNYEK	39
IV.1. Ovalbumin és β -laktoglobulin megoszlása háromfázisú rendszerekben	39
IV.2. A mechanikai energia szerepe a háromfázisú megoszlásban	45
IV.3. Ponty szarkoplazma fehérjék HFM-je, és pH-gradiens elektroforézise	47
IV.4. A kukoricafehérjék HFM-je, és nem egyensúlyi pH gradiens elektroforézise	54
IV.5. Fehérjeátvitel és a háromfázisú megoszlás megismételhetősége	58
V. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	64
VI. ÖSSZEFOGLALÁS	69
SUMMARY	70
ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	71
VII. MELLÉKLETEK	73
M.1. Irodalomjegyzék	73
M.2. További mellékletek	78
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	82

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AEX: A extraháló puffer

APS: ammónium-perszulfát 10 %-os oldata

BPB: bromophenol blue, brómfenolkék

BSA: bovin serum albumin, marha szérum albumin

CHAPS: (3-[(3-kolamido-propil)-dimetilammonio]-propán-szulfát

DEAE: dietil-amino-etil

DTT: ditio-treitol

FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography

GLS: 10 % glicerint tartalmazó Lysis Solution

G 250: Coomassie Brilliant Blue G 250 festék

γ : határfelületi feszültség, mN/m

HIC: Hydrophobic Interaction Chromatography

HFM: háromfázisú megoszlás

HPLC: High Pressure Liquid Chromatography

IEF: izoelektromos fókuszálás

IEX: Ion Exchange Chromatography

NEpHGE: Nonequilibrium pH Gradient Electrophoresis

OVA: ovalbumin

PCR: Polymerase Chain Reaction

PEG: polietilén-glikol

P %: a harmadik fázist alkotó fehérje mennyisége a kiindulási fehérje százalékában

R_f : Relative Front, a poliakrilamid gélben a fehérjesáv helyzetére utaló viszonyszám

rpm: round per minute

RZ: Reinheitszahl, a peroxidáz tisztaságát jelző szám

SDS: Sodium dodecyl sulfate, nátrium-dodecil-szulfát

TCA: Trichloroacetic acid, triklór-ecetsav

TEMED: N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin

TPP: Three-Phase Partitioning

I. BEVEZETÉS

Az élelmiszerek vizsgálata az élelmiszertudomány gyorsan fejlődő ágát képezi, magába foglalva a nyersanyagtól a feldolgozott élelmiszerig a táplálékban egymással kölcsönösen helyettesíthető (izodinámia) fehérjék, szénhidrátok és lipidek, valamint a minimum törvény értelmében egymással nem helyettesíthető esszenciális zsírsavak, esszenciális aminosavak, ásványi sók, vitaminok és nyomelemek analízisét. Az élelmiszer feldolgozás és előállítás problémáinak megoldásán túl, napjainkban az élelmiszer nyersanyagok összetételének meghatározása fokozott jelentőségre tett szert, amit a genetikailag módosított növények elterjedése, a növényeket érő stressz, továbbá az élelmiszer azonosítás és eredet bizonyításának igénye indokol.

Az élelmiszerfehérjék vizsgálatának nagyszámú specifikus és általános módszere ismert, amelyek között elsősorban az elektroforetikus (SDS, IEF, és kétdimenziós) és a kromatográfiás (IEX, HIC, FPLC, HPLC) eljárások említhetők. Ahhoz, hogy ezeket komplex fehérjekeverékek vizsgálatára alkalmazzassuk, rendszerint előfrakcionálási lépésekre van szükség.

Az előzetes frakcionálás igénye már régen, az egyes enzimek tiszta állapotban való kinyerésekor jelentkezett, és ehhez szerves oldószereket, neutrális sókkal való kisózást, kromatográfiás eljárásokat, vizes kétfázisú rendszerben történő megoszlást alkalmaztak. Abban az esetben, ha nem egyetlen, vagy néhány fehérje izolálása a cél, hanem az adott élelmiszerből, például növényi nyersanyagból valamilyen eljárással kioldható összes fehérje kvalitatív illetve kvantitatív jellemzése, akkor többféle oldószert alkalmazó frakcionálásra van szükség.

A **háromfázisú megoszlás** (HFM), illetve Three Phase Partitioning (TPP) egy olyan, több szempontból is különleges frakcionáló lépés, amely hatásában egyesíti a neutrális sóval végzett kisózást és a szerves oldószeres frakcionálást. A fehérjék ammónium-szulfátos kisózását *terc*-butil-alkohol jelenlétében végezve, a kivált fehérjék a szerves-vizes határfelületen korong alakú, harmadik fázisnak elnevezett középréteget képeznek. Az egyszerű kisózással összehasonlítva a háromfázisú megoszlás további előnye, hogy az apoláris szennyezők a szerves fázisban, a polárisak a vizes fázisban maradnak.

A háromfázisú megoszlás kezdetben ipari enzimek tisztításában hozott jelentős eredményeket, mivel az enzimek többségénél a tisztítás korai stádiumában nagymennyiségű szennyező anyag leválását eredményezte, a specifikus aktivitás egyidejű növekedése mellett. A korai alkalmazásokban a frakcionálást az ammónium-szulfát relatív telítettségének növelésével irányították.

A megoszlásban szerepet játszó kölcsönhatások vizsgálatával foglalkozó első közleményt 1989-ben publikálták (Pike és Dennison). Azóta több munka is foglalkozott a megoszlás mechanizmusával, amelynek azonban több részlete jelenleg is tisztázatlan, a kölcsönhatást

befolyásoló paraméterek nagy száma miatt. A kivált fehérje mennyisége és a fehérjét nem tartalmazó, azonos összetételű kétfázisú rendszer, mint vonatkoztatási rendszer határfelületi feszültsége közötti korrelációt 1995-ben írták le (Szamos és Kiss).

A háromfázisú-megoszlás húsfhérjék vizsgálatára alkalmas változatát 1997-ben publikálták (Szamos et al.), amelynek segítségével a határfelületen levált fehérjekorong centrifugális erőterben mérhető "kompresszibilitás"-ából következtetni lehet a fehérjekeverék eredetére.

A háromfázisú-rendszerben a fehérjéken kívül nagyszámú, különböző minőségű anyag mutat jellegzetes viselkedést, így a DNS, a különböző polimerek, és a poliszacharidok. Egyes alkalmazásokban négyfázisú rendszerek kialakulását is meg lehetett figyelni.

Az értekezés célkitűzése az eredetileg fehérjék tisztítására és koncentrálására alkalmazott háromfázisú megoszlásból egy élelmiszeranalitikai, frakcionáló módszer kidolgozása. Korábban leírtuk a háromfázisú megoszlás nagyobb mintaszám vizsgálatára alkalmas változatát (Szamos et al. 1998a), de az általános alkalmazhatóság feltételeit akkor nem vizsgáltuk.

Először ovalbumin, illetve β -laktoglobulin háromfázisú megoszlását tanulmányoztam különböző összetételű rendszerekben. A két fehérje viselkedését a harmadik fázisban levált fehérje mennyisége, és a harmadik fázis centrifugális erőterben mérhető kompresszibilitása alapján hasonlítottam össze. A kísérleteket széles tartományban változó összetételű és fehérjekicsapó erősségű megosztó rendszerekkel, és 2-10 mg/ml fehérjekoncentráció tartományban végeztem.

A második részben a rendszerrel közölt mechanikai energia hatását vizsgáltam busa, csirke, marha és sertés húslevek háromfázisú megoszlására.

A harmadik részben a HFM növényi és állati fehérjék vizsgálatára alkalmas analitikai változatának kidolgozását tűztem ki célul. Különböző kukoricafajták összes kioldható fehérjéinek, illetve a tükrös tájponty egyetlen lépésben kinyert szarkoplazma fehérjéinek háromfázisú megoszlását közvetlenül mérhető rendszerekben valósítottam meg, és az újraoldott harmadik fázis fehérjéit nem egyensúlyi pH gradiens elektroforézissel választottam szét.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II. 1. Fehérjék frakcionálása kisózással és szerves oldószerekkel

A háromfázisú megoszlás visszavezethető mind a kisózásos, mind a szerves oldószeres fehérjefrakcionálásra, ezért célszerű e két eljárás elvét és jellegzetességeit áttekinteni (Foster et al. 1976, Scopes 1982, Shih et al. 1992).

Egy fehérje oldhatóságát valamely oldószerben három fő tényező határozza meg:

- a felületi töltéssűrűség és töltés eloszlás
- a hidratáció mértéke
- a nem fehérje komponensek, foszfát, szénhidrát és lipid jelenléte.

Ezen kívül szerepet játszik a hidrofíl és hidrofób csoportok aránya, eloszlása is. A hidrofób csoportok nagy számban fordulnak elő a fehérjék belsejében, de kisebb gyakorisággal a molekula felszínén is megtalálhatók, ami jelentős mértékben meghatározza viselkedésüket különböző oldatokban. Vizes oldatokban az oldott fehérjék viselkedése befolyásolható az oldat pH értékének, ionerősségének, hőmérsékletének változtatásával, szerves oldószerek hozzáadásával, esetleg ezek együttes alkalmazásával.

A kisózás során nagy mennyiségű só hozzáadására csökken a fehérjeoldhatóság és a kölcsönhatásban döntő szerepet játszik a fehérje hidrofób jellege. Vizes oldatban a fehérjék felületi apoláris oldalláncai (Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Met, Val) körül a vízmolekulák mintegy "befagynak". A só koncentrációjának növekedésével az ionok megbontják ezt a rendezett vízréteget és eltávolítják azt a hidrofób oldallancokról, amelyek kölcsönhatási valószínűsége így megnő, és ha a vízelvonás mértéke elegendően nagy, bekövetkezik az aggregálódás. A nagyobb számú vagy méretű hidrofób foltot tartalmazó fehérjék gyorsabban aggregálódnak, míg a kevés felületi apoláris csoportot tartalmazók viszonylag nagyobb só töménység mellett is oldatban maradnak. A hidrofób kölcsönhatás nem specifikus, ezért több különböző fehérje oldatában az egyes fehérjék különböző mértékben befolyásolják egymás oldhatóságát, és a koaggregáció nagymértékű lehet.

Tiszta fehérje és egy adott só esetében a fehérjeoldhatóság és a só koncentrációja közötti félempirikus összefüggést a Cohn egyenlet fejezi ki (1925).

$$\log S = \beta - K_s I \quad (1)$$

Ahol S a fehérje oldhatósága, I az ionerősség, β a fehérje típusától, a pH-tól és a hőmérséklettől függő állandó, K_s pedig a kisózási állandó, amely lényegében független a pH-tól és a

hőmérséklettől. Ez az egyenlet nemcsak a fehérjékre érvényes, hanem az elektrolitokkal kisózható szerves anyagokra és oldott gázokra is.

Fehérjék keverékét tartalmazó oldatban a fehérjekiválás a koprecipitáció miatt nem követi ezt a szabályt. A só koncentrációjának növekedésével a különböző fehérjék különböző ionerősségnél kezdenek kicsapódni, ezért az oldott és a szilárd fázis fehérje összetétele folyamatosan változik. Egy fehérje oldhatóságát az oldatban lévő többi fehérje jelenléte csökkenti. Jóllehet a kisózást a hidrofób kölcsönhatás irányítja, az oldhatóság a pH állításával is módosítható. A töltések eltávolításával a felület polaritása és ezzel a fehérje oldhatósága csökken, így a fehérje izoelektromos pontján aggregálódik a legkönnyebben. A kisózást magasabb hőmérsékleten végezve a fehérjék oldhatósága csökken. A kisózásra leggyakrabban használt ammónium-szulfát oldhatósága a 0-30°C hőmérséklettartományban alig változik és a kivált fehérjét hosszú ideig képes stabilizálni.

Vizes fehérjeoldathoz szerves oldószert, például acetont vagy etanolt adva a dielektromos állandó csökkenése következtében (Coulomb törvény) fehérjekicsapódás történik. Az oldószer dielektromos állandójának nagymértékű csökkenésével együtt jár az oldott molekulák disszociációjának, így a fehérjék oldhatóságának csökkenése. A hidrofób oldalláncok köré rendeződött vízmolekulákat a szerves oldószer molekulái kiszorítják, így ezeknek a felületelemeknek az "oldhatósága" viszonylag nagyobb lesz, de a vízben oldható fehérjék oldhatósága csökken. Az oldat pH-ját a fehérje izoelektromos pontjára állítva kevesebb szerves oldószer elegendő a kicsapáshoz. Hasonlóképpen, a szükséges szerves oldószer mennyisége fordítva arányos a fehérje molekulatömegével. Többféle fehérjét tartalmazó oldatban a nagy molekulatömegű fehérjék előbb aggregálódnak, mivel nagyobb a valószínűsége annak, hogy azonos töltésmintázatú másik fehérjével találkozzanak. A szerves oldószeres fehérjefrakcionálás hőmérséklete kritikus, mivel +10 °C felett fokozott denaturálódással kell számolni, aminek az oka az intramolekuláris hidrofób kölcsönhatásokban keresendő. Alacsony hőmérsékleten a fehérjemolekula nem rendelkezik konformációs flexibilitással, így a szerves oldószer molekulák nem tudnak behatolni a belső szerkezetbe, és nem destabilizálják azt. Magasabb hőmérsékleten azonban a kis szerves molekulák megbontják a felületet és hidrofób kölcsönhatással kapcsolódnak a belső aminosav oldalláncokhoz, mint Leu, Ile, Tyr, Phe, Val stb. Magasabb hőmérsékleten nagyobb a belső hidrofób kölcsönhatások hozzájárulása a molekula integritásának fenntartásához tehát gyengülésük gyors, autokatalitikus denaturációra vezet. A fehérjefrakcionálásra leggyakrabban használt két szerves oldószer az acetone és az etanol. Az előbbi kevésbé denaturáló hatású, - részben azért - mert összehasonlítható mértékű kicsapás eléréséhez, ebből kisebb mennyiség is elegendő.

II. 2. Frakcionálás vizes kétfázisú rendszerekkel

Labilis enzimek és fehérjék extrahálására alkalmas a polietilén-glikolt (PEG) és dextránt tartalmazó kétfázisú folyadék-folyadék extrakciós rendszer. A fázisok víztartalma egyenként több mint 75 %, és vagy dextránt, vagy polietilén-glikolt tartalmaznak. A PEG – dextrán rendszerrel például *Klebsiella pneumoniae* pullulanáz enzimre, 91 %-os hozamot és kétszeres tisztulást értek el. Hasonló és szélesebb körben alkalmazott a PEG - kálium-foszfát rendszer. A vizes, kétfázisú módszerek hátránya, hogy a PEG eltávolítása nem olyan egyszerű, mint egy sóé, vagy szerves oldószeré (Bailey, Ollis 1987).

A legújabb alkalmazásokban dextrán helyett nem ionos detergenset, például Triton X-114-et, vagy dodecil-maltozidot, alkalmaznak a vizes kétfázisú frakcionálásokhoz. A vízben oldható fehérjék a polimer fázisban, míg a membrán fehérjék a detergens fázisban dúsulnak, ezáltal jelentős előfrakcionálás érhető el. Az eljárás kis térfogatban is alkalmazható. A pH változtatásával, különböző összetételű pufferek alkalmazásával és segédanyagok, például SDS jelenlétében a megoszlási együttható (a felső illetve az alsó vizes fázisokban oldott összes fehérje mennyiségének aránya) változik, így az eljárás a céltól függően optimalizálható (Everberg et al., 2004).

II. 3. Frakcionálás hőmérséklet-indukált fázisszétválással

A Triton X-114 nem ionos detergens hőmérsékletemelkedés hatására bekövetkező fázis szétválását először Bordier írta le 1981-ben. Alacsony hőmérsékleten vizes oldatban a Triton X-114 micelláris oldatot hoz létre, de 20°C felett két egyensúlyi fázis képeződik. Sanchez-Ferrer et al. (1989) olyan új, a Triton X-114 fázisszétválásán alapuló eljárást írtak le, amelynek segítségével nagyon jó hozammal tudták tisztítani a szőlő polifenoloxidázt, és az enzimet 100 %-ban sikerült elválasztani a klorofilltól és a fenoloktól. Andersen és Moller (1998) kettős Triton X-114 fázismegoszlással növényi citokrómokat tisztítottak és eltávolították a zöld növényi pigmenteket. Az egymást követő két megoszlást, foszfát-, majd borát pufferrel végezték, és nagyobb hozamot értek el, mint a hasonló célra alkalmazott oszlopkromatográfias módszerekkel, nem említve a fázismegoszlásos módszer rendkívüli gyorsaságát, amelynek eredményeképpen a tisztítás 3-4 óra alatt elvégezhető. A Triton X-114 hőmérséklet-indukált fázisszétválásával elkülöníthetők a hidrofil és hidrofób fehérjék, de a körülmények – az alkalmazott puffer komponensei és pH-ja, a detergens koncentrációja, a fehérjék szerkezete és hidrofób jellege – döntő mértékben befolyásolják a felső és alsó fázisban található fehérjék mennyiségét. Más szóval, egy adott tisztítási feladat megvalósítása előzetes kísérleteket igényel, de a kikísérletezett módszer kis időigénye ezt a kezdeti többletmunkát az alkalmazásokban messzemenően ellensúlyozza.

II. 4. Frakcionálás háromfázisú extrahálással

A háromfázisú extrahálás, lényegét tekintve három, egymással nem elegyedő folyadékból álló extraháló rendszer alkalmazását jelenti, amellyel különböző iparágakban alkalmazott festékek, ásványolaj származékok, zsírok, lanolin, trioktil-amin, és különböző szerves vegyületosztályok is elválaszthatók és analizálhatók. Például 3M-os nátrium-klorid oldat, acetonitril és hexán folyadékfázisokkal, a pH megfelelő értékekre állításával elválaszthatók egymástól az egy- illetve háromértékű fenolok, a C₁-C₄, illetve C₅-C₁₀ aminok, olajok, aromás vegyületek, festékek, továbbá mennyiségük kvantitatívan meghatározható (Frankovszkij et al. 1989).

II. 5. Háromfázisú megoszlás

II.5.1. A HFM és alkalmazása enzimmtisztításra

A háromfázisú megoszlást, mint új enzimmtisztítási lépést, 1984-ben publikálták először Odegaard és munkatársai, akik a *Trichoderma reesei* celluláz multienzim komplex tagjainak izolálását, tisztítását és jellemzését végezték. A képződő celluláz enzim relatív mennyisége bizonytalan mértékben tolódhat el, a különböző növekedési szubsztrátok és feltételek változásával. A szerzők ezért két új eljárást dolgoztak ki, mégpedig a **háromfázisú megoszlást (HFM)**, amely koncentrálja a fehérjéket és konzerválja az összes aktivitást, valamint a hidrofób kölcsönhatási kromatográfiát (HIC).

Az első meghatározás szerint a háromfázisú megoszlás úgy teszi lehetővé fehérjék nyers oldatokból való tisztítását, hogy az ammónium-szulfát és a *terc*-butil-alkohol együttes alkalmazásával "kikényszeríti" a határfelületre az enzimet a vizes oldatból. A *terc*-butil-alkohol a vízzel minden arányban elegyedik, azonban 20-40 % relatív telítettségig ammónium-szulfátot adva a rendszerhez, egy kisebb sűrűségű, külön réteget képez szobahőmérsékleten. Az oldhatatlanná vált cellulázok külön fázist képeztek az alsó vizes, és a kisebb sűrűségű felső, *terc*-butil-alkoholos fázis között. Ezt a harmadik fázist, interfázist, vagy középréteget, kisebb sűrűségű centrifugálással könnyen ki tudták alakítani. A szerves fázis extrahált színes szennyező anyagokat, fenol- és tanninszármazékokat, valamint konjugátumokat tartalmazott. A szokásos szerves oldószeres kicsapás gyakorlatától eltérően a szerzők nem tartották indokoltnak a hidegben való munkát, vagy a hőmérséklet hirtelen csökkentését. A háromfázisú módszer, a kívánt fehérjéket és enzimeket koncentrálva, megőrizte azok teljes aktivitását szobahőmérsékleten. Korábban már bizonyították, hogy a *terc*-butil-alkohol az enzimek aktivitását megőrzi, sőt, gyakran többszörösére növeli azt (pl. a bakteriális β -glükuronidázét), ellentétben a kisebb szénatom számú alkoholokkal (Tan, Lovrien, 1972).

Ebben az első alkalmazásban a szerzők 20 térfogatszázalékig adagoltak *terc*-butil-alkoholt, az enzimeket és a szennyezők elegyét tartalmazó 40 % relatív telítésű ammónium-szulfát oldathoz, intenzív keverés közben. Ezen a ponton nem tapasztaltak kicsapódást. Az ammónium-szulfát koncentrációját az első adaggal megegyező mennyiségű sóval növelve, azonban bőséges fehérje kicsapódás történt. Az elegyet 15 perc után 1000xg-vel centrifugálva három, jól elkülönült fázist kaptak.

A háromfázisú módszer elsősorban koncentráló, továbbá tisztító lépés, amelynek további előnye, hogy az utána végzett liofilezéssel már csak minimális mennyiségű vizet kell eltávolítani. A pH 2-8 tartományban szobahőmérsékleten végzett megoszlásos kísérletek eredménye szerint, a pH 3-7 tartományon kívül az összes celluláz fajlagos aktivitása legalább 20 %-kal csökkent. A pH 3-7 tartományban viszont, közelítőleg az összes celluláz aktivitás megőrződött. A HFM többször ismételhető, kiváló fehérje és aktivitás hozamokat eredményező lépés. A leghasznosabbnak azonban a nem kívánatos pigmentek eltávolításában bizonyult, a különböző enzimek károsítása nélkül.

II. 5. 2. A HFM alkalmazásának kiterjesztése

A háromfázisú megoszlás 18 enzimre és fehérjére kiterjedő alkalmazásáról számoltak be Lovrien és munkatársa (1987). Az enzimek többségénél az apoláris pigmentek *terc*-butil-alkoholos fázisba kerülése miatt jelentős tisztulást tapasztaltak, és a teljes aktivitást visszanyerték, a fajlagos aktivitás növekedése mellett. Fontos eredményük technológiai szempontból, hogy az eljárás során grammnyi mennyiségű kiindulási anyag kis térfogatban, szobahőmérsékleten feldolgozható.

A megoszlás protokollja eltér a celluláz enzimre leírttól, amelynek főbb lépéseit a későbbi eredményekre figyelemmel érdemes itt ismertetni:

1. a nyers fehérjeoldat pH értékének beállítása pH 2-10 közé (1-5 perc)
2. ammónium-szulfát adagolása az oldathoz a kívánt koncentrációig (1 perc)
3. *terc*-butil-alkohol hozzáadása 1:1 térfogatarányban (2 perc),
4. centrifugálás 200 rpm,(2-5 perc)
5. a *terc*-butil-alkoholos fázis eltávolítása után, a középső enzim/fehérje réteg visszanyerése (2 perc).

A kísérletek során a harmadik fázis gyakran gél állapotú volt, amely az enzimen kívül *terc*-butil-alkoholt, vizet és sókat tartalmazott. Puffer oldatok hozzáadására ezek a gélek rendszerint visszaoldódtak. Azt találták, hogy nem minden enzim jut ki a vizes fázisból, ezért az úgynevezett egy-lépéses, azaz egy adott összetétellel jellemezhető HFM helyett ilyenkor jó eredménnyel alkalmazták a kétlépéses HFM-et, amit vagy további ammónium-szulfátadagolással, vagy a pH eltolásával értek el. Az utóbbi esetben rendszerint létezett egy "ablak", vagy optimális ammónium-

szulfát koncentráció tartomány, amely alatt a kívánt enzim nem jut a harmadik fázisba, amely felett viszont, túl sok szennyező polimer jut a középrétegbe.

A szerzők különböző eredetű nyers celluláz, torma peroxidáz, pepszin, proteáz *B. subtilis*, α -amiláz, invertáz, β -galaktozidáz, β -glükózidáz, amiloglükózidáz, lipáz, Bowman-Birk szója tripszin inhibitor háromfázisú megoszlását vizsgálták. Az összes aktivitás legalább 80 %-át vissza tudták nyerni, miközben a kívánt enzim fajlagos aktivitása 2-3-szorosára (pl. torma peroxidáz), a β -glükózidáz esetében 10-20-szorosára növekedett. A fajlagos aktivitás nem mindig a szennyező fehérjék, hanem gyakran az enzim inhibitorok eltávolítása miatt nőtt.

A háromfázisú megoszlást befolyásoló paraméterek között említik a szerzők a makromolekulák töltését, a fehérjék izoelektromos pontját és az optimális pH-t. Nem volt ismert, hogy a fehérjék miért flotálnak a megoszlás folyamán a középső rétegbe, és miért ülepednek a kisózás folyamán. A jelenség valószínű okaként a *terc*-butil-alkohol és a só anionjának fehérjékhez való kapcsolódását és az oldószer kizáródását jelölték meg.

II. 5. 3. A HFM paramétereinek vizsgálata

A megoszlást befolyásoló paraméterek közelebbi vizsgálatáról Pike és Dennison közöltek publikációt 1989-ben. A standard fehérjéket, - BSA, citokróm C, γ -globulin, hemoglobin, lizozim, mioglobin és ovalbumin - nem enzimaktivitásuk, hanem izoelektromos pontjuk (pI), pH 4,6-11,1, illetve molekulatömegük 14300-160000 Da alapján választották ki. A következő tényezőket tanulmányozták:

- az ammónium-szulfát és a *terc*-butil-alkohol arányának hatása,
- a pH és az izoelektromos pont viszonya,
- a fehérje molekulatömege,
- a fehérje koncentrációja,
- a hőmérséklet.

Az elválasztást SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel követték.

A fehérjeminták koncentrációja 0,5 mg/ml volt az adott pH-jú 0,01M pufferben. A hozzáadott *terc*-butil-alkohol mennyisége a térfogat 30 %-a volt. Az ammónium-szulfátot szilárd állapotban adták az oldathoz, és erőteljes keveréssel oldották fel. Az oldatok hőmérséklete 25°C volt, kivéve, amikor a hő hatását tanulmányozták. A rendszer centrifugálása után a három fázist külön gyűjtötték. A vizes fázis A_{280} értékét azonos módon készített, de fehérjét nem tartalmazó oldattal szemben mérték. A harmadik fázist az eredetivel egyező térfogatú 0,01M foszfát pufferben (pH 7,0) újra oldották. A harmadik fázisban kivált fehérje mennyiségét az alábbi összefüggéssel %-ban adták meg:

$$\text{Fehérje (\%)} = \frac{A - [B(F / I)]}{A} * 100 \quad (2)$$

Ahol A = a kiindulási fehérjeoldat elnyelése 280 nm-en

B = a megoszlás utáni fehérjeoldat elnyelése 280 nm-en

F = a megoszlás utáni fehérjeoldat térfogata ml-ben

I = a kiindulási fehérjeoldat térfogata ml-ben

(azzal a feltevéssel, hogy a kísérletsorozatban nem volt olyan fehérje, amelyik bejutott volna a *terc*-butil-alkoholos fázisba, tehát annak fehérjetartalmát nem mérték).

A tesztfehérjék hidrofóbítását fenil-Sepharose oszlopon határozták meg csökkenő koncentrációjú ammónium-szulfát és növekvő koncentrációjú etilén-glikol szimultán gradiens elúciós kromatográfiával.

II. 5. 3. 1. A rendszer összetételének hatása

A kétfázisú rendszer kialakításához szükséges só és *terc*-butil-alkohol arányának meghatározását BSA-val és ovalbuminnal 50 térfogat% *terc*-butil-alkohol és 50 m/V % ammónium-szulfát tartományban vizsgálták, és azt találták, hogy reciprok összefüggés van a só és a *terc*-butil-alkohol mennyisége között. A fehérje jelenlétében több ammónium-szulfátra volt szükség a fázisok éles elválásához, mint fehérje távollétében. Nem találtak olyan kitüntetett arányt, amely előnyösebb lett volna a többinél, de a legkisebb alkalmazott *terc*-butil-alkohol térfogat% mellett jutott a legkevesebb fehérje a harmadik fázisba.

Az oldatok sűrűségét meghatározva azt találták, hogy a fázisok sűrűsége összetett módon függ a nominális ammónium-szulfát koncentrációtól, miközben az egyszerű ammónium-szulfát oldatok sűrűsége lineárisan nő a só koncentrációjával. A megoszlásban résztvevő fehérjék a vizes fázison flotálnak, míg a hagyományos ammónium-szulfátos kisózásban, ugyanolyan sűrűségnél szedimentálódnak. Például 2 mg/ml marha szérum albumin pH = 4,8-as pufferben 30 m/V % ammónium-szulfátban szedimentálódik, de a HFM-ben kicsapódik és a vizes fázis felszínén flotál 25 m/V % nominális ammónium-szulfát koncentrációnál (aminek a sűrűsége azonos a 30 % os ammónium-szulfátéval). Ennél is nagyobb eltérést találtak azonos koncentrációjú ovalbuminra, ami 60 m/V % ammónium-szulfátban szedimentálódik, de 30 % nominális ammónium-szulfát koncentráción kicsapódva harmadik fázist képez.

II. 5. 3. 2. A pH szerepe

A pH hatását több pH-értéken vizsgálták valamennyi tesztfehérjével, a mioglobin kivételével, ami a megoszlás folyamatában teljesen denaturálódott. A fehérjéket egyenként oldották a megfelelő pH-jú 0,01M pufferben, majd a megoszlást olyan só koncentráción végezték, ami a fehérje mennyiségének 90 %-át a harmadik fázisba juttatta az optimális pH értéken.. A HFM hatékonyságának két indexét mérték: a harmadik fázisba jutott fehérje mennyiségét és ennek oldhatóságát. Azt találták, hogy a fehérjék alacsony pH értéken jutnak legkönnyebben a harmadik fázisba, bár a lizozim és hemoglobin esetében a kicsapódás gyakorlatilag független a pH-tól. A kivált fehérje oldhatósága izoelektromos pontján végzett megoszlásakor volt a legnagyobb. Ez azt jelenti, hogy a fehérje kevésbé denaturálódik, ha a folyamat során semleges töltésű. Az egyetlen kvaterner struktúrájú fehérje, a hemoglobin, teljes mértékben oldhatatlan volt a megoszlás után. Hasonlóképpen a mioglobin is denaturálódik és elveszti a nem kovalens kötésű hem-et.

II. 5. 3. 3. A moltömeg hatása

A molekulatömeg megoszlásra kifejtett hatásának tanulmányozására mérték a teszt fehérjék legalább 90 %-át kicsapó ammónium-szulfát mennyiségét. A fehérje molekulatömege és a kicsapásához szükséges ammónium-szulfát mennyisége között, reciprok összefüggést találtak. A hatás erősödik a kis moltömegű tartományban, ahol arányosan több só szükséges a fehérje kicsapódásához. Ez a viselkedés azonban nem csupán a molekulatömegre vezethető vissza, hanem a hidrofil jellegre is, mint például a citokróm C esetében.

II. 5. 3. 4. A fehérjekoncentráció és összetétel befolyása

A fehérjekoncentráció hatását a folyamatra három fehérje esetében (γ -globulin, BSA, és ovalbumin), három különböző pH értéken (5,7, 4,8 és 4,6), 30 térfogat% *terc*-butil-alkohol jelenlétében vizsgálták. Azt találták, hogy a megoszlás során kivált fehérje mennyisége, eltér a hagyományos kisózással kicsapható értéktől, ahol egy fehérjének egyetlen, a só koncentrációjától függő oldhatósági görbéje van. A megoszlásban egy adott fehérje több oldhatósági görbével rendelkezik, amelyek mindegyikét a fehérje kezdeti koncentrációja határozza meg. Kis ammónium-szulfát- és nagy fehérjekoncentráció tejszerű oldatok képződésére vezet, mielőtt a rendszer fázisokra válna szét. Az oldatok 10 % szacharóz hozzáadására feltisztultak, de fázissztétválás nem történt.

II. 5. 3. 5. A hőmérséklet befolyása

A hőmérséklet hatását pH 4,8 értéken és 30 m/V % ammónium-szulfát tartalom mellett BSA-val tanulmányozták. Megállapították, hogy a hőmérsékletnek a megoszlásra kifejtett hatása

csekély, és nem befolyásolja lényegesen sem a harmadik fázisba jutó fehérje mennyiségét, sem annak oldhatóságát. A fehérje visszaoldódása azonban alacsonyabb hőmérsékleten gyorsabb, mint 37°C -on. A megoszlás fehérje konformációra gyakorolt hatása nem jelentős, amit a cirkuláris dikroizmus (CD) spektrumban észlelhető eltolódások alapján vizsgáltak. Az egyetlen nyilvánvaló növekedést az α -helikális tartalomban észlelték, ami arra utal, -legalábbis a vizsgált fehérjék esetében - hogy a *terc*-butil-alkohol önmagában nem denaturáló hatású.

A HIC oszlopról eluált fehérjék sorrendje, ami a felületi hidrofobitás adott elrendezés szerint mért változásának felel meg, nem bizonyult szignifikáns faktornak a folyamat értékelése szempontjából, mivel nem korrelált a harmadik fázisba jutó fehérje mennyiségével.

II. 5. 3. 6. A fehérjék visszaoldódásából levonható következtetések

A HFM folyamat után, jól oldható standard fehérjékkel (egyenként 0,5 mg/ml koncentráció) készített fehérjeelegy komponenseinek viselkedését SDS-elektroforézissel tanulmányozták a szerzők. Három, egyenként 20 % és 30 % ammónium-szulfát koncentrációjú pH = 7, illetve egy 40 % só koncentrációjú, pH = 11,1 rendszerben követték a fehérjekomponensek megoszlását. Az utóbbi elegy a citokróm C kivételével minden fehérjét kicsapott. A legtöbb BSA és γ -globulin a 30 %-os rendszerben jutott a harmadik fázisba, de a várakozással ellentétben, szignifikáns mennyiségű lizozim koprecipitációját is tapasztalták.

Rámutattak arra, hogy ebben a kísérletben a fehérjék koncentrációja adott volt. Ismeretlen fehérje keverék megoszlása folyamán, amikor a komponensek koncentrációja nem ismert, azok mennyisége befolyásolhatja kicsapódásukat.

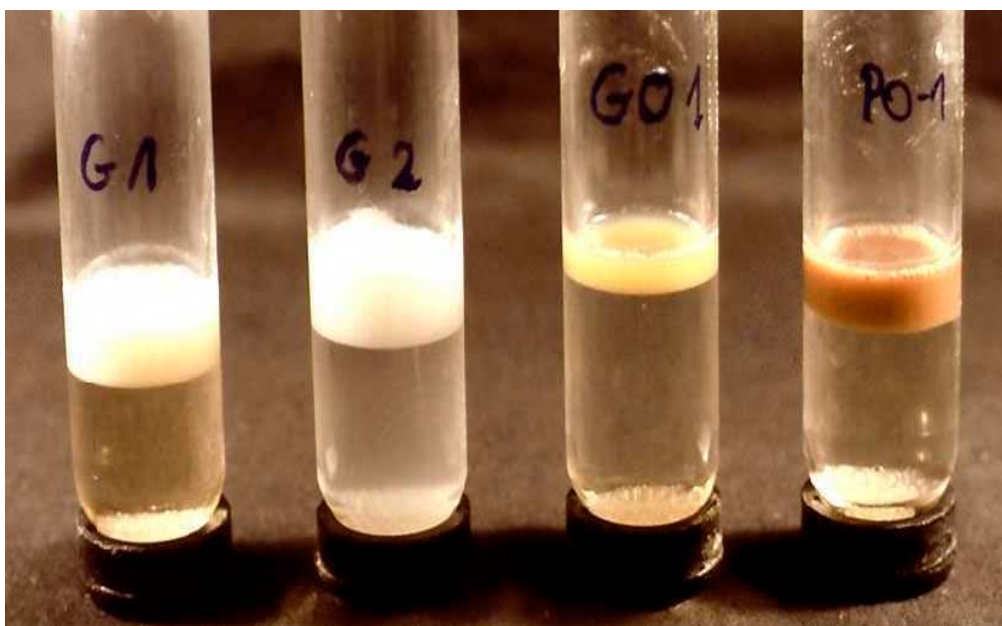
Eredményeik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a fehérjék legkönnyebben az izoelektromos pontjukon válnak ki a harmadik fázisba, de a kivált fehérjék visszaoldhatósága akkor a legnagyobb, ha a HFM a pI feletti pH értéken történik. A só és a *terc*-butil-alkohol hatása hasonló, amennyiben az egyik többlete kompenzálja a másik csökkentett mennyiségét. A fehérje koncentráció hatása eltér a kisózásban tapasztalttól, mivel mindegyik fehérje viselkedése több oldhatósági görbével jellemezhető. A cirkuláris dikroizmus (CD)-spektrumok alapján a *terc*-butil-alkohol nem denaturálja az egyláncú fehérjéket, azonban a rákövetkező kisózás jóval károsabb azokra a *terc*-butil-alkohol jelenlétében, mint nélküle. A nem kovalens kötésű oligomer fehérjék, a hemoglobin és a mioglobin, teljesen denaturálódnak a HFM folyamatában. Az egyszeres láncú fehérjék változó mértékben denaturálódnak, ami részben a folyamat pH értékétől függ, de általában az izoelektromos ponton denaturálódnak a legkevésbé. Az a tény, hogy a kisózással ellentétben a fehérjék a HFM után a vizes fázison flotálnak, arra utal, hogy a *terc*-butil-alkohol kisebb sűrűségű komplexet képez a fehérjével, mint az alternatív víz/fehérje komplex. Ez növelheti a fehérje hidrofób jellegét, ami megkönnyíti ammónium-szulfátos kisózását, tehát általában kevesebb sóra

van szükség, mint a hagyományos kisózásnál. Feltehető, hogy a pH is befolyásolja bizonyos mértékben a *terc*-butil-alkohol fehérje kölcsönhatást.

A fenti munkával kapcsolatban említést érdemel, hogy a szerzők a méréseket előre meghatározott koncentrációjú fehérjeoldatokkal végezték, míg ismeretlen összetételű mintákban a komponensek koncentrációja befolyásolhatja a megoszlást. Az általuk alkalmazott fehérje koncentráció pedig kisebb, mint a kisózás alsó határértékének tekintett 1,0 mg/ml, amely alatt a fehérjeoldatokat célszerű először töményíteni, és utána kisózásnak alávetni (Scopes 1982). A szerzők által megállapított összefüggések elsősorban kis koncentrációjú fehérjeoldatokra érvényesek, és azok extrapolációja óvatosságot igényel.

II. 5. 4. A HFM alkalmazhatósága ipari enzimek tisztítására

A háromfázisú megoszlás első hazai alkalmazását Szamos et al. ismertették (1988a). Kereskedelmi glükóz oxidázt (GO1) és glükoamilázt (G2), illetve extracelluláris fehérjetermelésükben eltérő *Aspergillus niger* törzsek (ATCC 22343 és 1x5-48 rekombinánsa) által rázatott tenyészetben termelt glükoamilázt (G1), valamint torna peroxidázt (PO1) választottak kiindulási mintának (1. ábra)



1. ábra

Glükoamiláz (G1 és G2), glükóz oxidáz (GO1) és torna peroxidáz (PO1)
háromfázisú megoszlása 80 % relatív telítésű $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oldaton.

Szamos et al. (1988a)

Azt találták, hogy a háromfázisú megoszlás egyszerűen megvalósítható eljárás, és 30 % relatív telítéssel mind a négy enzimdaltból jelentős mennyiségű szennyező fehérjét távolít el. A relatív telítést 30 %-ról 80 %-ra növelve mindegyik enzim harmadik fázist képezett. A glükózoxidáz tisztulása kétszeres volt 88 %-os hozam mellett, ugyanakkor az adott kísérleti feltételek mellett a glükóamiláz specifikus aktivitása nem növekedett. Az eredményekből arra következtettek, hogy a háromfázisú megoszlás olyan empirikus enzimmtisztítási módszer, amelynek paramétereit a kiindulási mintától függően minden egyes enzimre külön kell meghatározni.

II. 5. 5. A HFM alkalmazása nagy tisztaságú tormaperoxidáz előállítására

1992-ben eljárást dolgoztak ki analitikai tisztaságú torna peroxidáz előállítására, amelyben egy régebbi tisztítási eljárást kapcsolnak össze a háromfázisú megoszlással (Szamos, Hoschke 1992). Az eljárás fontosabb lépései a következők:

1. a -20°C-ra hűtött növényi szövet aprítása perforált acéllemezen,
2. extrahálás,
3. első háromfázisú megoszlás:
 - szilárd ammónium-szulfát adagolása 50 % relatív telítésig,
 - a kapott csapadék eltávolítása centrifugálással,
 - 1/5 térfogat *terc*-butil-alkohol hozzáadása a felülúszóhoz,
 - 1 perces homogenizálás Ultra Turrax készülékkel (9500 rpm, S25 N Schaft), majd
 - kisebbességű centrifugálás (1000 rpm)
4. az egyesített vizes fázisok pH-jának 9,0-re állítása NaOH-val
5. második háromfázisú megoszlás:
 - szilárd ammónium-szulfát adagolása 80 % relatív telítésig,
 - 1/50 térfogatnyi *terc*-butil-alkohol hozzáadása után egy éjszakai állás
6. a felszínre jutott csapadék elválasztása választó tölcserben a folyadék fázistól
7. a háromfázisú megosztás eredményeként kapott barna csapadék oldása minimális térfogatú Trisz pufferben, majd dialízis acetát pufferrel szemben.
8. CM-cellulóz kromatográfia egyedi tervezésű műanyag oszlopon.

A tormaperoxidáz tisztítására korábban kidolgozott eljárás, és a HFM egyesített alkalmazása, viszonylag kevés és jól reprodukálható lépésben nagytisztaságú peroxidáz (RZ = 2,8) előállítását tette lehetővé 93-szoros tisztulás és 17,1 %-os hozam mellett, nagylaboratóriumi léptékben (8 kg torna feldolgozása).

Az eljárással kapcsolatban érdemes két, nem publikált eredményt megemlíteni.

A fenti módon tisztított torna peroxidáz DEAE-Sepharose mini oszlopon való egy lépéses tisztításával immunanalitikai célokra alkalmas enzimet lehetett előállítani.

A peroxidáz tisztítási kísérlet első HFM-frakciójának (térfogat=1,1 l, RZ = 0,3) aktivitása 8 évig tartó +4°C-os tárolás után 80,0 U/ml-ről csak 74,0 U/ml-re csökkent. Ennyi idő után ebből a nyersanyagból nagy aktivitású enzimet (RZ=2,5) lehetett előállítani 43 %-os hozammal. Ez a HFM "környezetének" a peroxidáz enzimre gyakorolt rendkívüli stabilizáló hatását bizonyítja.

Az eljárás kifejlesztése során az alábbi kiegészítő eredményeket kapták:

- Ha a szerves fázis 1:1 arányú *terc*-butil-alkohol és n-butil-alkohol elegyből áll, akkor az - a vizes fázis gyakorlatilag azonos A_{280} változása mellett - centrifugálás nélkül is gyorsan és "élesen" elválik az alsó fázistól.
- A használt *terc*-butil-alkohol desztillációval megfelelő tisztaságban visszanyerhető.
- A közeli infravörös spektrumok szennyezettség okozta kis eltérése, felvetette azt a lehetőséget, hogy analitikai minőségű ammónium-szulfát helyett, műtrágya minőségű is alkalmazható. Független kísérletben bizonyították, hogy ebben az eljárásban az ammónium-szulfát műtrágya korlátozás nélkül alkalmazható, mivel a szerves fázis eliminálja annak szennyezéseit.

II. 5. 6. Különböző sók alkalmazása a HFM-ben

A HFM-re vonatkozó első eredményeik után 1991-ben különböző sók alkalmazhatóságát vizsgálták (Szamos et al.). Az előzetes kísérleti eredmények alapján az ammónium-szulfáton kívül egyéb sókat, (KCl, MgCl, CaCl₂, Na₂SO₄, MgSO₄) is alkalmaztak a torma peroxidáz (*Armoracia lapathifolia*) és mikrobiális (*Bacillus subtilis*) proteináz megoszlásában. A torma peroxidáz izolálását fagyasztott tormából kiindulva végezték, a neutrális proteináz (*Bacillus subtilis*) pedig ipari nyers enzim volt. A vizsgált sók több tulajdonságban különböztek egymástól, így a kiszóó hatásban (klorid és szulfát) valamint a vizes fázis pH értékében (1. táblázat)

1. táblázat. A vizsgált sók és 1,5 M oldatainak mért pH értékei

só	KCl	MgCl ₂ *6H ₂ O	CaCl ₂ *2H ₂ O	Na ₂ SO ₄	MgSO ₄ *7H ₂ O	(NH ₄) ₂ SO ₄
pH	7,0	3,5	3,7	5,4	4,5	5,6

A víz - *terc*-butil-alkohol - só háromkomponensű rendszer fázisdiagramját nátrium-kloridra és ammónium-szulfátra Kiss és munkatársai közölték 1996-ban. Ezekből meghatározható például egy rögzített *terc*-butil-alkohol tartalomnál feloldódó maximális sómennyiség, vagy az az összetétel, amelynél a rendszer két fázisra válik szét. A konódák (egyensúlyban levő fázisok megfelelő összetételeit jelző, pontokat összekötő bekötővonalak) által kirajzolt terület reprezentálja azt az összetételi tartományt, ami a megoszlási kísérletekhez használható. Az alsó és felső fázisok közötti határfelületi feszültség 10-0,1 mN/m intervallumban változott. Három elektrolitra és

különböző összetételekre bizonyították, hogy a középrétegbe jutó fehérje mennyisége független a kiindulási fehérjekoncentrációtól.

A háromfázisú megoszlás mindig tartalmaz egy kisózási lépést, tehát a *terc*-butil-alkohol hozzáadása előtt a fehérjék sóoldatban vannak. A megoszláshoz szükséges relatív telítés (az adott só, adott hőmérsékletre tartozó oldhatóságának százalékában kifejezve) többféleképpen érhető el:

- Telített sóoldat, desztillált víz és a fehérjeoldat alkalmazásával kiszámítjuk az összemérendő térfogatokat. Ebben az esetben gyorsan dolgozhatunk, de viszonylag nagy a térfogatváltozás, és a rendszer fehérjére nézve híg lesz.
- A fehérjeoldathoz táblázatból kikeresett mennyiségű szilárd ammónium-szulfátot adunk. Ez a módszer minimalizálja a térfogat növekedést, a só oldódási sebessége viszonylag nagy, de a lokális koncentráció maximumok elkerülése miatt nem olyan gyors, mint az előző lépés.

Két különböző, szilárd ammónium-szulfát adagolási módszer hatását tanulmányozta BSA-oldatokon Szamos és Kiss (1996). Azonos mennyiségű ammónium-szulfátot juttattak kézi - "spatulás", illetve egyszerű eszközökkel (műanyag pipettahegy, Vortex mixer) megvalósított "folyamatos" adagolással a fehérjeoldatba. Az ammónium-szulfátot porítás után szitálták, hogy az eltérő szemcseméret okozta hibát csökkentsék. Az adagolás sebességét az adott körülmények között az oldódás sebességéhez igazították. A harmadik fázisba jutó BSA mennyiségét a vizes fázis A_{280} értékének változásából a $c_{BSA}(\text{mg/ml}) = A_{280}/0,650$ összefüggéssel számították. Méréseik szerint a 0,2-2,2 BSA mg/ml tartományban a kiindulási fehérjemennyiség $63,7 \pm 12$ %-alkotta a középréteget a "kézi" adagolás esetében, míg a "folyamatos" adagolásnál ez az érték $72,7 \pm 3,6$ % volt. A szakaszos módszer jellegéből következően nagyobb hibával terhelt, míg a folyamatos eljárás, gyakorlatilag egyező eredményt adott a telített oldatot alkalmazó eljárással. Ennek az eredménynek különösen a folyamatos eljárásnál lehet jelentősége, de ezzel, a biotechnológiához tartozó kiterjesztéssel nem foglalkoztak.

II. 5. 7. A HFM alkalmazástechnikai kiterjesztése

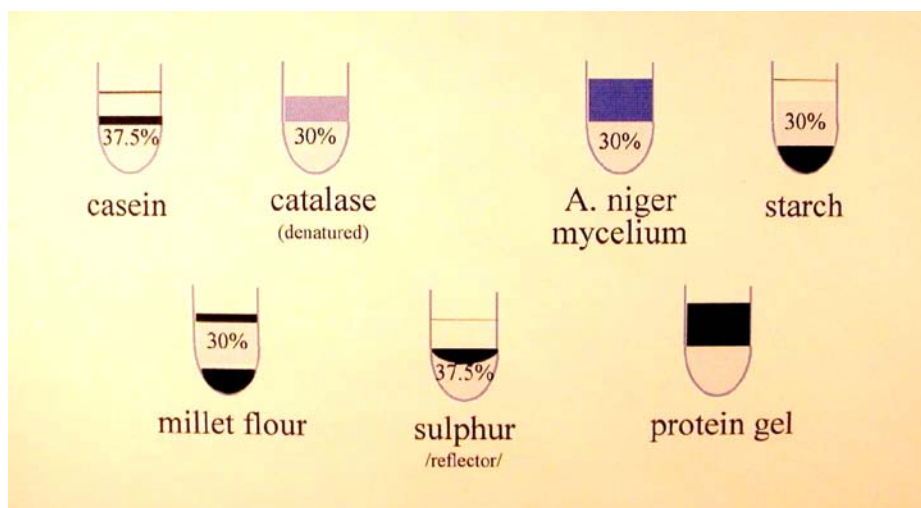
A háromfázisú megoszlás nemcsak fehérjék, hanem minden olyan anyag elválasztására és vizsgálatára lehetőséget nyújt, amely vizes fázisba vihető, és amely az alkohol hozzáadása és a rendszer összerázása után középréteget képez.

A harmadik fázis összetételének visszaoldás nélküli, közvetlen mérési lehetőségét NIR-spektroszkópia és speciális küveták alkalmazásával Szamos és Tóth bizonyították (1992). Az aromás amin-, és fenol származékok oldásával készített modell szennyvizekben torna peroxidáz enzim kezelés, és HFM hatására vízzoldhatatlan polimer csapadék vált le a középrétegben (1992, 1997). A lebegő anyagok NIR-spektroszkópiával történő vizsgálatára korábban egy szárítósos módszert alkalmaztak. A HFM-el olyan rendszerekből sikerült mérésre alkalmas rétegeket

előállítani, amelyek korábban a közvetlen, diffúz reflexiós mérésre egyébként alkalmatlanok voltak. A mérhető mátrix minden esetben a felső szerves és alsó vizes fázis között elhelyezkedő, korong alakú réteg volt, amelynek képződési módjától függően, három esetet lehetett megkülönböztetni.

1. A réteget eredetileg a vizes fázisban oldott, és abból, a só - *terc*-butil-alkohol kezelés hatására kivált, anyagok (például fehérjék) képezik
2. A réteget a vizes fázisban eredetileg lebegő anyagok képezik
3. A középréteget olyan anyag alkotja, például polisztirol, amelyet szilárd formában adtak a kétfázisú rendszerhez.

A 2. ábrán látható, hogy számos egyéb alkalmazásra is lehetőség nyílik, amelyek közül élelmiszervizsgálati megközelítést jelent az ultraszűrt tej fehérje, illetve a por alakú kazeint és keményítőt tartalmazó modellkeverék megoszlásakor képződő rétegek NIR-spektroszkópiai vizsgálata (Szamos, Tóth, 1995).



2. ábra

Különböző anyagok (kazein, kataláz, A. niger micélium, keményítő, köles liszt, kén, és fehérje gél) háromfázisú megoszlási mintázatai.(Szamos, Tóth, 1995).

A spektrum minőségét jelentősen javítani lehetett a *terc*-butil-alkohol réteg vékonyításával, és a küvettákban lévő rendszer alacsony fordulatszámú centrifugálásával. A keményítő ($\rho = 1,5 \text{ g/cm}^3$), és a *terc*-butil-alkohol között nincs olyan kölcsönhatás, ami a keményítőt középrétegbe juttatná, ezért az a kazein-keményítő keverék megoszlása, majd centrifugálása után a cső alján negyedik fázist képezett.

II. 5. 8. A határfelületi feszültség hatása

A háromfázisú megoszlás empirikus voltát nagymértékben csökkentené egy olyan paraméter megtalálása, amelynek változása korrelál a középrétegben kivált fehérje mennyiségével. Azt a feltevést, hogy ez a paraméter a határfelületi feszültség lehet, először Kiss és Szamos vizsgálták (1994). A korábbi, neutrális proteináz kísérlet szervesen sóinak 1,5 M oldatait 30 térfogat% *tert*-butil-alkohollal elegyítve a kiindulási szulfátoldat - *tert*-butil-alkohol kétfázisú rendszerek határfelületi feszültsége nagyobb, mint 1 mN/m, és bennük több fehérje vált le, mint a klorid-oldatokban. Ugyanakkor az UV-abszorbeáló anyag mennyisége a középső fázisban a vizes fázis sűrűségével változott, függetlenül az alkalmazott só típusától. Megállapították, hogy a kationok, anionok és biomolekulák specifikus kölcsönhatásai eltérő mértékben befolyásolják a denaturálódás mértékét, tehát a határfelületi tulajdonságok behatóbb vizsgálata a folyamat jobb megértésére vezethet.

A batch módszerként empirikusan alkalmazott háromfázisú megoszlásban, a fehérjetranszferrel korreláló határfelületi feszültség érvényességi tartományát, a nyers, illetve részben tisztított neutrális proteináz enzimmel, valamint a korábban alkalmazott kloridok és szulfátok (Szamos et al. 1991) 1,5 M oldataival tanulmányozták (Szamos, Kiss, 1995). A rendszerek pH-ját nem állították, így a sók saját hatása érvényesült. Mérték a szétválasztott fázisok A_{280} és enzimaktivitás értékeit. A nyers enzimoldatok 280 nm-en mért abszorbanációjára több vegyület elnyeléséből tevődik össze (pigmentek, fehérjék, nukleotidok), ezért ez az érték általában nem alkalmas egyetlen komponens követésére. Ebben a kísérletben azonban a mért érték párhuzamosan változott a Biuret módszerrel mért fehérjetartalommal.

Az enzimaktivitást (Tomarelli et al. 1949) szerint azokazein szubsztráttal mérték. A proteináz aktivitást az enzimreakció sebességi állandójával fejezték ki:

$$K = \frac{2,3}{t} * \log \frac{c_1}{c_2} \quad (3)$$

Ahol c_1 és c_2 a kezdeti és végső fehérjekoncentráció, 37°C-on t percig való termosztálás után.

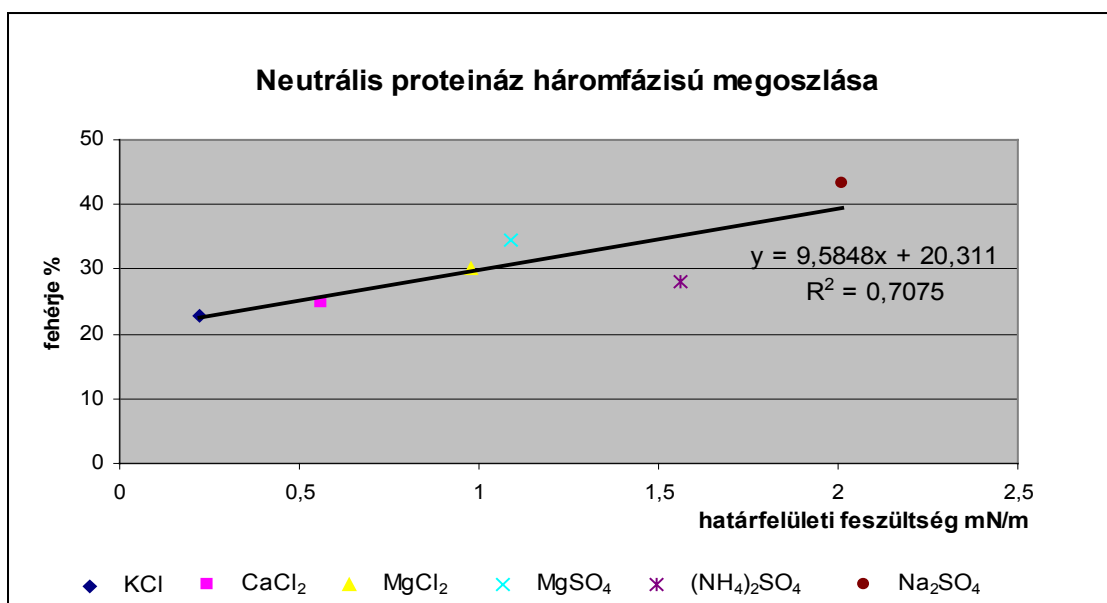
A határfelületi feszültséget a megfelelő kétfázisú rendszerben (30 cm³ 1,5 M sóoldat + 12,8 cm³ *tert*-butil-alkohol), fehérje távollétében, módosított függő csepp módszerrel mérték. A függő csepp mikroszkópikus képe alapján meghatározott jellegzetes geometriai adatokból számolták a γ -t az 5-5x10⁻³ mN m⁻¹ tartományban (Boucher et al. 1987). Mérték a szerves és vizes fázisok sűrűségét is.

Az oldott fehérje- és enzimtartalom változásának egyidejű követésére a Falconer-Taylor típusú ábrázolást (Falconer, Taylor, 1946), - mégpedig az úgynevezett specifikus oldhatósági tesztet - alkalmazták, amellyel egy választott fehérje, és a többi fehérje kicsapódása közötti összefüggés tanulmányozható. Ezt a tesztet egy, a fehérjék frakcionált kicsapásával foglalkozó publikációban olyan grafikus módszerként említik, amellyel követhető egy fehérjetermék kinyerése olyan

keverékből, amelyben a termék az összes fehérje tartalom szignifikáns része, és a jelenlevő fehérje specíesek száma kicsi (Richardson et al. 1990).

A vizes fázisokban mért A_{280} , a nyers fehérje eltérő oldhatóságát jelezte a különböző ekvimoláris sóoldatokban. (Itt meg kell említeni, hogy a Hofmeister-féle osztályozásnál a só koncentrációt vették alapul, nem az ionerősséget). A klorid tartalmú oldatokban mért középérték ($38,3 \pm 1,5$) nagyobb, mint a szulfát tartalmú oldatokban ($32,2 \pm 1,5$). Ez megfelel a kloridok és szulfátok általános kisózási tulajdonságainak, tükrözve egyúttal a kationok kisebb szerepét (Hofmeister liotróp sor). A háromfázisú megoszlás mindegyik rendszerben csökkentette a 280 nm-en mért elnyelést, az elnyelő anyagnak a középső fázisban való koncentrálódása miatt.

A különböző sóoldatokkal végzett kísérletek új eredménye volt, hogy a megoszlás előtt és után kapott vizes fázisok 280 nm-en mért elnyelésének százalékban kifejezett különbségeit a megfelelő kétfázisú rendszerek határfelületi feszültségének függvényében ábrázolva egy határozott trend érvényesült (3. ábra). A legkevesebb fehérje a legkisebb határfelületi feszültségű kálium-kloridos rendszerben vált le. Nagyobb mértékű fehérjekiválást az 1 mN/m -nél nagyobb határfelületi feszültségű, szulfátion tartalmú rendszerekben tapasztaltak. A kivált fehérje mennyiségét az alsó fázis sűrűségének függvényében ábrázolva hasonló függést kaptak.



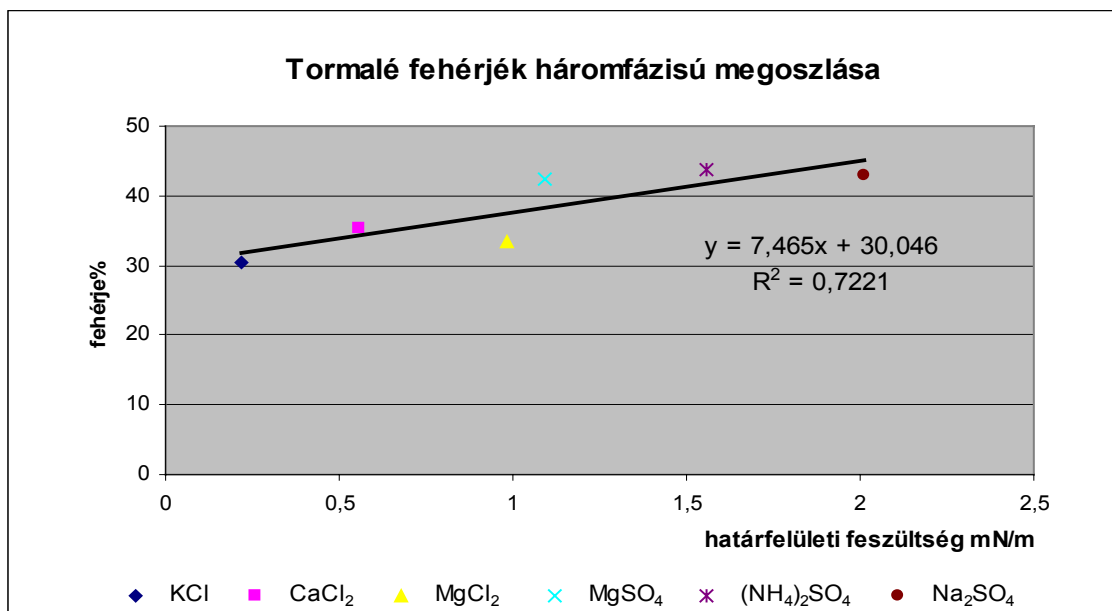
3.ábra

Bacillus subtilis neutrális proteináz háromfázisú megoszlása 1,5 M sóoldatokban.

(Szamos, Kiss, 1995)

A kapott eredmények rávilágítottak arra, hogy az összetett, és új fázis kialakulására vezető rendszerek jellemezhetők az azonos összetételű, de fehérjét nem tartalmazó kétfázisú rendszer

alapparamétereinek, tehát határfelületi feszültségének, sűrűségének értékeivel, ha a kivált fehérje mennyiségét ezeknek az értékeknek a függvényében ábrázoljuk. Ez a trend a nyers tormalé fehérjéinek fenti sóoldatokkal való megoszlására is igaznak bizonyult (nem publikált adatok, 4. ábra).



4.ábra

Tormaléfehérjék háromfázisú megoszlása 1,5 M sóoldatokban
(Szamos, nem publikált adatok)

II. 5. 9. A határfelület vándorlásának vizsgálata

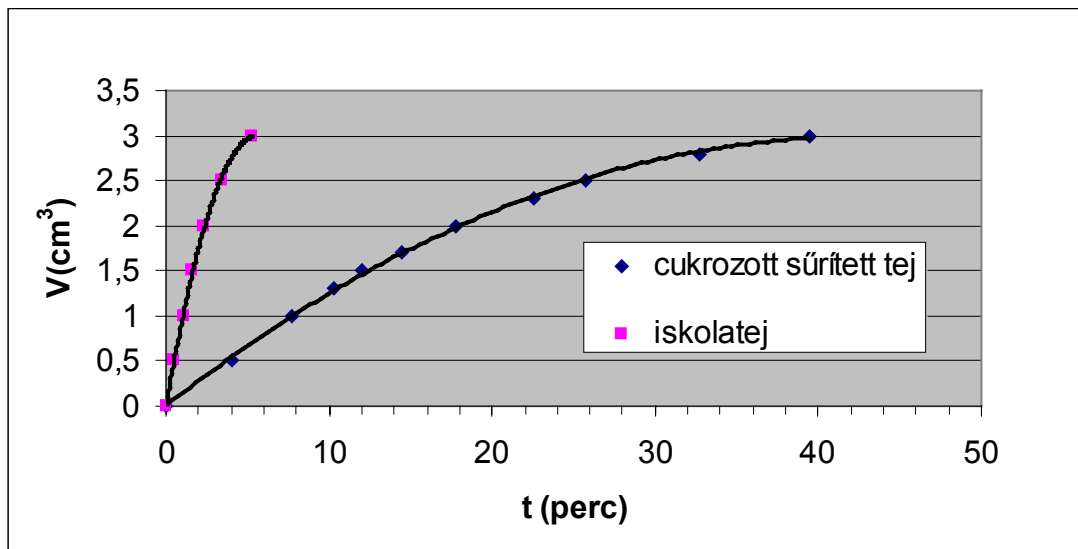
A háromfázisú megoszlás egy különleges, élelmiszervizsgálati szempontból fontosnak tekinthető alkalmazásáról számoltak be 1996-ban (Szamos et al.). Adott összetételű kétfázisú alaprendszert (5,6 ml 37 % relatív telítésű ammóniumsulfát oldat + 2,4 ml 30 térfogat% *terc*-butil-alkohol, határfelület 5,5 ml-nél) csiszolt dugós, 10 cm³-es osztott kémcsőben, különböző hőmérsékleteken (t °C) összerázva, és mérve a határfelület egyensúlyi helyzetbe jutásáig eltelt időt, a rendszer hőmérsékletével az alábbi (4) lineáris összefüggés adódott:

$$t \text{ (sec)} = - 4,44(T-273,15) + 177,19 \quad (4)$$

$$(r^2 = 0,929, \text{ hőmérséklettartomány: } 7 - 27^\circ\text{C})$$

Ez az "időfüggés" valószínűsít egy másik mérési lehetőséget is, amely szerint az egyensúlyi helyzet elérésének sebessége, jellegzetes eltérést mutathat minden olyan esetben, amikor a rendszer azonos, vagy különböző komponenseket eltérő koncentrációban tartalmaz. Az eltérő minőség detektálhatósága azonos térfogatú, vízzel 1:4 arányban hígított cukrozott sűrített tej, illetve iskolatej

háromfázisú megoszlásával, továbbá a rendszerek összerázása után a határfelület vándorlási sebességének mérésével bizonyítható (5. ábra).



5. ábra

Határfelület vándorlásának sebessége különböző tejminták háromfázisú megoszlásakor

(Szamos et al. 1996)

II. 5. 10. A szulfácion kitüntetett szerepe a HFM-ben

A fehérjék koncentrálására és tisztítására alkalmazható háromfázisú megoszlás módszeréről Dennison és Lovrien (1997) közöltek összefoglaló publikációt. Az áttekintés elsősorban a bizonyított és feltételezhető kölcsönhatásokat és a valószínűsíthető mechanizmusokat ismerteti számos adat, és elméleti összefüggés segítségével. A megoszlásban szerepet játszó egyik legfontosabb tényezőként a szulfát aniont tekintik, amely 0,4-3 M koncentrációtartományban ötféleképpen is hozzájárul a fehérjék kisózásához. Ezek az ionerősség hatása, a kozmotróp („vízszerkezetet építő”) hatás, az "üreg" felületi feszültség növekedés, az ozmotikus stressz (dehidratálás) és a kisózási - bepréslő ágens.

Ezek különböző részarányban működnek, a szulfát koncentrációjától és a fehérje molekulatöltésétől ($Z_H^+ \rightarrow \text{pH}$) függően. Ezeken kívül egy újabb, egyre inkább számításba vett hatás, a konformációs zsugorodás vagy feszülés, amelynek során a szulfácion több fehérje, kisszámú kationos kötőhelyére kapcsolódik, ha a fehérjének nettó pozitív töltése van.

A háromfázisú megoszlásban szerepet játszik:

- a szulfát kötődése a fehérjéhez, ami nagy szulfátkoncentrációnál védi a fehérjét. (Ez régi tapasztalat, emiatt kerül kiserelésre több analitikai enzim ammónium-szulfát szuszpenzióban.)
- a szulfát kötődésének elektrosztatikus természete
- az a tény, hogy a kötődés már 0,1-0,2 M koncentráción megtörténik

A rendszerben kétféle szulfátió van, kötött és oldatban maradt kozmotróp szulfátió. A *terc*-butil-alkohol egy része is kötött, a maradék kozmotróp. Egy adott fehérje HFM-mel való tisztításához szükség van a pH közelítő állítására. A középréteg kialakulása néhány perc alatt végbemegy, bár részletes kinetikai adatok nem állnak rendelkezésre.

Korábbi ismeretek összegzéseként megállapítják, hogy a HFM-hez a kisózáshoz használt ammónium-szulfát mennyiségének 1/2-3/4 része szükséges, ezt követi a pH állítás, nincs szükség alacsony hőmérsékletekre, a szulfát és a *terc*-butil-alkohol védő hatása a pH-t illető adagolási sorrend megfordításával is illusztrálható. A legfontosabb a pH, amit elsőként kell beállítani, és a szétválasztás akkor hatékony, ha a kísérő és a tisztítani kívánt fehérje izoionos pontjai között a különbség ≥ 2 .

Megjegyzés: a cikkben ismertetett alkalmazásokban a pH állítása alapvető fontosságú, de az élelmiszervizsgálati alkalmazásokban nem feltétlenül az. Ennek egyik oka, hogy nagyobb számú, változatos fehérje összetételű minta vizsgálata során, a pH állítás olyan eltolódásokat okoz a többkomponensű rendszerben, ami csökkenti az analízis reprodukálhatóságát, nem beszélve a technikai megvalósítás során bevitt hibákról. A másik ismert ok az, hogy a puffer oldat és a nem neutrális sóoldat elegyítésekor a pH eltolódik, aminek mértéke függ az ionok minőségétől és mennyiségétől. Emiatt rendszerint nominális pH értéken dolgozunk. Amennyiben a kitűzött cél, nem egy értékes fehérje izolálása, - ahol a vizes fázis pH értékének állítása a fentiek szerint szükséges, - hanem többkomponensű rendszerek sorozatvizsgálata, akkor a változásokat az alkalmazástechnikától függően az ammónium-szulfát oldat pH értékére, vagy egy adott pH értékre állított ammónium szulfát törzsoldatra célszerű vonatkoztatni, mivel a komponensek mennyiségi ingadozása és a kölcsönhatások száma jóval nagyobb lehet, mint egyetlen fehérje tisztítása során.

A háromfázisú megoszlásban fontos szerepet játszó határfelületi fehérje adszorpció különleges tulajdonságát 1997-ben erősítették meg (Kiss et al.). Ammónium-szulfát, nátrium-klorid és a magnézium-szulfát elektrolitok, valamint marha szérum albumin, ovalbumin, lizozim és zselatin fehérjék alkalmazásával megállapították, hogy a középrétegben leváló fehérje relatív (%-ban megadott) mennyisége nem függ az összes fehérje kiindulási koncentrációjától, továbbá korrelál a határfelületi feszültséggel és más, a fehérje hidrofobitását jellemző értékekkel.

A háromfázisú-megoszlásban kialakuló fehérje gél összetételét és mechanikai tulajdonságait Borbás és munkatársai tanulmányozták (2000, 2001) marha szérum albuminon és ovalbuminon. A harmadik fázis összetételének meghatározására NIR spektroszkópiai megközelítést alkalmazva azt találták, hogy a középső fázis nagymennyiségű folyadékot tartalmaz, fehérjetartalma alacsony, (0,5-2 % ovalbumin, 3-9 % marha szérum albumin) és a gél közege heterogén. Öt különböző összetételű, 1, 2 és 4,5 mN/m határfelületi feszültségű rendszerben mérték az ovalbumin és BSA megoszlásának paramétereit. A rendszereket 672xg-vel centrifugálták, és megállapították, hogy a gélek folyadéktartalma 80–95 % között változik, a gél szerkezetet képző fehérje mennyisége pedig, egy esetben sem haladja meg a 10 %-ot. Az ovalbumin és BSA között szignifikáns különbség volt az, hogy az ovalbumin gél a rendszer teljes térfogatára kiterjedt, míg a BSA annak csak egy részére. Centrifugálás hatására a BSA koherens fázis kisebb térfogatra komprimálódott, és kevesebb folyadékot tartalmazott, mint az ovalbumin. Ennek következtében az ovalbumin gélek fehérjetartalma 2 % alatti volt, míg a BSA géleké 3-10 %. Az eredmények alapján arra lehet következtetni, hogy a középréteg egy heterogén terner rendszer, egy koncentrált emulzió, amit a fehérje hálózat stabilizál. Az emulziós gél elasztikus tulajdonságú, amely nyomás hatására keményebbé válik, ami a gél szerkezetében bekövetkező változás következménye.

II. 5. 11. DNS tisztítása háromfázisú megoszlással

A háromfázisú megoszlás módszerét 1998-ban DNS-tisztításra alkalmazták Szamos és munkatársai (1998b). Az elmúlt másfél évtizedben a polimeráz láncreakció széleskörű alkalmazása jellemző az élelmiszervizsgálat területén is, elegendő a mikrobiológiai felhasználást és a transzgénikus szervezetek detektálását említeni. Az eljárás alapvető kezdeti lépése PCR-tiszta DNS izolálása a vizsgálandó mintából. Ma erre már számos módszer létezik, a fenti publikáció idején azonban, különösen növényi szövetekből, nem lehetett egyszerű módszerrel jó minőségű DNS-t izolálni. A búzaszem nagy fehérjetartalma, az enzimes emésztés részleges volta, és a DNS-tisztításhoz alkalmas, mini oszlop véges áteresztőképessége miatt, a búza-DNS izolálása nehézkes volt. Előzetes kísérletben azt találták, hogy a csirkevér DNS háromfázisú megoszlás hatására 30 % relatív ammóniumszulfát telítésnél oldatban marad, 84 % relatív telítésű oldatból azonban kiválik, és harmadik fázist képez, tehát a DNS egy fehérjéket is tartalmazó oldatból tisztítható.

A fenti munka során egy korábbi PCR módszertan részét képező DNS-izoláló eljárásból indultak ki, és azt egy, - illetve kétlépéses háromfázisú megoszlással kombinálva PCR-tiszta DNS-t izoláltak. Az így tisztított DNS A_{260}/A_{280} értéke (tisztaságával arányos dimenzió nélküli szám) az egylépéses tisztítás esetében 1,0-1,5, a kétlépéses HFM-módszerrel 1,4-1,7 között volt. Mivel ez közvetlenül nem alkalmazható polimeráz láncreakcióhoz (a DNS tisztasága 1,8-2,0 arány esetén

megfelelő!) a kapott preparátumot Wizard gyantán tisztították, és az így kapott DNS-t eredményesen alkalmazták polimeráz láncreakcióhoz.

A 90-es évek közepétől kerültek kereskedelmi forgalomba az első transzgénikus növényi termények, elsősorban a szója és kukorica, amelyekkel kapcsolatban, Európában a közvélemény és a hatóságok, egyaránt elengedhetetlennek tartották a szigorúbb ellenőrzést. A gyakorlatban a hatékony laboratóriumi vizsgálat két fő módszere a DNS-alapú, polimeráz láncreakció, illetve a fehérjealapú immunanalitika. A polimeráz láncreakció alapfeltétele, különösen ilyen, kis mennyiségben jelen levő célszekvencia detektálásakor, nagytisztaságú DNS izolálása az élelmiszermintából. Korábbi eredményeik folytatásaként, és a költségvonzat csökkentésére, olyan HFM-on alapuló módszert dolgoztak ki, amivel gyorsan és egyszerűen lehet tiszta DNS-t izolálni különböző szójalisztekből (Biacs et al. 2000), illetve nyers húsokból és különböző hústermékekből (Jánosi, Szamos 2001). Az eljárás lényege mindkét esetben azonos volt: a fehérjék proteináz K enzimmel való emésztését követően, a vizes fázis sótartalmát 80 % relatív telítésre állították, majd *tert*-butil-alkohol hozzáadása és a rendszer összerázása után a középrétegben közelítőleg PCR-tiszta DNS vált le, amit vagy közvetlenül, vagy utótisztítás után termociklizáló készülékben amplifikáltak. A különböző mintákból a fenti módszerrel izolált DNS-ek gyakorlatilag "PCR-tiszta" voltak (2. táblázat). Egyes hústermékeknél a zsírtartalom zavaró hatását utótisztítással (Wizard gyanta) eliminálták.

2. táblázat. Háromfázisú megoszlással izolált DNS-ek jellemzői (Biacs et al. 2000).

Minta	Felülúszó μ l	DNS μ g/100 mg	A260/ A280	Szója lektin. PCR
Cukorrépa GM	700	54	1,6	-
Kukorica GM	500	135	1.8	-
Botond borsó	500	38	2,0	-
Szójadara	1000	264	1,7	+++
Szójaszelet	1000	477	1,9	+++
Szójakocka	1000	414	1,9	+++
Tofu	1000	66	1,9	+++
Szójaliszt (Ev)	300	738 $\pm$ 129	1,7	+++
Szójaliszt (RR)	300	360 $\pm$ 132	1,7	+++
Szójaliszt(JS)	300	342 $\pm$ 72	1,9	+++
Szójaliszt(JS)	300	1018	1,5	nem zsírtalanított

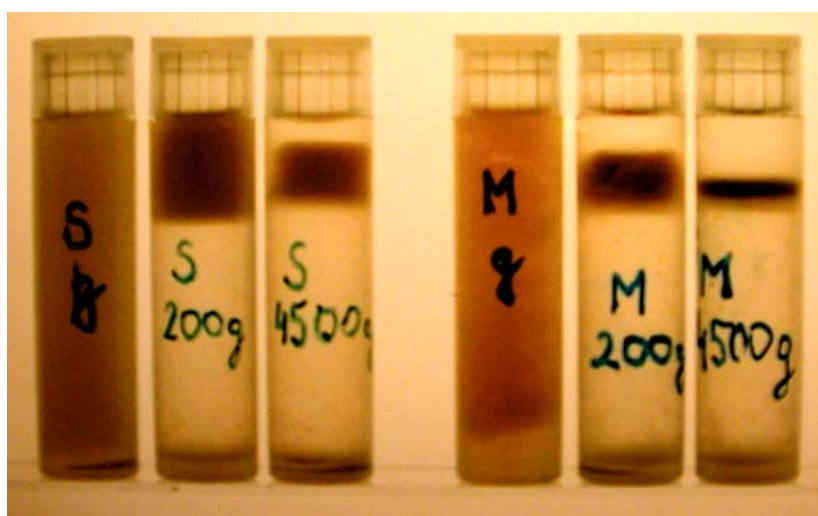
II. 5. 12. Kvalitatív analízis a HFM középrétegek mérése alapján

A húsfehérjék háromfázisú megoszlásán alapuló élelmiszervizsgálati módszerről 1998-ban számoltak be (Szamos et al.(1998a). A módszer kidolgozását két korábbi eredmény tette lehetővé. Az egyik az a felismerés, hogy azonos összetételű megosztó rendszerben különböző állatfajok húslevét alkalmazva fehérjeoldatként, adott g-értéken különböző vastagságú harmadik fázis képződik. A másik eredmény, hogy 1,0, 2,0 illetve 3,0 mN/m határfelületi feszültségű kétfázisú rendszerekben a marha szérumalbuminból a középrétegbe levált fehérje mennyisége a 2,0 mN/m rendszerben mutatta a legkisebb szórást a vizsgált koncentrációtartományban (BSA = 0,2-2,2 mg/ml). Feltételezve, hogy ez a tulajdonság nagy fehérjekoncentrációjú oldatokra is érvényes, és a különböző fehérjék kompresszibilitása centrifugális erőterben nem egyforma, a háromfázisú megoszlás sorozatvizsgálatokra alkalmas formáját dolgozták ki. A publikáció terjedelme miatt itt csak a módszer lényegét tükröző kísérleteket ismertetem.

A harmadik fázis méretét és helyzetét egy többkomponensű rendszerben a koncentráció, sűrűség és viszkozitás viszonyok határozzák meg állandó hőmérsékleten. Ha a rendszer sok fehérjét tartalmaz, akkor az osszerázást követően, nem válik szét fázisokra, és ez az állapot napokig megőrződhet, miközben abból centrifugálással két- vagy háromfázisú rendszer állítható elő percek alatt. Két, megfelelően választott g-értéken centrifugálva a középréteg méretének változása, és a méretek aránya jellemző lehet a középréteget alkotó fehérje minőségére, összetételére.

A marha-, sertés- és vaddisznóhús mintákat (10-10 kg) 10 l-es műanyag konténerekben tárolták 2°C-on, 3 héten át. A képződő húsléből időközönként mintákat vettek, és a megoszlási kísérletekhez

0,15-0,15 ml húslét használtak. A háromfázisú megosztást jól záródó, 4,5 ml térfogatú bio-vial műanyag csövekben végezték 25°C-on. A megosztó rendszer összetétele olyan volt, hogy a minta minden esetben 20-szorosára hígult, és a szerves fázis felszíne feletti légtér biztosította a kézi rázással való teljes átkeverést. (Az eltérő mechanikai energiaközlés okozta hiba csökkentésére a csőtartóba helyezett 9 csövet egyszerre rázták össze). A rendszereket ezután 15 percig állni hagyták, majd 200xg-vel 5 percig (**B** érték, cm), utána 4500x g-vel 5 percig (**C** érték, cm) centrifugálták, és mindkét centrifugálás után tolómérccével mérték a középréteg vastagságát. A **B/C** arányt tekintették a kompresszibilitás mérőszámának. A sertés és marhahúsle, megoszlási mintázata és **B/C** aránya alapján egyértelműen és reprodukálhatóan megkülönböztethető volt egymástól a teljes kísérleti időtartam alatt (6. ábra).



6.ábra

Sertés (S)- és marhahúsle (M) háromfázisú megoszlása 1xg, 200xg és 4500xg hatására.

(Szamos et al. 1998a).

A kísérlet időtartama alatt vett sertés húsle fehérjékből képződő középréteg kompresszibilitása gyakorlatilag nem változott, a marhahúsleből képződött korongoké kismértékben csökkent, míg a vaddisznó fehérjekorongoké jelentősen nőtt (3-ról 6-ra).

Ennek a kísérletsorozatnak érdekes eredménye, hogy a sertés húsleből hígítási sort készítve, a 4500xg hatására komprimálódott rétegek vastagsága lineárisan változott a fehérjekoncentrációval a 0,6-3,1 mg/ml tartományban:

$$C [\text{cm}] = 0,044 \cdot c [\text{mg/ml}] + 0,05 \quad (r^2 = 0,994) \quad (5)$$

Tehát itt a fehérje mennyisége és C között igen szoros összefüggés áll fenn.

Meg kell jegyezni, hogy a megvalósítás feltételrendszere meglehetősen szigorú, mivel a megismételhetőség biztosításához rögzíteni kell az alábbi paramétereket:

- az ammónium-szulfát koncentrációja,
- a *terc*-butil-alkohol mennyisége,
- a minta térfogata,
- a reagensok adagolásának és a műveleteknek a sorrendje,
- a centrifugálás sebessége és időtartama, hőmérséklet.

Mindezek pontos betartása előfeltétele annak, hogy a megoszlás geometriai mintázatának értékelése összehasonlítható eredményekre vezessen.

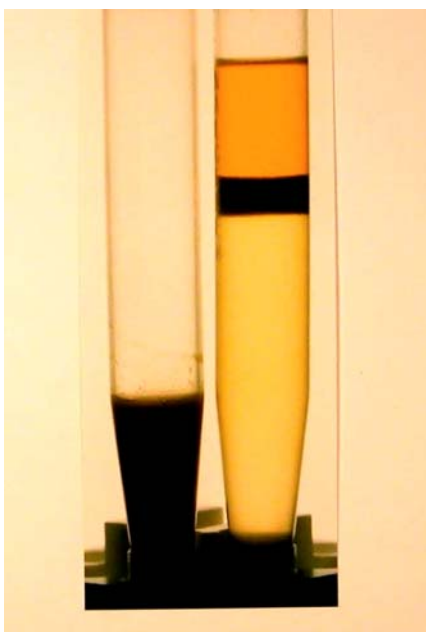
II. 5. 13. A fehérjeleválás mechanizmusa a HFM-ben

A fehérjék határfelületi viselkedéséről a háromfázisú megoszlás során víz - *terc*-butil-alkohol. - ammónium-szulfát háromkomponensű rendszerben két összefoglaló jellegű publikáció jelent meg (Kiss et al. 1998a, b). A vizsgálatokhoz kis fehérjekoncentrációjú (10-60 mg/l illetve, 0,2 3 mg/ml) fehérjeoldatokat és egyensúlyi háromfázisú rendszereket használtak és háromszögdiagramon ábrázolták a terner rendszerek összetételeit. A tömegtörtben feltüntetett fázisdiagramban, a konóda végpontjai jelzik a két nem elegyedő, egyensúlyi folyadékfázis összetételét. Minél hosszabb a konóda, annál jobban eltér a két egyensúlyi fázis összetétele. A fázisdiagram alapján több eltérő összetételű és határfelületi feszültségű rendszer is kiválasztható, de általában a nagyobb konódahosszhoz tartózkodó, és nagyobb határfelületi feszültségű rendszerekben a fehérjeleválás akár 95-100 %-ra is növelhető. A vizsgált modellfehérjék - marha szérum albumin, ovalbumin, lizozim és zselatin - kis mennyiségét, $\gamma = 2,0 \text{ mN/m}$ határfelületi feszültségű rendszerhez adva a felső és alsó fázis közötti határfelületi feszültség csökken, legnagyobb mértékben a BSA és OVA esetében, míg a zselatin határfelületi feszültség csökkentő hatása a legkisebb. Ez a határfelületi adszorpció a fehérjék hidrofób jellegével hozható összefüggésbe, mégpedig nem annyira az aminosav összetételből összegzéssel számított teljes hidrofóbitással, hanem az empirikus, például fluoreszcens festékkötődés alapján mérhető felületi hidrofóbitással. Az első lépés tehát a fehérjék határfelületi adszorpciója, amit kicsapódás követ. Az adszorpciót valószínűsíti az a tény is, hogy a viszonylag kicsi, makroszkopikus határfelület a rendszer összerázásakor nagymértékben megnő, tehát a kölcsönhatás sokkal intenzívebb lesz a komponensek között.

A határfelületi fehérjemegoszlás elválasztás technikai alkalmazásait először 1998-ban foglalták össze (Szamos, Kiss, 1998). Leírták a torma peroxidáz, neutrális proteináz tisztításáról, a kis fehérjetartalmú rendszerek viselkedéséről korábban közölt eredményeket, a húsfhérjék vizsgálatát, és egy különleges alkalmazást (II.5.14), ami a HFM módszerének sokoldalúságát bizonyítja.

II. 5. 14. Fehérje jelenlétének detektálása HFM-el

A cukorgyártás értékes mellékterméke a melasz, ami kb. 48 % szacharózt, kb. 18 % káliumsót (pl. aminosavak és foszforsavak káliumsóit), mintegy 10 % nitrogénbázist (fehérje lebontási termékeket, kolint, betaint), kb. 1 % raffinózt, valamint kevés invertcukrot tartalmaz (Gerecs, 1983). Azt a kérdést, hogy egy konkrét melasz minta tartalmaz-e fehérjét, a fentiek miatt műszeres méréssel nem lehet egyszerűen eldönteni. Amint a 7. ábrán látható, 2 mN/m határfelületi feszültségű rendszerben a melasz minta középréteget képezett, amely kis mennyiségű, elektroforézissel elválasztható fehérjét is tartalmazott.



7. ábra

Melasz minta háromfázisú megosztása 2 mN/m rendszerrel.

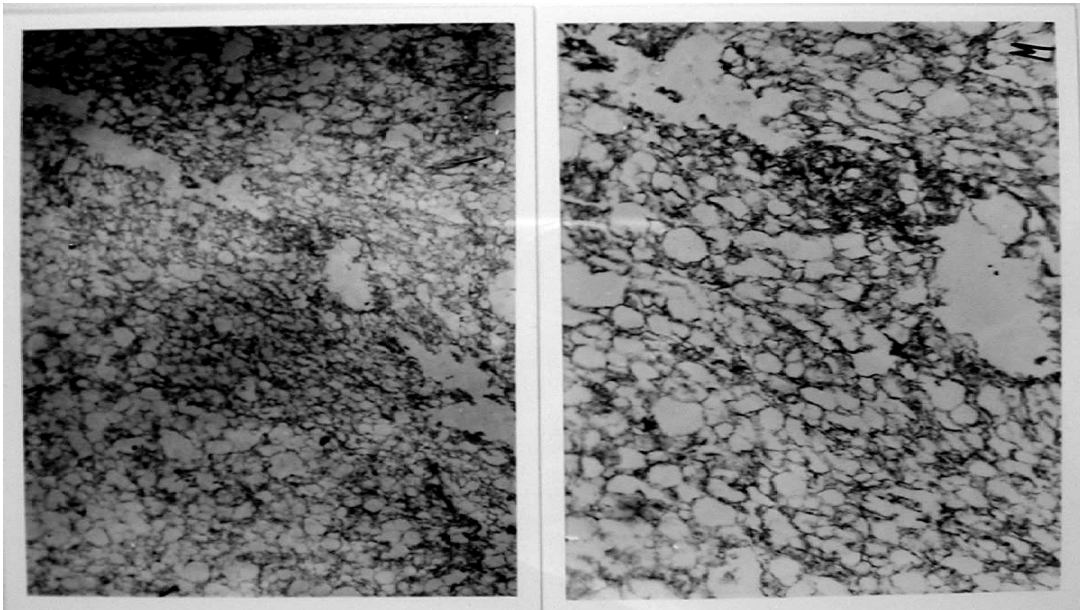
(Szamos, Kiss 1998)

II. 5. 15. HFM alkalmazása bioaktív réteg előállítására

A háromfázisú-megoszlás egyúttal különleges enzimrögzítő lépés is, amit glükóz mérésére alkalmazható bioaktív réteg készítésével bizonyítottak (Adányi et al. 1999). A bioszenzorok készítésekor a legfontosabb szempont, az enzim rögzítése úgy, hogy az a biokémiai-elektrokémiai reakciót és a reakciópartnerek felületre való jutását ne akadályozza. Fontos feltétel továbbá az enzimet tartalmazó réteg egyszerű, könnyű és reprodukálható kialakíthatósága is.

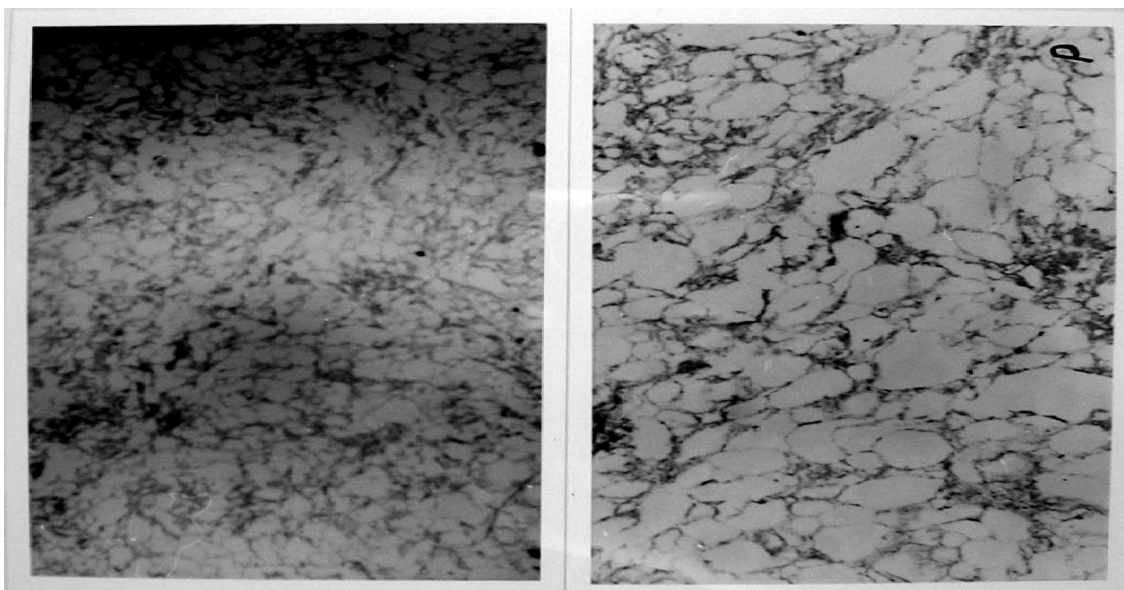
A bioaktív réteget különböző húsokból centrifugálással izolált drip (húslé) és glükóz-oxidáz enzim együttes alkalmazásával készítették. Különböző állatok (marha, pulyka, csirke, sertés) dripfehérjéit és glükózoxidázt tartalmazó rétegek közül, a csirke szarkoplazma fehérjéit tartalmazó réteggel

kapták a legjobb eredményt. Ebben az alkalmazásban a rétegek mikroszkópos szerkezete döntő, de közelebbről nem tisztázott szerepet játszik (Szamos, nem publikált adatok 8/a. és b. ábrák).



8/a. ábra

Marha szarkoplazma fehérje réteg mikroszkópos képe 40X-es ill. 100X-os nagyításban.



8/b. ábra

Pulyka szarkoplazma fehérje réteg mikroszkópos képe 40X-es ill. 100X-os nagyításban

A kísérletekhez olyan rétegeket alkalmaztak, amelyek vastagsága 4500 $\times$ -vel történő centrifugálás után 0,1 cm volt, és a bennük foglalt enzim maximális jelet eredményezett a házilag konstruált bioszenzorban. A bioaktív rétegek megfelelő paraméterekkel rendelkeztek, mind az elméleti (jelállandóság, stabilitás), mind a gyakorlati kritériumok (kb. 300 mérésre voltak alkalmazhatók) szempontjából. Egy glükóz mérési referencia módszer eredményeihez viszonyítva a korrelációs koefficiens 0,992 volt.

II. 5. 16. A HFM legújabb alkalmazásai

A háromfázisú megoszlás újabb irodalmára a megoszlás módszerének optimálása jellemző egy adott fehérje vagy szénhidrát polimer tisztítása során.

Pericin és munkatársai (1997) háromfázisú megoszlással (56 m/V % ammónium-szulfát oldat - 10 térfogat% *terc*-butil-alkohol) *exo*-pektinázt izoláltak *Polyporus squamosus*-ból. A szubmerz kultúrában tenyésztett mikroorganizmus által termelt kis aktivitású, konstitutív *exo*-pektináz specifikus aktivitása háromszorosára nőtt.

Hasonló alkalmazások a foszfolipáz D (*Dacus carota*) tisztítása (Sharma, Gupta, 2001), a búzacsíra bifunkcionális proteáz/amiláz inhibitor tisztítása (Sharma, Gupta, 2001), a proteináz K szerin proteáz tisztítása (Singh et al. 2001), a szója tripszin inhibitor tisztítása háromfázisú affinitás megoszlással (Roy, Gupta, 2002), a kereskedelmi alginát készítmények tisztítása (Sharma, Gupta, 2002). A szerzők vizsgálták a háromfázisú megoszlás paramétereinek, így a só koncentráció, a szerves fázis/vizes fázis térfogataránya, a pH, a hőmérséklet hatásait abból a célból, hogy a lehető legtisztább fehérjét állítsák elő a kiindulási nyersanyagból.

A fenti munkák közül érdemes részletesebben foglalkozni a szója tripszin inhibitor tisztításával, amely a HFM eddigiektől eltérő változatát tartalmazza. Egy első háromfázisú megoszlással (1:1 térfogatarányú 30 m/V % sóoldat - *terc*-butil-alkohol) tisztított vizes fázisban a kiindulási aktivitás 91 %-a megőrződött. Ezután kismennyiségű ZnSO₄-ot illetve CuSO₄-ot adtak a vizes fázishoz, majd 2 térfogatnyi *terc*-butil-alkohollal elegyítették. A második megoszlás sokkal jobb, 12-, illetve 13-szoros tisztulást eredményezett, mint a hagyományos, fémion távollétében végzett háromfázisú megoszlás. Megállapították, hogy a fémionok által biztosított szelektivitás csak a "HFM környezetben" működik, és a módosítás különösen jól alkalmazható a rekombináns fehérjék tisztításában.

Ehhez az eredményhez érdemes hozzáfűzni, hogy a BSA-nehézfémion kölcsönhatást már korábban is vizsgálták (Tamás, 1996). Az eredmények szerint a fehérje 100 %-ban eltávolította a Cu²⁺ ionokat az oldatból, míg a Pb²⁺ ionok a vizsgált fémion koncentráció (0,02-2,00 mM) tartományban, kevésbé (20-50 %) kötődtek a marha szérumalbuminhoz.

Mondal és munkatársai egyik legújabb munkájukban (2004), keményítő és módosított keményítő háromfázisú megoszlásával foglalkoznak. Méréseik szerint a víz oldható keményítő HFM-mel tisztítható, és a tisztított keményítő amilázos emészthetősége csökken. Ez az eredmény azért érdekes, mert a kereskedelmi, nem víz oldható keményítő, a korábbi tapasztalatok szerint nem képez harmadik fázist, kivéve, ha szemcseméretét homogenizálással erőteljesen csökkentjük.

A háromfázisú megoszlás különösen az utóbbi 5-6 évben számos alkalmazást nyert, elsősorban a fehérjetisztítás területén, miközben mechanizmusának tisztázására is számos kísérletet végeztek. A mechanizmus azonban csak modellfehérjéket tartalmazó egyszerű rendszerekben

értelmezhető viszonylagos biztonsággal, mivel összetett rendszerekben, mint az élelmiszerek is, jóval több a lehetséges kölcsönhatások száma. A kísérletek azt bizonyítják, hogy nemcsak a fehérjék, hanem a dezoxiribonukleinsav, a poliszacharidok, mint a keményítő, az alginátok, továbbá a frissen porított kén, a gomba micélium, stb. (ld. 2. ábra), tehát az oldott makromolekulák, vagy a kellően aprított, nagysűrűségű mátrixok, (amelyek vizes ammónium szulfát oldatban süllyednek) egyaránt harmadik fázist képezhetnek. Ebben a felületi hidrofobitás miatt, elsősorban a *terc*-butil-alkohollal való asszociáció játszik döntő szerepet. A megoszlásnak ugyanakkor van egy eddig nem méltatott tulajdonsága, ami különösen alkalmassá teszi élelmiszerek (vagy más összetett rendszerek) vizsgálatára. Az adott mátrix minden komponense jelen van mindhárom (adott esetben négy) fázisban, de polaritás és oldhatóság szerint az eredetitől eltérő megoszlásban. Ez egyedülálló analitikai lehetőséget kínál, mivel az új eloszlás hosszabb időn át, változatlanul megőrizhető.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III. 1. Anyagok

III. 1. 1. A vizsgált minták

β -laktoglobulin, krist. tiszta, 98 % β_1 és β_2 (Serva)

Kukoricaliszt, (Borbála, Gazda, Bólyi Mezőgazdasági Rt., NK 643, Monsanto)

Ovalbumin, Grade V, minimum 98 %, kristályosított, liofilizált (Sigma)

Tükrös tájponty, 3 nyaras (Attala Hal Kft)

III. 1. 2. A fehérjék izolálásához használt vegyszerek

CHAPS, 3-[(3-kolamidopropil)-dimetilammonio]-propán-szulfát, (Merck v. Sigma).

DTT, ditiotritol biokémiai célokra (Merck)

Glicerín 99,5 %, analitikai tisztaságú (Merck)

Karbamid, biokémiai célokra (Merck)

Nátrium-tetraborát, bórax. puriss. (Reanal)

Nonidet P-40 (Fluka)

SDS, nátrium-dodecil-szulfát, ultra tiszta >99%, Sigma

III. 1. 3. A háromfázisú megoszláshoz használt vegyszerek

Ammónium-szulfát, analitikai tisztaságú (Merck ill. Reanal)

tert-butil-alkohol, HPLC tisztaságú (Sigma)

Nátrium-acetát, analitikai tisztaságú (Reanal)

Nátrium-hidroxid, puriss.(Merck)

Trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán, analitikai tisztaságú (Merck ill. Reanal)

III. 1. 4. Az elektroforézisekhez használt vegyszerek

Akrilamid/bisakrilamid oldat (29:1) (BioRad)

Ampholine pH 3,5-10, pH 5-8 (LKB)

APS, ammónium-peroxi-diszulfát, analitikai tisztaságú (Reanal)

BPB, brómfenolkék, (Reanal)

CHAPS, 3-[(3-kolamidopropil)-dimetilammonio]-propán-szulfát, (Merck v. Sigma).
Coomassie Brilliant Blue G 250 (Reanal és Merck)
Ecetsav 96 %-os, analitikai tisztaságú (Reanal)
Karbamid, biokémiai célokra (Merck)
Glükóamiláz, *Aspergillus niger*, 70 U/mg (Serva)
orto-Foszforsav 85 %-os, analitikai tisztaságú (Reanal)
Pharmalyte pH 3-10 (Pharmacia)
SDS, nátrium-dodecil-szulfát, ultra tiszta >99%, Sigma
TCA, triklór-ecetsav, analitikai tisztaságú (Reanal)
TEMED, tetrametiletilén-diamin, analitikai tisztaságú (Reanal)

III. 2. Eszközök

Hoefler miniVE vertikális elektroforézis készülék (Amersham-Pharmacia)
VEF-030 MIDGEL vertikális elektroforézis készülék (Biocenter)
Elektroforézis tápegység (Labor MIM)
J2-21 centrifuga (Beckman)
IEC Multi RF centrifuga (IEC)
Sigma 1-13-mikrocentrifuga (B. Brown Biotech International)
JASCO 7850 spektrofotométer
Rázógép (Assistent, Karl Hecht Ag)
Vizfürdős rázó gép (Labor MIM)
pH-mérő, ISFET, IQ120 (IQScientific)
Vortex keverő (Assistent, Karl Hecht Ag)
Fémszita, 500 µm lyukbőségű
Nikon Coolpix 880 digitális fényképezőgép

III. 3. Módszerek

III. 3. 1. Fehérjeoldatok készítése tisztított fehérjékből (ovalbumin, β -laktoglobulin)

Az ovalbumin háromfázisú megoszlásának tanulmányozásához desztillált vízzel 50 mg/ml törzsoldatot készítettem. Az 50 mg/ml β -laktoglobulin törzsoldatot 1,25 % relatív telítésű ammónium-szulfát oldattal készítettem. A kukoricafehérjék háromfázisú megoszlásának modell oldata ml-enként 25 mg glükóamilázt és 25 mg ovalbumint tartalmazott. A fehérjeátvitel és reprodukálhatóság vizsgálatához a modellfehérje oldatot (7 mg/ml) 0,0125 M borátpufferrel (pH 10,0) készítettem.

III. 3. 2. Kioldható összes fehérje izolálása kukoricalisztből

A Borbála és Gazda kukoricaszemeket mechanikai aprítás után, az NK 643 kukoricafajta daráját pedig közvetlenül, kávédarálóban liszt finomságúra őröltem. Az így kapott liszteket 500 μ m lyukbőségű fémszítán átszítáltam. A kísérletekhez minden esetben ezeket a liszteket ($d < 500 \mu$ m) használtam.

A kukoricafehérjék kinyerésére a Hamaker és munkatársai (1995) által leírt Wallace-módszer kismértékben módosított változatát alkalmaztam. Egy súlyrész liszthez 10 térfogatnyi borát puffert (0,0125 M nátrium-borát, 1 % SDS, 0,5 % DTT (eredetileg 2 % 2-ME), pH=10) adtam, és 1 órán át rázógépen (Assistent, 300fordulat/perc) rázatva extraháltam szobahőmérsékleten. A kapott szuszpenziót 5000xg-vel, 20 percig, 20°C-on centrifugáltam, a felülúszót gyűjtöttem, és alikvot részeket tároltam -25°C-on.

III. 3. 3. Ponty szarkoplazma fehérjék izolálása

A -25 °C-ról felengedett, 15 cm-nél nagyobb pontyokból - az AOAC 937.07 szabvány szerint mintázva – halanként 3 szeletet vágtam ki. A pontyszeletek fehér izmából dugófűrőhöz hasonló, 2 cm belső átmérőjű eszközzel további kb. 0,5-1 cm vastag korongokat vágtam. A korongokat középen csipesszel átszúrtam és a 9. ábrán látható műanyag szeparátorba helyeztem, amit Penny (1975), illetve Kocher és Foegeding (1993) eredményeinek figyelembevételével házilagosan konstruáltam. Az 50 ml-es műanyagcsövekbe helyezett mintákat 650xg-vel centrifugáltam 15°C-on, 20 percen át. Az egy halból centrifugált pontyhúsleveket (spun drip) egyesítettem, és azok alikvot térfogatait -25°C-on tároltam. Busa, csirke, marha és sertésizomból a fentivel azonos módon izoláltam húslevet.



9. ábra

Centrifugált húslé kinyerésére alkalmas műanyag szeparátor

A dripből az alábbi módon készítettem a nem egyensúlyi pH gradiens elektroforézishez (NEpHGE) alkalmas mintákat:

A pontydrip tömény fehérjeoldat, ebből kis mennyiséget oldottam glicerines lysis solution-ban (GLS). A GLS összetétele: 9 M karbamid, 2 m/V % CHAPS, 1 % DTT, 0,8 % Ampholine pH 3,5-10, valamint 10 % glicerol (a lemez formátumú NEpHGE savas tartományában tapasztalható fehérjediffúzió csökkentésére). Például 61 mg/ml fehérjekoncentrációjú pontydrip oldat 8 µl-ét 92 µl GLS-ben oldva 4,9 mg/ml töménységű oldatot kapunk, ami közvetlenül alkalmazható nem egyensúlyi pH gradiens gél elektroforézishez, vagy izoelektromos fókuszáláshoz.

III. 3. 4. Mintakészítés elektroforézishez a HFM-mel kapott középrétegekből

A fehérjekorong +4°C-os 70 %-os etanollal és/vagy +4°C-os desztillált vízzel való mosása után a maradék folyadékot Finn pipettával eltávolítottam, és Vortex készülékkel kevertetve minimális térfogatú "A" extraháló pufferben (AEX: 0,1 M Trisz-HCl, pH 6,8, 0,3 % SDS) oldottam.

Az AEX-pufferrel készített fehérjeoldat pH-ját 8,0-ra állítottam (100 µl oldathoz 5 µl 1 M Trisz hozzáadásával). Eppendorf csőbe előre bemért 126 mg karbamidra öntöttem a 105µl fehérjeoldatot 45 µl "B" extraháló pufferrel (4,75 M karbamid, 4 % CHAPS, 1 % Ampholine pH 3,5-10, 0,7 % DTT) együtt (így a kiindulási fehérjeoldat 2,4-szeresére hígult, Rabilloud, (2000)).

Nagyobb mintaszám esetében a fehérjék közvetlen oldása GLS-ben egyenértékű mintákat eredményez, és munkaigénye kisebb.

III. 3. 5. Fehérjetartalom meghatározása

- Spektrofotométerrel a 280 nm-en mért elnyelés alapján.

Az egyféle fehérjekomponenst tartalmazó oldatok, így a β -laktoglobulin és ovalbumin koncentrációját, az A_{280} értékből határoztam meg:

(β -laktoglobulin, 10 mg/ml oldat, 1 cm fényút, $A_{280\text{nm}} = 9,7$

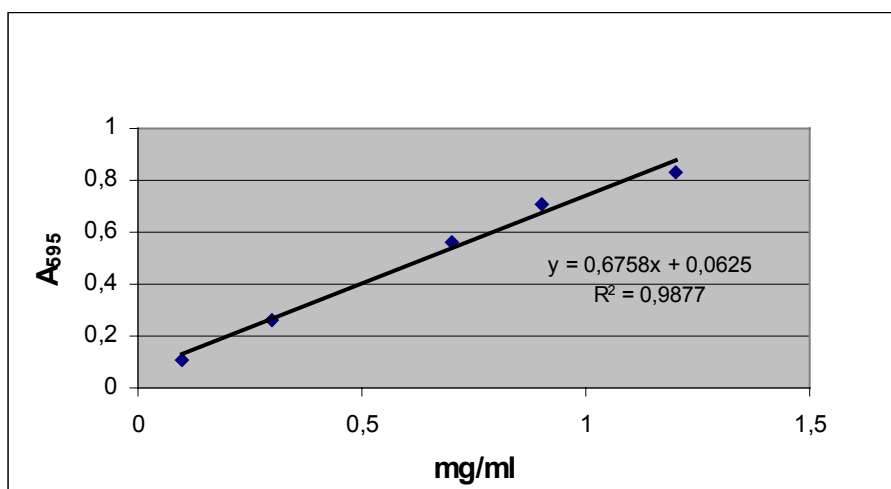
ovalbumin 10 mg/ml oldat, 1 cm fényút, $A_{280} = 7,5$).

- Festékkötődésen (A_{595}) alapuló Bradford standard módszerrel.

A pontydrip, illetve a kukorica összes kioldható fehérjetartalmát a festékkötődésen alapuló módszerrel határoztam meg (Bio-Rad fehérje assay). Ez a módszer a 0,2-1,4 mg/ml tartományban detektálja a 3-5 kDa-nál nagyobb molekulatömegű fehérjéket.

A mérés menete a következő:

1. Egy térfogat koncentrált festék reagenst (Bio-Rad) 4 térfogat desztillált vízzel hígítunk, és Whatman #1 szűrőpapíron szűrjük. Szobahőmérsékleten tárolva kb. 2 hétig használható.
2. BSA törzsoldatból legalább öttagú hígítási sort készítünk a 0,2-1,2 mg/ml tartományban.
3. Műanyag csövekbe 0,1 ml fehérjeoldathoz 5,0 ml hígított festék reagenst pipetázunk. (A nagy mintaszámok miatt az arányt 20 μ l fehérjeoldatra és 1,0 ml festék reagensre módosítottam).
4. A csöveket enyhén vortexeljük, és szobahőmérsékleten legalább öt percig, de legfeljebb 1 óráig állni hagyjuk.
5. Az oldatok A_{595} értékét fehérjét nem tartalmazó blank oldathoz képest mérjük, és a kalibrációs egyenes segítségével határozzuk meg a minták fehérjetartalmát. A 10. ábrán egy jellemző kalibrációs egyenes látható:



10. ábra

Bradford fehérjemérési módszer kalibrációs egyenese

III. 3. 6. HFM rendszerek készítése ovalbumin és β -laktoglobulin vizsgálatához

A háromfázisú rendszereket a 3. táblázatban megadott, 25°C-on termosztált komponensek összemérésével készítettem. A megosztó rendszereket a továbbiakban relatív telítés/térfogatszázalék megadásával jelöltem, így például 30/17 jelölés 30 % relatív ammónium-szulfáttelítésű, 17 térfogat% *terc*-butil-alkoholt tartalmazó rendszert jelöl.

3. táblázat. HFM rendszerek összemérési táblázata

Relatív telítés %	Telített ammónium-szulfát(ml)	Desztillált víz (ml)	Fehérjeoldat (ml)	<i>terc</i> -butil-alkohol (ml) 17 %	<i>terc</i> -butil-alkohol (ml) 34 %	<i>terc</i> -butil-alkohol (ml) 50 %
30 %	0,6	1,0	0,4	0,4	1,0	2,0
50 %	1,0	0,6	0,4	0,4	1,0	2,0
70 %	1,4	0,4	0,4	0,4	1,0	2,0

A 0,4-0,4 ml fehérjeoldat hozzáadása után a műanyag csöveket (bio vial) rövid ideig vortex készülékkel kevertettem, és a *terc*-butil-alkohol hozzáadása után a kilenc rendszert a Beckman bio vial csőtartóban egyszerre ráztam össze. A harmadik fázis magasságát először 15 perc eltelté után 1xg, **A** (cm), majd 200xg, 5 perc után, **B** (cm), végül 4500xg, 5 perc, után **C** (cm), mértem jó megvilágításnál tolómérce alkalmazásával. (A 200xg, illetve 4500xg-értékeket JS-7.5 kilendülő fejű rotorral 1000, illetve 5000 fordulat/perc-en teljesíti a Beckman J2-21 centrifuga). A harmadik fázisban levált fehérje mennyiségét (P%), az irodalmi részben megadott (2) összefüggés szerint határoztam meg.

III. 3. 7. Kukorica- és pontyfehérjék vizsgálata háromfázisú rendszerekben

A borát pufferrel kioldott kukoricafehérjék, és a ponty szarkoplazma fehérjék háromfázisú megoszlásához 4. táblázatban feltüntetett összetételű megosztó rendszereket (21/30) alkalmaztam.

4. táblázat. Kukorica- és pontyfehérjék vizsgálatához alkalmazott HFM rendszerek összetétele

pH	Telített ammónium-szulfát(ml)	Puffer (ml)	Desztillált víz (ml)	Fehérjeoldat (ml)	<i>terc</i> -butil-alkohol (ml)
3,7	0,21	0,2 acetát pH 3,6	0,54	Ponty szarkoplazma 0,05	0,43
4,4	0,21	0,2 acetát pH 4,6	0,54	Ponty szarkoplazma 0,05	0,43
5,5	0,21	-	0,74	Ponty szarkoplazma 0,05	0,43
8,0	0,21	0,06 1M TriszHCl	0,68	Ponty szarkoplazma 0,05	0,43

		pH8,8			
4,8	0,21	0,44 acetát pH 3,6	-	Kukorica 0,35	0,43
6,7	0,21	0,44 acetát pH 4,6	-	Kukorica 0,35	0,43
7,9	0,21	-	0,44	Kukorica 0,35	0,43

Az összemérés sorrendje mindig azonos volt: előre elkészített (telített ammónium-szulfát oldatból és vízből, illetve puffer oldatból álló) számított térfogatú sóoldat, fehérjeoldat, és *terc*-butil-alkohol. Minden komponenst és a háromfázisú rendszereket is 25°C-on termosztáltam. A megosztás kivitelezése és a centrifugálással (Sigma 1-13 mikrocentrifuga, 1700 rpm →200xg, 8500 rpm→4500xg) kapott mintázat értékelése az ovalbuminra és β -laktoglobulinra leírt protokoll szerint történt.

III. 3. 8. A *terc*-butil-alkoholos fázis spektrofotométeres vizsgálata

A kukorica és pontyminták háromfázisú megoszlásakor kapott szerves fázisok UV-spektrumát félmikro kvarcküvetében JASCO 7850 spektrofotométerrel vettem fel. Az opalizálás elkerülésére 1 térfogat *terc*-butil-alkoholos fázist 6 térfogatnyi 70 % etanollal hígítottam.

III. 3. 9. Nem egyensúlyi pH-gradiens elektroforézis (NEpHGE) lemez formátumban

A NEpHGE korábban kidolgozott lemez formátumú változatát (Szamos et al.1988b) alkalmaztam a harmadik fázisban levált fehérjék vizsgálatához. A nem egyensúlyi pH gradiens elektroforézis első leírásában megadott paraméterekkel (O'Farrell et al. 1977) dolgoztam, de a gél összetételében a C%-ot 5,4-re növeltem, illetve a Nonidet P-40 nem ionos detergens helyett CHAPS ikerionos detergenst alkalmaztam (Rabilloud, 2000).

A Hoefer miniVE elektroforézis készülék cellájában (8 ml) készített, nem egyensúlyi pH gradiens gél lemezhez a következő reagensekre van szükség: 4,4 g karbamid, 1,05 ml 30 % akrilamid oldat (5,4 % C), 0,44 g CHAPS, 0,4 ml Pharmalyte (pH 3-10), 3,34 ml víz, 10 μ l TEMED. A gél keveréket vízsugárszivattyúval gáztalanítottam, majd a polimerizációt 16 μ l APS hozzáadásával iniciáltam. A gél oldatot a cellába töltöttem, belehelyeztem a „fésűt”, és egy éjszakán keresztül polimerizáltam.

A III.3.4. fejezet szerint készített minták feltöltése után, azokra 20-20 μ l minta "felülrétegező" oldatot (8 M karbamid, 0,8 % Ampholine pH 5-8, 0,2 % Ampholine pH 3-10) rétegeztem, majd a felső tartályba 0,01 M foszforsavat, az alsó tartályba 0,02 M nátrium-hidroxidot töltöttem. Az elektroforézist 400 V feszültséggel 150 percen keresztül végeztem.

A NEpHGE-SDS elválasztás első dimenziójához egyetlen miniVE cellában készítettem gél, a fentivel megegyező összetétellel, és módon. Az elektroforézis befejezése után 0,5 cm vastag csíkokat vágtam ki a gél lapból, amelyeket második dimenziós elválasztáshoz alkalmaztam.

III. 3. 10. NEpHGE-SDS-elektroforézis

A második dimenziós elválasztást 14x16x0,12 cm cellaméretű készülékben végeztem. A cellában SDS-t nem tartalmazó, 11 %-os (3,3 % C) gélét készítettem (Rabilloud 2000). A gélét ionmentes vízzel rétegeztem, majd polimerizálódás után minden maradék folyadékot eltávolítottam a felszínéről. Felszínét ionmentes vízzel öblítettem, majd az 1D-gélcsík felvitele előtt szárítottam. Néhány csepp futtató puffer segítségével az 1D-gél buborékmentesen felvihető a 2D-gélre. A gélcsík feletti térbe pipettával gondosan puffert töltöttem, és az elektroforézist szobahőmérsékleten hajtottam végre. A szokásos futtató puffer 0,2 % SDS-t tartalmazott. Az elektroforézist 15 percen át 50 V, majd 110 V feszültségen végeztem, amíg a brómfenolkék marker el nem érte a gél alját.

III. 3. 11. A fehérjék detektálása

Az SDS-géleken koloid G 250 festéssel detektáltam a fehérjéket (Neuhoff et al. 1985, Neuhoff et al.1988). Az elektroforézis befejezése után 30 térfogat% etanol, 2 térfogat% foszforsav összetételű oldatban 3x30 percen át fixáltam a fehérjéket. A gélét ezután 3x20 percig 2 % foszforsavval mostam, majd 30 percen át 2 térfogat% foszforsav, 18 térfogat% etanol és 15 m/V % ammónium-szulfát összetételű oldatban egyenlítettem. Ezután a gél és az oldat térfogata 1%-ának megfelelő, 20 g/l Coomassie Brilliant Blue G 250 -t és 0,2 g/l nátrium-azidot tartalmazó, festékoldatot adtam hozzá, és 24-72 órán keresztül festődni hagytam. Fényképezés előtt a géleket desztillált vízzel mostam a háttér feltisztulásáig.

A pH gradiens géleket 12,5 % triklór-ecetsavval fixáltam 5 percen keresztül, majd az oldathoz 0,25 m/V % Coomassie Brilliant Blue G 250 festékoldatot adva 15 percig festettem (Diezel et al., 1972). Ezután 2 % foszforsavban egy éjszakán keresztül mostam a gél, majd a koloid festés protokollja szerint festettem.

IV. EREDMÉNYEK

IV. 1. Ovalbumin és β -laktoglobulin megoszlása háromfázisú rendszerekben

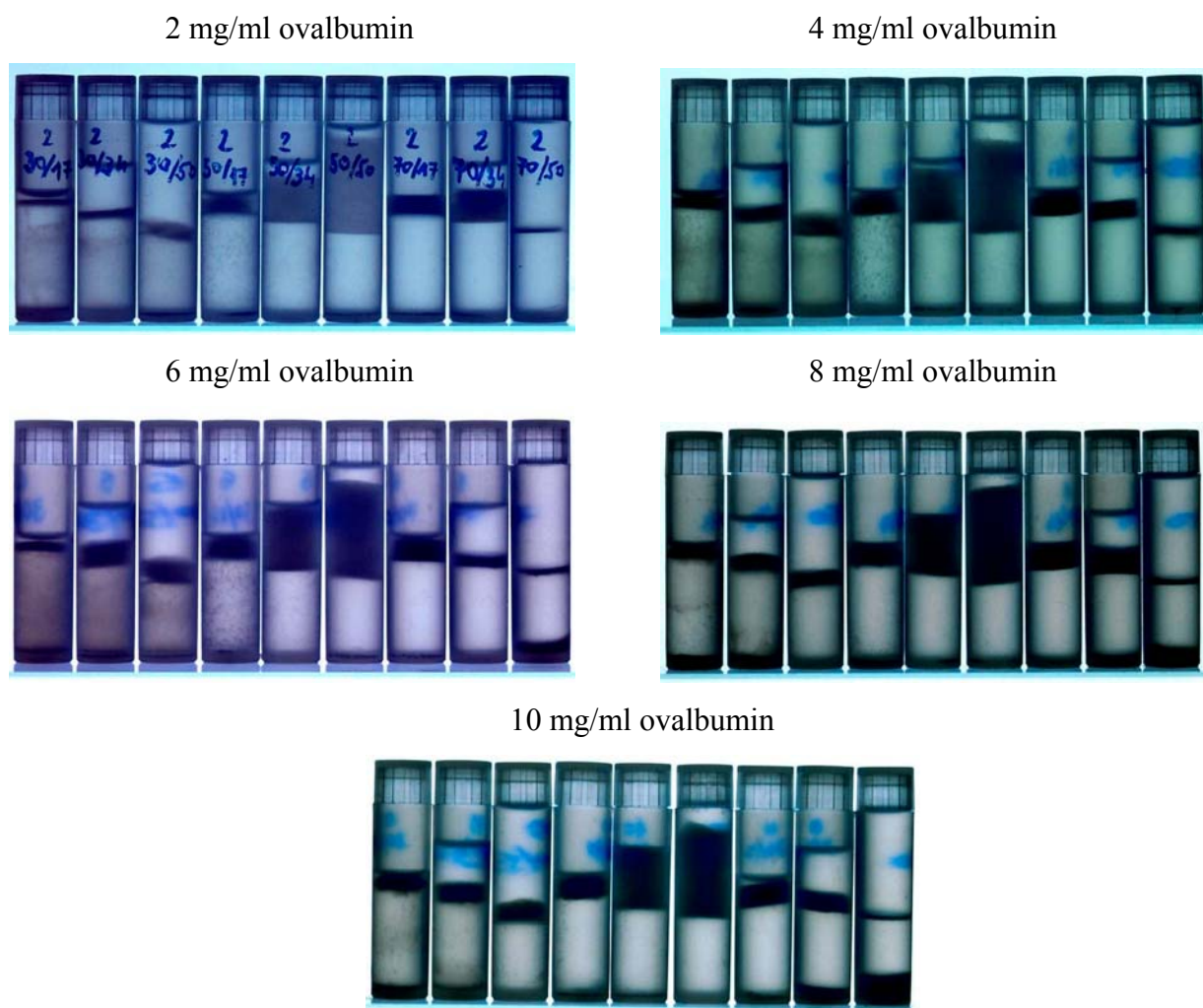
A háromfázisú megoszlás élelmiszervizsgálati alkalmazásához az előzetes kísérletekben bevált megosztó rendszerek összetételének állandóságára, az elkészítés pontosságára, a megoszlás 23-25°C-on történő kivitelezésére, valamint a fő fehérjetípusok háromfázisú rendszerekben mutatott viselkedésének ismeretére van szükség. Az albuminok és globulinok fő fehérje osztályokat képeznek, ezért a vizsgálatukhoz két, élelmiszeripari szempontból fontos fehérjét, az ovalbumint és a β -laktoglobulint választottam (5. táblázat). Mindkét fehérje globuláris, vízdoldhatóságuk 50 mg/ml, izoelektromos pontjuk közötti különbség <1 pH-egységnél, móltömegeik aránya $M_{OVA}/M_{BLG}=1,2$.

5. táblázat. Az ovalbumin és β -laktoglobulin néhány tulajdonsága

Jellemzők	β -laktoglobulin	Ovalbumin
Molekulatömeg	36000 (dimer)	43000
Diszulfid hidak száma	2	1
Izoelektromos pont	5,2	4,6
Hidrofobitás	1060	980
Szénhidrát tartalom	-	6 mol mannóz/mol
$A^{1\%}(280nm)$	9,7	7,5
Oldhatóság (g/ml)	0,05	0,05

A III. 3. 6. fejezetben megadott 3. táblázat szerint készítettem a rendszereket (30/17, 30/34, 30/50, 50/17, 50/34, 50/50, 70/17, 70/34, 70/50 összetétel, és 2, 4, 6, 8, 10 mg/ml fehérjekoncentráció). A (2) összefüggés szerint a harmadik fázisban levált fehérje mennyiségét, míg a centrifugálós módszerrel a harmadik fázis rétegvastagságát ($4500\times g \rightarrow C$) határoztam meg.

A 11. ábrán az ovalbumin megoszlása látható a 2-10 mg/ml fehérje koncentráció tartományban. Adott relatív ammónium-szulfáttelítésen (30%, 50% illetve 70%) a *terc*-butil-alkohol térfogatarányának növekedésével 30/17, 30/34, 30/50, a szerves fázis egyre több vizet vesz fel, ezért a határréteg, mint az a (baloldali első három cső) rendszereken megfigyelhető, egyre alacsonyabban helyezkedik el. Ez a tendencia kisebb mértékben, de érvényesül az 50/17, 50/34, 50/50 (középső három cső), illetve 70/17, 70/34 és 70/50 (jobboldali három cső) rendszerekben is.



11. ábra

Ovalbumin megoszlása kilenc különböző összetételű rendszerben 4500xg hatására
(A rendszerösszetétel balról-jobbra 30/17, 30/34, 30/50 50/17, 50/34, 50/50, 70/17, 70/34, 70/50
relatív ammónium-szulfáttelítés/ *terc*-butil-alkohol térfogat%)

Az ovalbumin középréteg vastagsága (C) az összes vizsgált fehérjekoncentrációjú rendszerben maximum görbe szerint változik: a maximum helye mindig az 50/50 rendszerekben található ($C_{\max} = 2,3$ cm 8 mg/ml fehérjekoncentráción), míg a 2 mg/ml fehérjekoncentrációjú 70/50 rendszerben a legvékonyabb ($C_{\min} = 0,05$ cm). A rétegek szerkezete, különösen a 2 és 4 mg/ml ovalbumin koncentrációjú 50/17, 50/34 és 50/50 rendszerekben, laza, és vastagságuk a *terc*-butil-alkohol mennyiségével nő. A 6, 8 és 10 mg/ml ovalbumin koncentrációjú rendszerekben a 70/50 rendszerben egy negyedik fázis is megjelenik, sőt, a 10 mg/ml ovalbumin koncentrációjú rendszerben már a 70/34 rendszerben is. Ennek valószínű oka az, hogy ilyen nagy töménységű fehérjeoldatban a fehérje és az alkohol közötti asszociáció részleges, és a nagysebességű

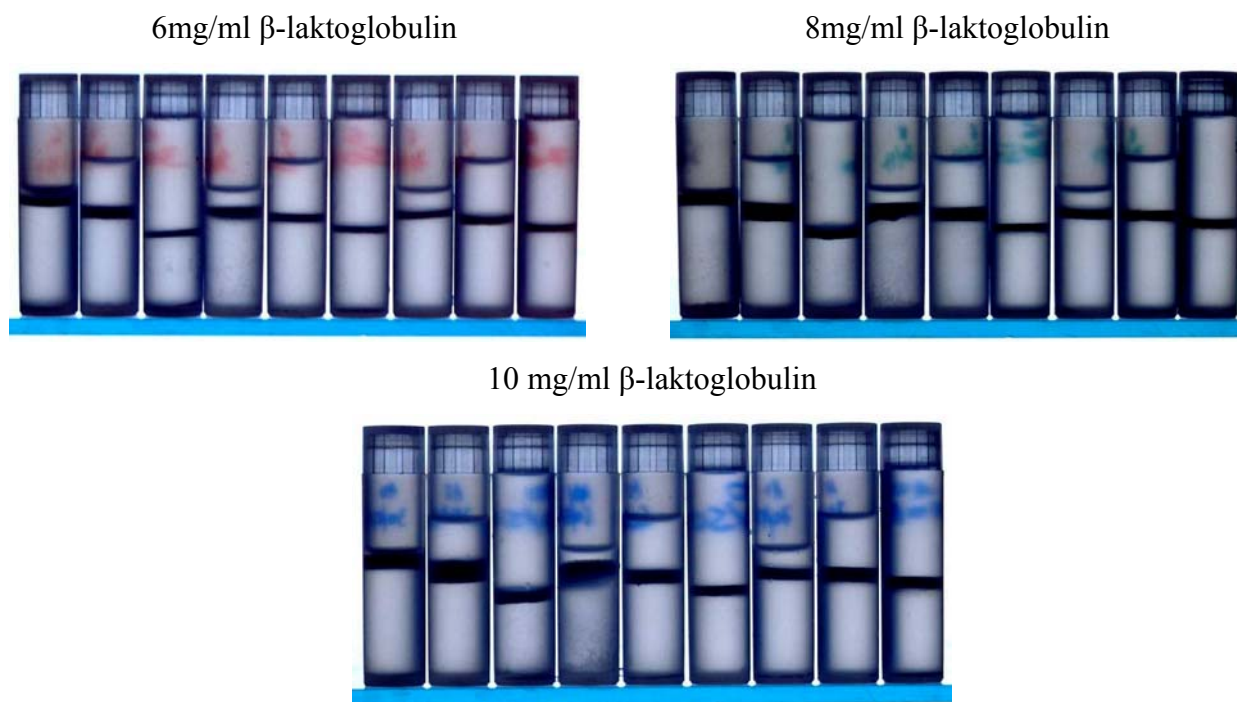
centrifugálás hatására a fehérje egy része „leszakad”, és a cső aljára kerül. A középrétegben levált, P%-ban megadott ovalbumin mennyiségeket és a C rétegvastagságokat tünteti fel a 6. táblázat. A 30/17 rendszertől az 50/17 rendszerig a levált fehérje mennyisége kb. 14 %-os csökkenést mutat, az 50/17 rendszertől a 70/17 rendszerig meredeken, kb. 46 %-kal nő, és ezután gyakorlatilag már nem változik.

6. táblázat. Az ovalbumin háromfázisú megoszlásának adatai

Megosztó rendszer	P % 4 mg/ml	C _{4500xg} cm	P % 6 mg/ml	C _{4500xg} cm	P % 8mg/ml	C _{4500xg} cm	P % 10mg/ml	C _{4500xg} cm
30/17	69,0	0,15	69,4	0,20	63,1	0,20	61,5	0,30/0,1 [*]
30/34	65,2	0,30	61,3	0,50	60,5	0,40	63,6	0,40
30/50	53,7	0,50	51,7	0,60	46,5	0,40	60,5	0,50
50/17	53,6	0,50	54,0	0,50	47,8	0,40	53,1	0,60
50/34	61,0	1,30	59,3	1,50	51,1	1,40	55,0	1,40
50/50	85,4	2,20	83,5	2,20	83,1	2,3 max	89,6	2,10
70/17	98,8	0,50	97,7	0,50	96,6	0,50	99,3	0,55
70/34	94,6	0,45	98,2	0,30	97,5	0,60	99,4	0,40
70/50	97,8	0,1 min	97,8	0,15	97,8	0,10/0,25 [*]	99,7	0,10/0,5 [*]

^{*}-gal jelzett értékek a cső alján található negyedik fázis vastagságát jelzik

A β -laktoglobulin megoszlási mintázatai a 12. ábrán láthatók.



12. ábra

β -laktoglobulin megoszlása kilenc különböző összetételű rendszerben 4500xg hatására
(A rendszerösszetétel balról-jobbra 30/17, 30/34, 30/50 50/17, 50/34, 50/50, 70/17, 70/34, 70/50
relatív ammónium-szulfáttelítés/ *terc*-butil-alkohol térfogat%)

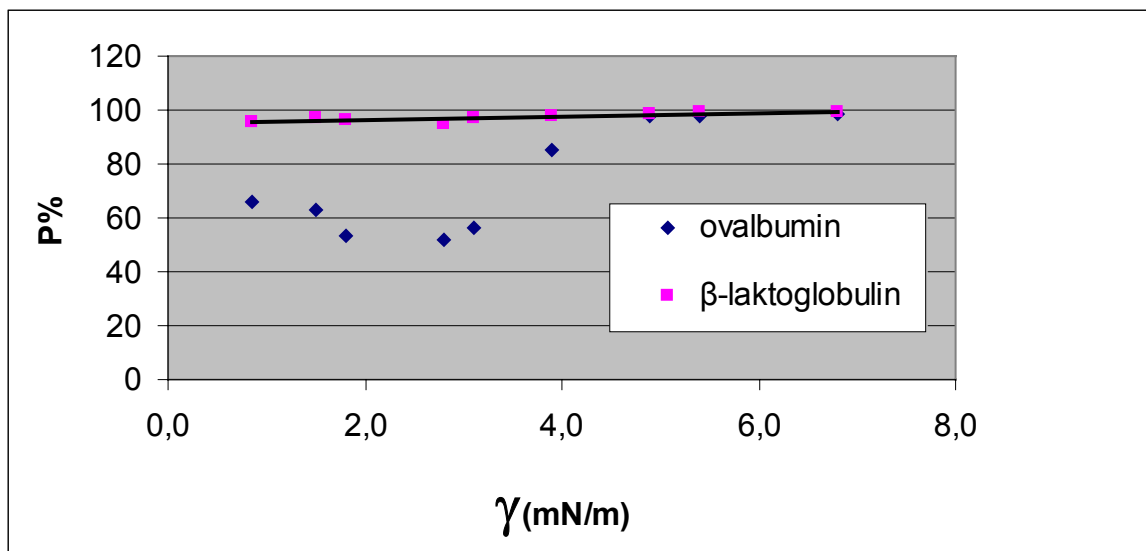
Feltűnő különbség az ovalbumin megoszlásához képest, hogy a fehérjerétegek mindegyik rendszerben vékonyabbak és kompaktabbak. A legnagyobb C érték mindegyik fehérjekoncentráción a 30/34 rendszerekben mérhető ($C_{\max} = 0,5$ cm a 10 mg/ml, 30/34 rendszerben). A határfelület elhelyezkedésének tendenciája az ovalbuminra megfigyelttel egyezik. A 6–10 mg/ml β -laktoglobulin koncentrációtartományban egyik rendszerben sem képződik negyedik fázis, ugyanakkor, amint az a 7. táblázatban látható, a határrétegben levált β -laktoglobulin mennyisége jelentősen eltér az ovalbuminra mért értékektől.

7. táblázat. A β -laktoglobulin leválása különböző összetételű megosztó rendszerekben

Megosztó rendszer relatív só telítés/ <i>terc</i> -butil-alkohol	P % (átlag $\pm$ SD)
30/17	95,6 $\pm$ 1,4 (n=5)
30/34	96,7 $\pm$ 0,9 (n=4)
30/50	96,0 $\pm$ 0,9 (n=4)
50/17	95,0 $\pm$ 3,1 (n=3)
50/34	96,8 $\pm$ 2,0 (n=4)
50/50	98,0 $\pm$ 0,7 (n=5)
70/17	98,8 $\pm$ 0,5 (n=5)
70/34	99,1 $\pm$ 0,2 (n=4)
70/50	99,0 $\pm$ 0,2 (n=3)

Már a legkisebb relatív sótelítettségű és *terc*-butil-alkohol tartalmú (30/17) rendszerből is a középrétegbe jut a β -laktoglobulin kb. 96 %-a, és a kicsapó ágensek mennyiségének növekedésével ez az érték lassan 100 %-hoz közelít. A középrétegek vastagsága 0,10 $\pm$ 0,05 cm (2,0 mg/ml rendszerek) és 0,32 $\pm$ 0,09 cm (10 mg/ml rendszerek) között változik, az ovalbumin rétegekhez viszonyítva ezek a fehérjekorongok sokkal tömörebb szerkezetűek.

A harmadik fázisban levált fehérje mennyiségét a vizsgált koncentrációtartományokra átlagolva, és a fehérjét nem tartalmazó kétfázisú kiindulási rendszerek határfelületi feszültségének függvényében ábrázolva megállapítható, hogy a β -laktoglobulin és az ovalbumin megoszlása jelentős eltérést mutat (13. ábra).



13. ábra

A harmadik fázisban levált β -laktoglobulin és ovalbumin mennyisége, a kétfázisú vonatkoztatási rendszerek határfelületi feszültségének függvényében

A levált ovalbumin mennyisége a 0,86-2,8 mN/m tartományban folyamatosan csökken, ezután 4,9 mN/m értékig meredeken nő, majd állandósul. A 2,8-4,9 mN/m tartományban a levált ovalbumin mennyisége jó lineáris függést mutat a vonatkoztatási rendszerek határfelületi feszültségével ($y=23,14x-11,98$, $n=4$, $r^2=0,94$). A β -laktoglobulin oldatokból kivált fehérje mennyisége ugyanakkor gyakorlatilag független a megosztó rendszerek összetételétől, illetve határfelületi feszültségétől.

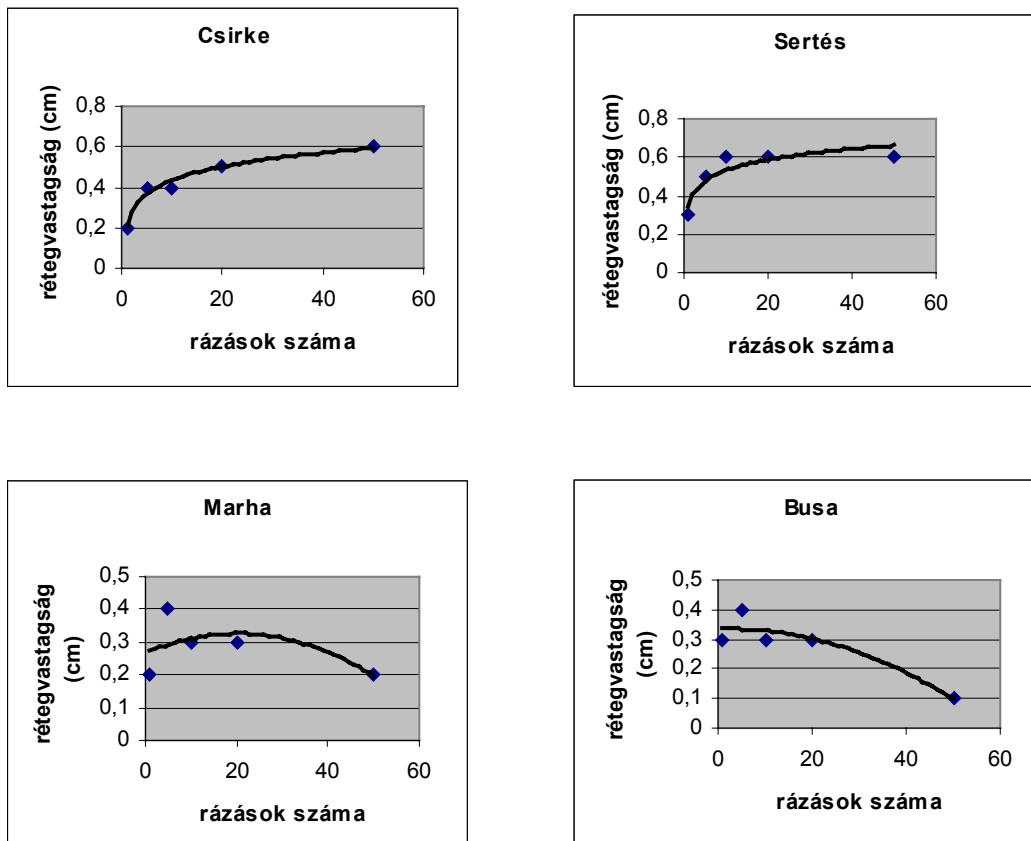
Összefoglalva megállapítható, hogy az ovalbumin és β -laktoglobulin megoszlása egyenként 45 különböző összetételű rendszerben a teljes vizsgált tartományban szignifikáns különbségeket mutat, vagy a centrifugálás hatására kialakuló rétegek vastagságát, vagy pedig a rétegeket alkotó fehérje mennyiségét illetően. A vizes fázisban oldott β -laktoglobulin már kismennyiségű kicsapó szer hatására a harmadik fázisba jut, míg az oldott ovalbumin teljes mennyisége csak a kicsapó komponenseket nagy mennyiségben tartalmazó (70/17, 70/34 és 70/50) rendszerekben jut a harmadik fázisba. Az ovalbumin és a β -laktoglobulin a centrifugált fázisok geometriai paraméterekkel jellemezhető mintázatai alapján egyértelműen megkülönböztethetők egymástól. A teljes kísérletsorozat adatait a melléklet tartalmazza (M2 1-10 táblázatok).

IV. 2. A mechanikai energia szerepe a háromfázisú megoszlásban

A háromfázisú megoszlásnak van egy olyan paramétere, amelyre vonatkozó adatokkal egyetlen publikációban sem találkozunk, ez a kiindulási, kétfázisú rendszerrel közölt mechanikai energia. Az általánosan alkalmazott eljárás szerint a rendszert alaposan össze kell rázni, majd ezt követően spontán, vagy kisebb sebességű centrifugálás hatására bekövetkezik a fázisszétválás. Mivel a „mikroszkópos” határfelület a rázás erősségének és időtartamának függvényében alakul ki, az eltérő energiaközlés, főleg a nagyobb számú fehérjekomponenst tartalmazó rendszerekben, különböző végállapotokra vezethet. Ennek a hatásnak a vizsgálatára végeztem az alábbi kísérletsorozatot.

Egy Rotadeszt készülékkel: 66 rpm-mel egy percre tartó forgatással közölt energia hatására a β -laktoglobulint tartalmazó rendszerből, a kézzel összerázott, ugyanolyan összetételű rendszerhez képest az oldott fehérjének csak töredéke vált le a harmadik fázisban. Az eredmény szerint az adott elrendezésben a folyadék kinetikai energiája nem volt elegendő a rendszer intenzív összerázásához.

A hatás vizsgálatára ezért az alábbi megközelítést alkalmaztam. Busa (B), csirke (Cs), marha (M) és sertés (S) izmából a szeparátorral húsleveket izoláltam, és 5-5 azonos összetételű rendszert készítettem (50 μ l húslé, 950 μ l 42 % relatív telítésű ammónium-szulfát oldat, 310 μ l *terc*-butil-alkohol). A 4x5 csövet kb. 60 cm úthosszon egyenként 1x, 5x, 10x, 20x és 50x egyenletes sebességgel összeráztam és centrifugálás (4500xg) után mértem a C értékeket, valamint a vizes fázisok A_{280} értékeit (az A_{280} értékek itt ellenőrző jellegűek, mert mindegyik minta tartalmaz ezen a hullámhosszon elnyelő egyéb molekulákat is). A 14. ábrán látható, hogy a közölt energia hatása eltérő a különböző fehérjéket tartalmazó mintáknál, amennyiben a C értékek változása a réteg szerkezetében bekövetkezett változásokat tükrözi.



14. ábra

Különböző állatok húslevéből képződött középrétegek méretének függése a HFM során közölt mechanikai energiától

A csirkehúslé fehérjéiből képződött középrétegek vastagsága a közölt mechanikai energia függvényében növekszik, a sertésnél S10 és S50 (tízszer, illetve ötször összerázott sertésminta) között állandósul. Ezekben a mintákban a fehérjék olyan koherens rendszereket hoznak létre, amelyekben a térbetöltés a rendszerrel közölt növekvő mechanikai energia hatására csökken (csirke), illetve állandó értéket vesz fel (S10). Eltérő a busa és a marhahúsfhérjék viselkedése. Mind B5, mind M5 C értéke maximumot (a fehérje térbetöltése minimumot) mutat, majd a további energiaközlés mindkét rendszerben a térbetöltés növekedésére vezet, tehát a busa illetve marhahúsfhérjéből képződő vázszerkezet a rendszerrel közölt mechanikai energia hatására egyre kisebb térfogatú lesz.

A közölt mechanikai energia egy adott értéktől (5–10 összerázás) kezdve az A_{280} értékek alapján legfeljebb 2-3 %-ban befolyásolja a középrétegbe jutó fehérje mennyiségét, tehát az állandónak tekinthető. A kialakult réteg vastagsága azonban az összes mintát és a 10-50 rázás közötti tartományt tekintve másfélszerestől (CS és M) a háromszorosig (B) változik. Ez azt jelenti,

hogy a centrifugálással kapott rétegek méretkülönbségén alapuló centrifugálásos HFM csak akkor alkalmazható kvalitatív vizsgálatra, ha a rendszerrel közölt mechanikai energiát valamilyen módon, például alkalmas berendezés segítségével, szabályozzuk.

IV. 3. Ponty szarkoplazma fehérjék HFM-je, és pH gradiens elektroforézise

A halfehérje kísérletekhez hároméves pontyokból (2 db) izolált halhúslevet használtam, amelynek fehérjetartalma $68,0 \pm 1,3$ mg/ml ($n=4$) volt. A kukoricafehérje megoszlási kísérleteket glükóamilázt és ovalbumint 1:1 arányban (50 mg/ml) tartalmazó referencia fehérjeoldattal is követtem.

A kezdeti kísérletekben puffert nem tartalmazó, 21% és 75% relatív ammónium-szulfát telítésű megosztó rendszereket alkalmaztam a fehérjekorong kvantitatív visszaoldhatóságának vizsgálatára, ami az elektroforézis alkalmazásának alapvető feltétele.

Ez nem egyszerűen teljesíthető feltétel, mivel a korongban található *terc*-butil-alkoholt és ammónium-szulfátot oly módon kell eltávolítani, illetve mennyiségét csökkenteni, hogy közben minimális mennyiségű fehérje menjen oldatba, és a kisméretű molekulák kioldása ugyanakkor ne legyen denaturáló hatású a fehérjékre. Mivel desztillált vízben a só és az alkohol egyaránt jól és pillanatszerűen oldódik, ezzel kezdtem a só- és alkohol eltávolítását. A mosást 0,7 ml 25°C –os desztillált vízzel végeztem (8.táblázat).

8. táblázat. A pontyfehérjéből képződött harmadik fázis oldódása vízben

Minta	Harmadik fázis mosása	Kioldott fehérje mg/0,7 ml
Ponty 21/30	öblítés	0,07
Ponty 21/30	30 s állás	0,35
Ponty 75/30	3 perc állás 12000xg, 1perc	1,05

A táblázat adatai szerint 0,7 ml desztillált vízzel való öblítés 0,07 mg fehérjét old ki a korongból, ami a rendszerbe vitt 3,4 mg pontyfehérje 2,0 %-a. A rövid ideig tartó mosás ugyanakkor valószínűleg nem eléggé hatásos. A kísérletek további eredménye, hogy a 21, illetve a 75 % relatív telítésű rendszerben képződő fehérjekorongok viselkedése desztillált vízben eltérő. A 21 % relatív telítésű rendszerben képződött korong a desztillált víz felszínén úszik, a 75 % relatív telítésű rendszerben képződött pedig, rövid idő elteltével lesüllyed. Mivel azonos g-értéken komprimálódtak, az eltérő viselkedés a *terc*-butil-alkohol tartalomban és a rétegek szerkezetében fennálló különbségekre vezethető vissza. A fehérjekorong visszaoldhatósága tehát a fehérje minőségén kívül függ attól a környezettől, amelyben levált (Pike, Dennison, 1989), és ez egy olyan

tulajdonsága a háromfázisú megoszlásnak, ami az egyszerű kisózás gyakorlatában csak ritkán fordul elő.

A fehérjeleválás és visszaoldás összefüggése miatt a továbbiakban a lassabb kioldódást biztosító 21% relatív telítésű rendszert választottam, és a vizes fázis pH-ját a III.3.7. fejezet 4. táblázata szerint állítottam. Az acetát és trisz-pufferek kisózó hatása csekély és koncentrációjuk a vizes fázisban 0,05 M alatt maradt.

9. táblázat Ponty fehérjék megoszlása különböző pH-jú, 21/30 összetételű rendszerekben.

Minta	Vizes fázis pH	B (cm)	C (cm)	R= B/C
50 µl halhúslé	3,7	0,44	0,1	4,4
50 µl halhúslé	4,4	0,58	0,1	5,8
50 µl halhúslé	5,5	0,95	0,4	2,4
50 µl halhúslé	8,0	1,03	0,6	1,7

A 9. táblázat tartalmazza a ponty szarkoplazma fehérjék háromfázisú megoszlásának eredményeit (a mintákat egyszerre, tizenötösör ráztam össze). A C értékeket a pH függvényében ábrázolva a regressziós egyenes egyenlete,

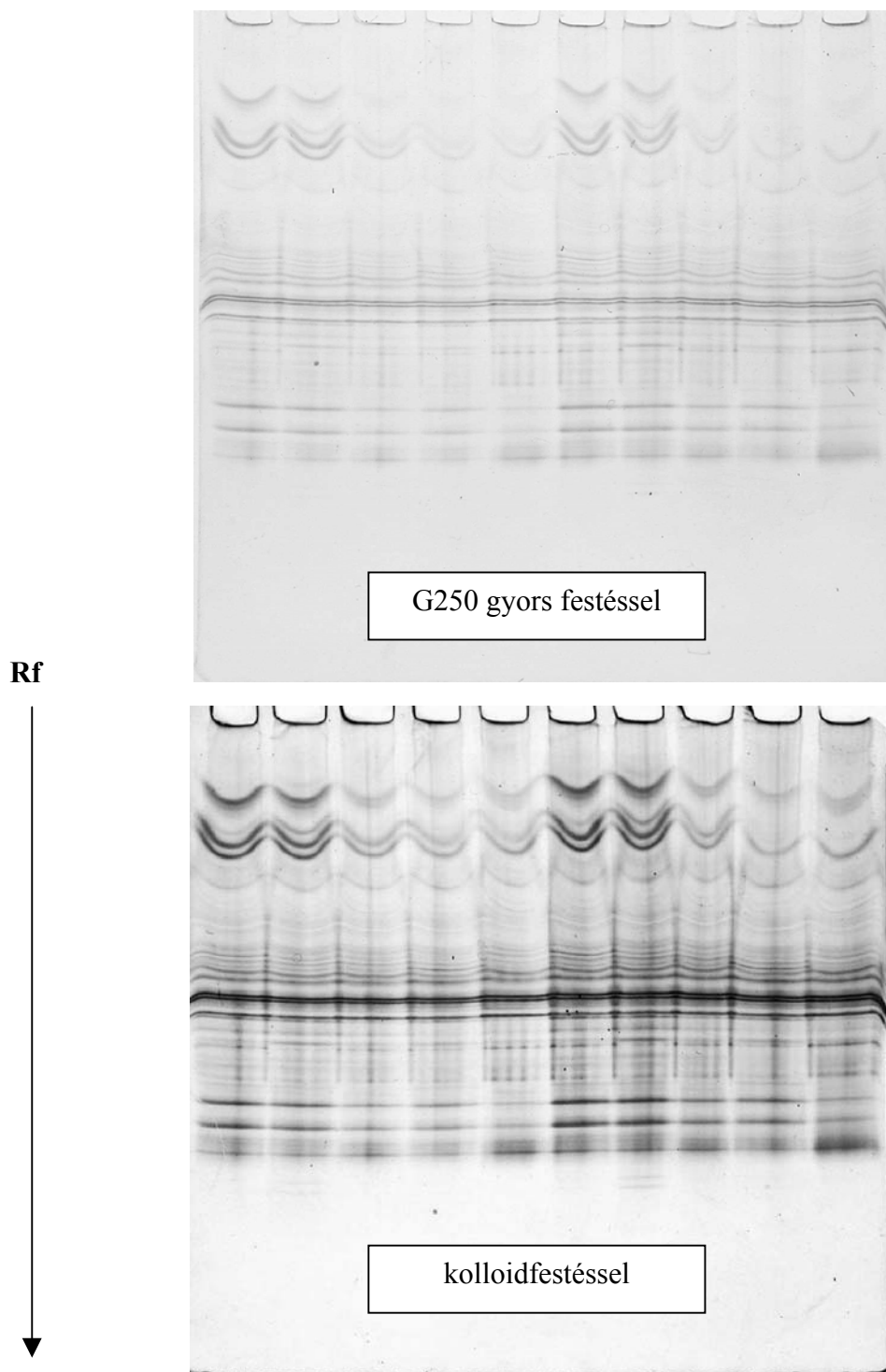
$$C = 0,12 \text{ pH} - 0,36 \quad (n=4, r^2 = 0,90)$$

A vizes fázis pH-ja és a szarkoplazma fehérjékből kialakult harmadik fázis szerkezete között tehát szoros függés van. A pH 3,7 és pH 4,4 rendszerekben képződött korongokat 2-2 ml +4°C-os desztillált vízben 10 percig állni hagytam, majd a korongok lesüllyedése után a vizet a lehető legteljesebb mértékben eltávolítottam, és GLS-ben oldtam azokat. A hideg desztillált vízben az ammónium-szulfát gyorsan, a legtöbb fehérje viszont lassan oldódik, és a szerves oldószer okozta denaturálódás (szerves oldószeres kicsapás), valószínűsége is kisebb. A pH 5,5 és pH 8,8 rendszerekben képződött korongok nem süllyedtek le 10 perc elteltével, ezért azokat +4°C-os 70% etanollal, majd +4°C-os desztillált vízzel mostam. A pH 3,6, 4,4 és 5,5 rendszerekben képződött korongok gyorsan feloldódtak GLS-ben, ugyanakkor a pH 8,0 rendszerben képződött fehérjekorong oldódása lassú volt. Hasonló viselkedést tapasztaltam a referencia fehérjék oldódásában is: az alacsonyabb pH-jú rendszerekben képződött fehérjekorongok gyorsan oldódtak, ugyanakkor a pH 8,0 rendszerből leváló korong az AEX-pufferben gyakorlatilag nem oldódott.

Az 15. ábrán a ponty szarkoplazma fehérjék háromfázisú megoszlással kapott középrétegeinek nem egyensúlyi pH gradiensen való elválasztása látható. A két egymás fölé helyezett ábrán ugyanaz a gél van feltüntetve, csak a felsőn G 250 gyorsfestéssel, az alsón pedig

kolloidfestéssel detektáltam a fehérjéket. Jól kivehető, hogy a kvalitatív detektáláshoz a végállapotig jutó kolloidfestés alkalmazása célszerű. A gyors festés előnye, hogy lehetővé teszi a hosszú kolloidfestési protokoll "átütemezését", tehát a fixált, gyorsfestett gél kolloid festésének a következő napon való elkezdését.

pH = 3,7 4,4 5,5 8,0 5,5^x 3,7 4,4 5,5 8,0 5,5^x

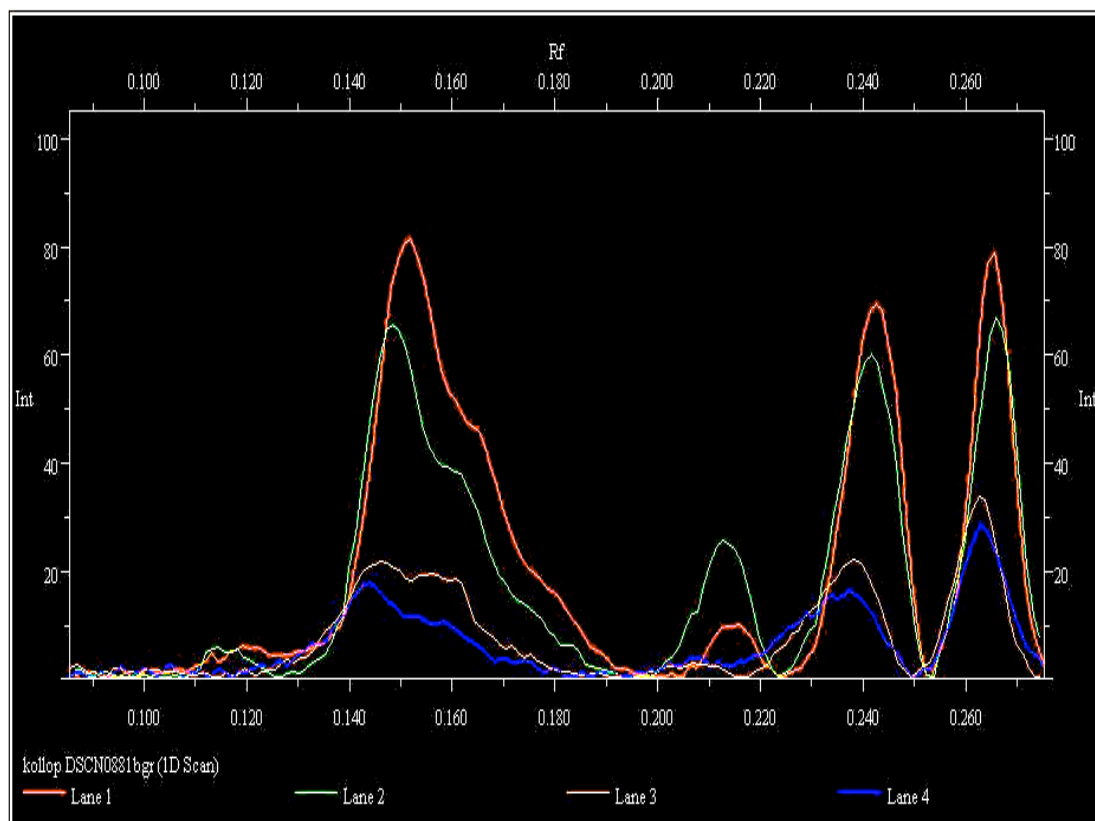


15. ábra

Ponty szarkoplazma fehérjékből különböző pH-jú háromfázisú rendszerekben képződött harmadik fázisok párhuzamos NEpHGE elválasztása kétféle festéssel.

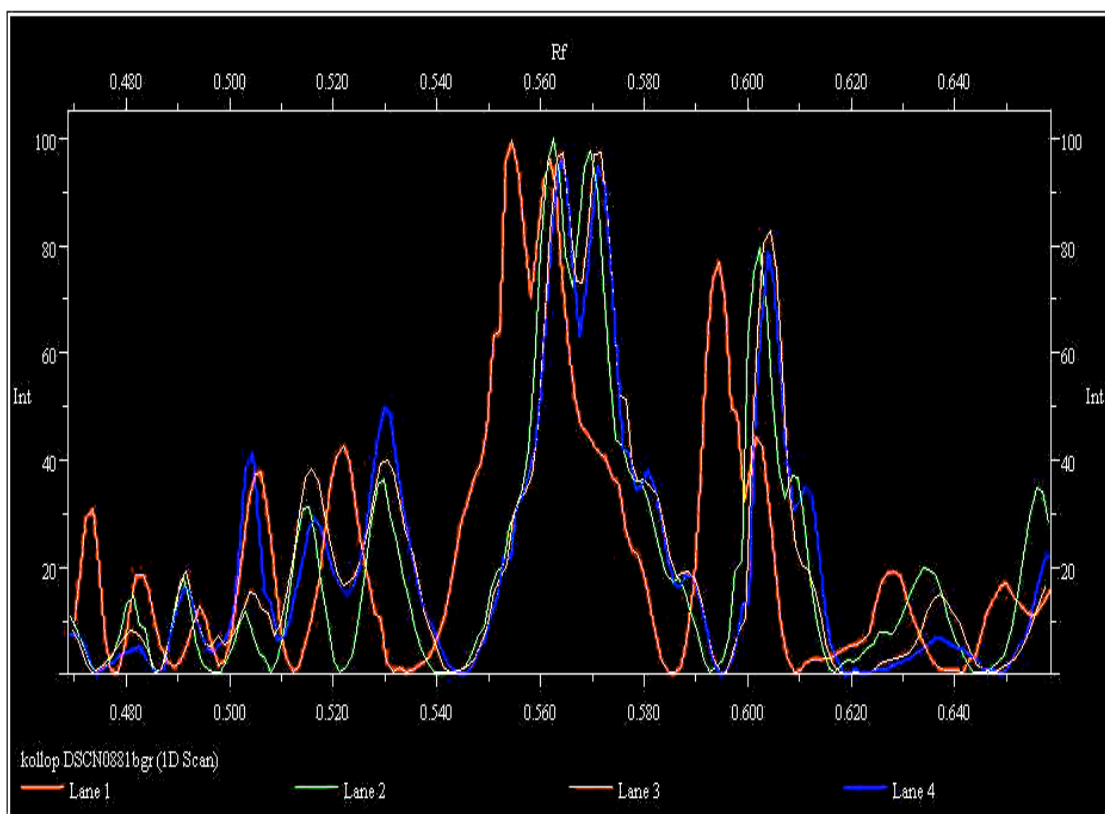
Az ábrán látható gélre az egyes pH-értékekhez tartozó párhuzamos fehérjemintákat vittem fel, az 5,5^x jelzésű mintákat egy másik pontyból izoláltam. Vizuális megítélés alapján a fehérjemintázatok, különösen a pH 5,5 mintáké, a HFM jó megismételhetőségét bizonyítják. A szarkoplazma fehérjék egyes sávcsoportjainak intenzitása fokozatosan gyengül, tehát ezek a fehérjék a vizes fázis pH-jának növekedésével egyre kisebb arányban jutnak a harmadik fázisba. A gél felső részén található savas izoelektromos pontú parvalbuminok, és az alsó részen található bázikus fehérjék intenzitása jóval gyengébb a pH 5,5 és pH 8,0 sávokban, mint a pH 3,7 és pH 4,4 sávokban.

A következő ábrákon (16. 17. és 18. ábrák) a koloidfestésű gél baloldali négy sávjának egymásra vetített denzitogrammjait tüntettem fel, amelyeken a vizuálisan kevésbé érzékelhető változások is előtűnnek. A felsorolt ábrákon a piros vonal a 15. ábra pH 3,7; a zöld vonal a pH 4,4; a rózsaszínű vonal a pH 5,5 és a kék vonal a pH 8,0 sávjának felel meg.



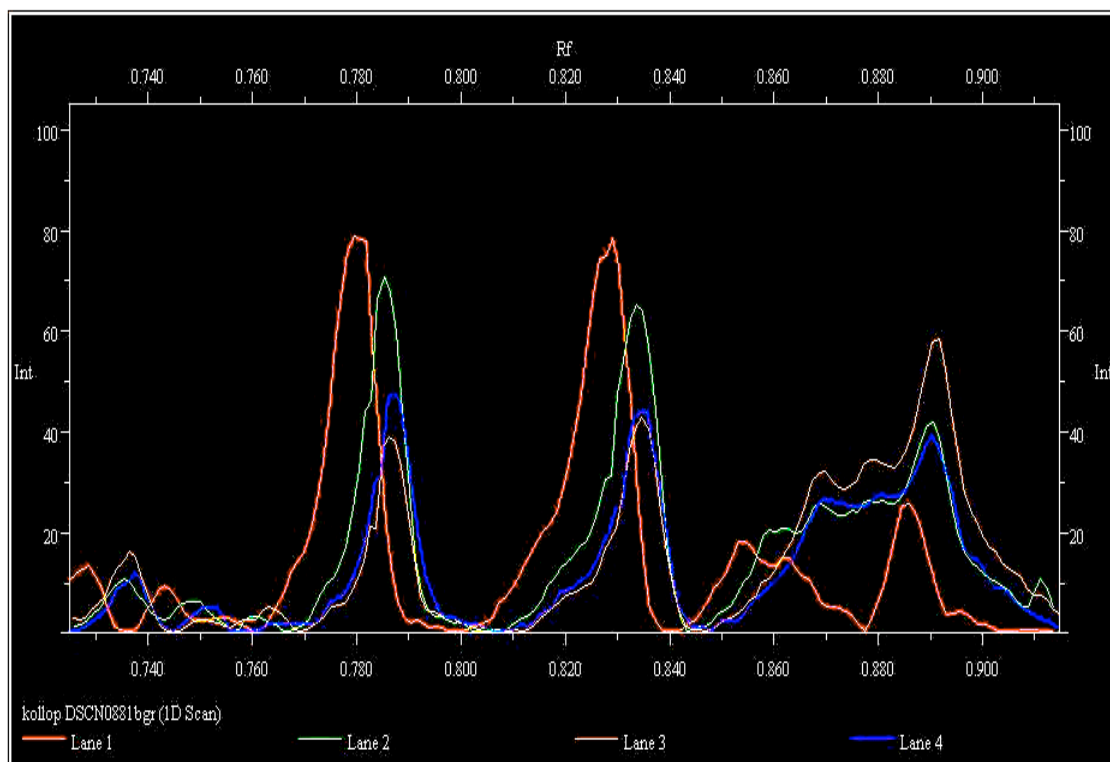
16. ábra

A 15. ábra koloid festett pontyfehérjéinek denzitogramja, a 0,1-0,28 Rf tartományban



17. ábra

A 15. ábra kolloid festett pontyfehérjéinek denzitogramja, a 0,48-0,64 Rf tartományban.



18. ábra

A 15. ábra pontyfehérjéinek denzitogramjai a 0,74–0,90 Rf tartományban.

Az intenzitások arányosak a fehérjék mennyiségével, mivel a kolloidfestésnél a festékmolekulák az összes kötőhelyet elfoglalják, valamint a denzitogram felvétele előtt a háttérintenzitás levonásra került. A 16. ábrán a $R_f=0,13-0,19$, valamint a $R_f=0,23-0,27$ tartományban a középrétegbe jutó parvalbuminok mennyisége körülbelül felére csökken a megosztó rendszer pH-jának növekedésével. Érdekes az $R_f=0,21$ -nél mért intenzitás sorrend változása, ami azt bizonyítja, hogy ennek a parvalbuminnak $pH=4,4$ -hez közeli a pI -je, ezért leválása a harmadik fázisba nagyobb mértékű, mint a $pH=3,7$, vagy $pH=5,5$ rendszerben.

A 17. ábrán a $0,47-0,54$ R_f -tartományban, az egymást nem pontosan fedő (a piros denzitogram kismértékű eltolódása miatt) intenzitásgörbék alapján a legnagyobb eltérés ($R_f 0,50$) 25 % körül van, és érdekes módon ebből a fehérjéből, továbbá az $R_f 0,53$ fehérjéből a $pH 8,0$ rendszerben több válik le a harmadik fázisba, mint a többi pH értéken. A $0,54-0,62$ R_f -tartományban a vizuális képpel egyezően gyakorlatilag mindegyik rendszer ugyanannyi fehérjét tartalmaz, tehát a pH változás nem befolyásolja ezeknek a frakcióknak a harmadik fázisba jutását. A $0,62$ feletti R_f -tartományban és a 18. ábrán látható $0,76-0,84$ R_f -tartományban a pH változása a 16. ábrán látható módon befolyásolja a fehérjék leválását. A legtöbb fehérje itt is a $pH 3,7$ rendszerből jut a harmadik fázisba, azonban a maximális és minimális fehérjemennyiség különbsége csak kb. 40 %-ot tesz ki.

Az eredmények alapján a ponty szarkoplazma fehérjék háromfázisú megoszlása a megosztó rendszer pH -jának növekedésével szignifikáns összetételbeli különbségre vezet, ami a savas és bázikus fehérjefrakciók csökkenő mértékű leválását jelenti a harmadik fázisban. Ez a pH -függő megoszlás egyaránt hasznosítható élelmiszervizsgálati, illetve fehérjetisztítási célokra. Fehérjetisztítási szempontból a kék vonallal jelzett fenti $pH 8$ rendszer előnyös az $R_f 0,54-0,62$ között található fehérjékre, mert csak kevés kísérő parvalbumin fehérjét tartalmaz.

IV. 4. A kukoricafehérjék HFM-je, és nem egyensúlyi pH gradiens elektroforézise

A kukoricafehérjék háromfázisú megoszlását (21/30) összetételű, pH 4,8, pH 6,7 és pH 7,9, rendszerekben vizsgáltam. A HFM vizes fázisainak pH-értékeit az ammónium-szulfát oldat, acetát puffer és borát-pufferben oldott kukoricafehérjék III.3.7.4. táblázatban megadott mennyiségeinek elegyítése után kaptam. A megoszlás néhány paraméterét a 10. táblázat tartalmazza.

10. táblázat. Kukoricafehérjék megoszlása különböző pH-jú háromfázisú rendszerekben

Kukorica	Megoszlás pH-ja	Megoszló fehérje (mg)	C-érték 4500xg	Vizes fázisban maradt fehérje (mg)
Borbála	4,8	4,4	0,05	0,12
Borbála	6,7	4,4	0,03	0,11
Borbála	7,9	4,4	0,05	0,18
Gazda	4,8	4,3	0,05	0,02
Gazda	6,7	4,3	0,04	0,06
Gazda	7,9	4,3	0,03	0,08
NK 643	4,8	4,2	0,06	0,00
NK 643	6,7	4,2	0,04	0,09
NK 643	7,9	4,2	0,17	0,09

A 4500xg hatására kialakult réteg (C), az összes rendszerben nagyon vékony, így a megoszlás centrifugálásos vizsgálata ebben az esetben több okból sem célszerű. Egyrészt a borát pufferrel készített kukoricafehérje oldatok fehérjetartalma kb. 12 mg/ml volt, ez jóval kisebb, mint a ponty halhúslé fehérjekoncentrációja. Másrészt a kukoricafehérjék kb. 50 %-a alkoholban oldódó zein, ami a *terc*-butil-alkoholos fázisban oldódva vesz részt a harmadik fázis kialakításában (ennek mértéke a réteg vastagságával változik). A *terc*-butil-alkohollal asszociált, kicsapódott harmadik fázis tehát nem az összes fehérjéből, hanem annak csak egy frakciójából képződik, így nem reprezentálja a kioldható összes fehérjét. Kihasználva a megosztó rendszer kapacitását, 350 µl kukoricafehérje oldattal 4,2-4,4 mg fehérjét vittem a megosztó rendszerbe, a kis C értékek miatt azonban itt nincs vonatkoztatási lehetőség.

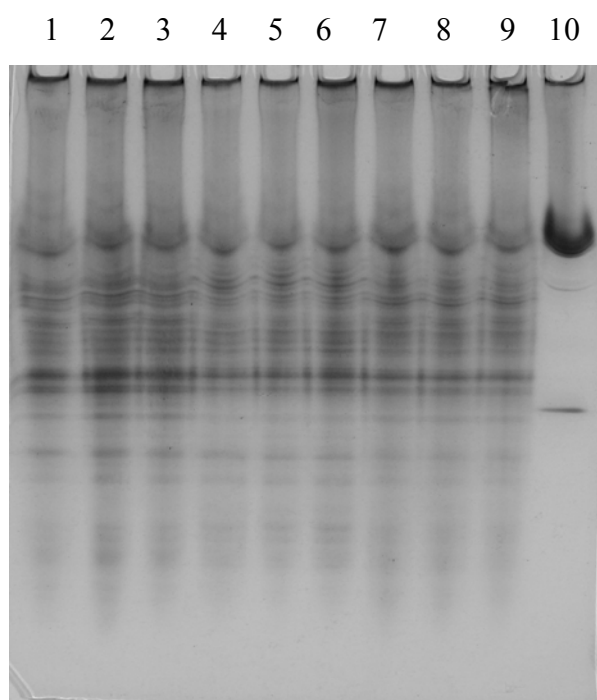
A pontyfehérjék viszonylag gyors visszaoldódásával ellentétben a kukoricafehérjéknél bizonyos pH-függő trendeket lehet megfigyelni. Mivel a harmadik fázis mindig tartalmaz *terc*-butil-alkoholt, a korongokat a folyadékfázisoktól való elválasztás után először 1-1 ml hideg, 70 %-os etanollal mostam. Egy éjszakai állás után GLS-ben történő visszaoldódásuk lassú volt, a pH 4,8 és pH 6,7 korongok 150-150 µl GLS-ben oldódtak, a pH 7,9 minták 200 µl GLS-ben sem oldódtak fel

teljesen. Több oldószerben feloldódhatnak a fehérjék, de elektroforézishez általában előnyösebb töményebb fehérjeoldatot készíteni. A 21% relatív ammónium-szulfát telítésű rendszerben levált fehérjék ismételt oldatba viteléhez tehát mind a hideg desztillált vizes, mind a 70 %-os etanolos mosás alkalmazása indokolt. A háromfázisú megoszlás folyamatának követésére alkalmazott modell fehérjeoldatból (25 mg glükóamiláz +25 mg ovalbumin)/ml) 50 µl-t mértem a rendszerbe és azt tapasztaltam, hogy a levált korongok visszaoldódási tendenciája a kukoricafehérjékével ellentétes. A pH 4,8 és pH 6,7 rendszerekből levált modell fehérjéket tartalmazó korongok 300-300 µl GLS-ben részlegesen oldódtak, a pH 7,9 rendszerben levált korong ugyanakkor gyorsan és maradéktalanul feloldódott.

Az elektroforézis mellett spektrofotométerrel is felvettem a 70 %-os etanollal hígított szerves fázisok spektrumait, amelyek elnyelését azonban elsődlegesen a borát puffer alkotói adták.

A szerves fázis közvetlen pH gradiens elektroforézise azt mutatta (ld. M2 1. ábra), hogy abban számos fehérje oldódik, ezek vizsgálatával azonban nem foglalkoztam.

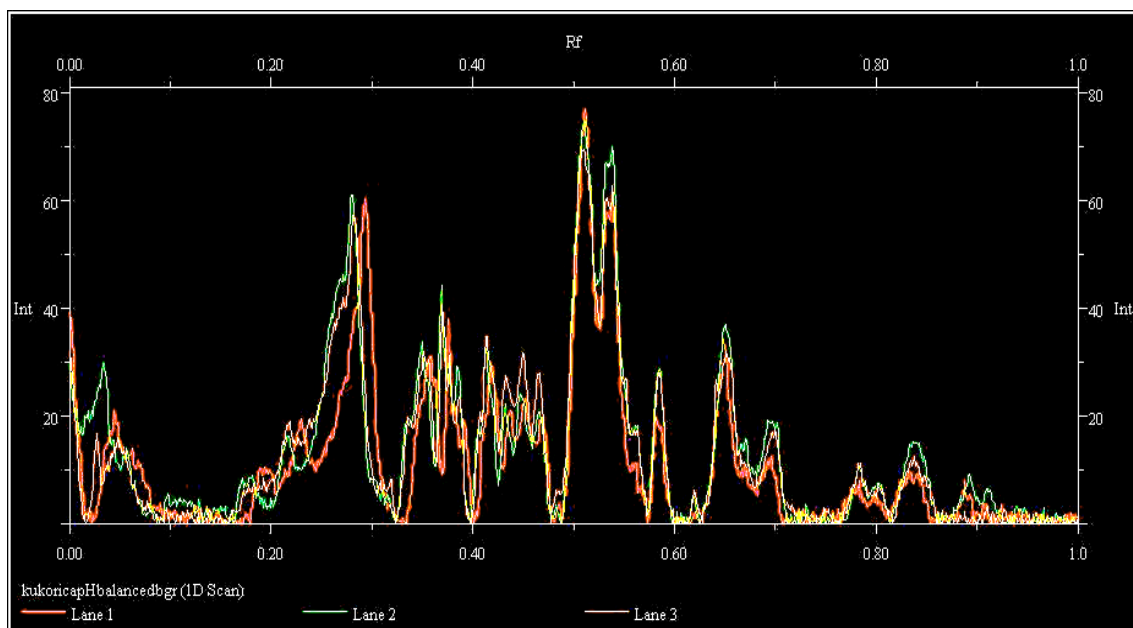
A 19. ábrán a 3 kukoricafajta fehérjeiből HFM hatására képződött közép rétegek NEpHGE mintázata látható. Vizuális megítélés alapján a Borbála fehérjesávok intenzitása némileg erősebb, mint a másik két kukoricafajta fehérjesávjainak intenzitása, a pH-független megoszlás azonban mindhárom fajta fehérjéinél látható.



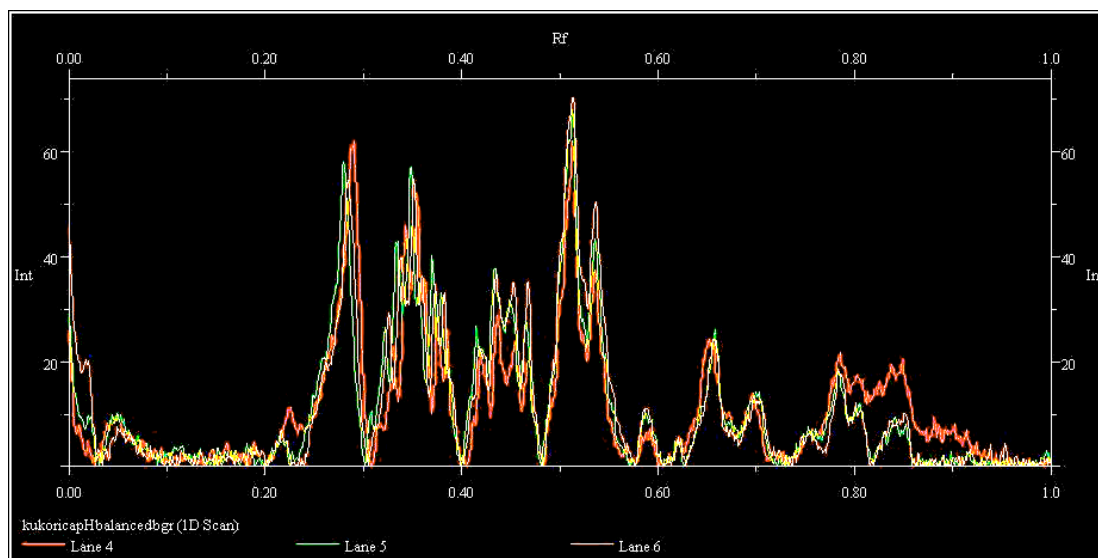
19. ábra

A HFM pH-jának hatása a kukoricafehérjék leválására (NEpHGE)

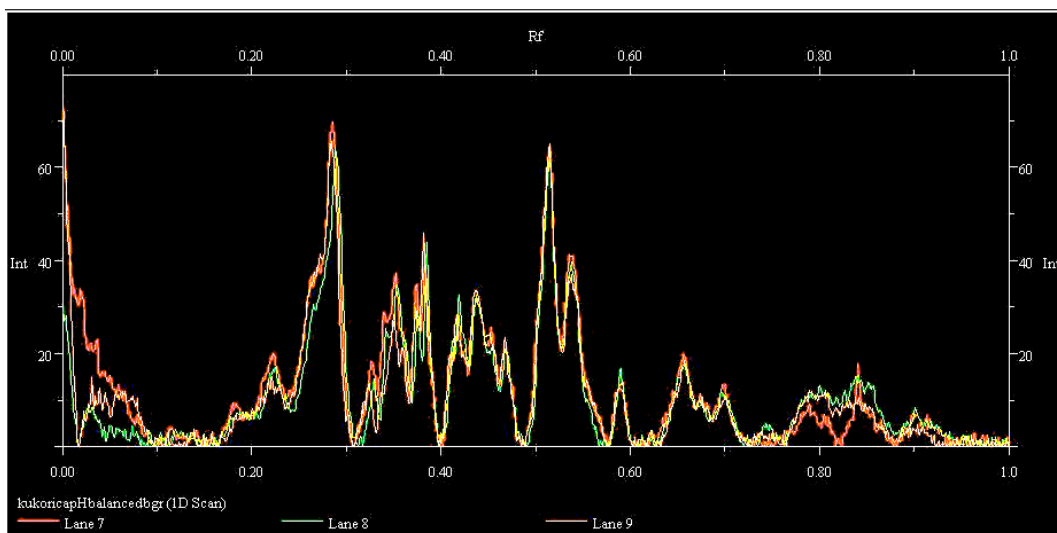
(1,2,3 sávok - pH 4,8, 6,7, 7,9 Borbála; 4,5,6 sávok- pH 4,8, 6,7, 7,9 Gazda;
7,8,9 – pH 4,8, 6,7, 7,9 – NK 643, 10 –modellfehérje, feltöltés 10-10 µl)



20. ábra
Borbála kukorica NEpHGE fehérjemintázatainak denzitogramjai
(19. ábra, 1,2,3 sáv)

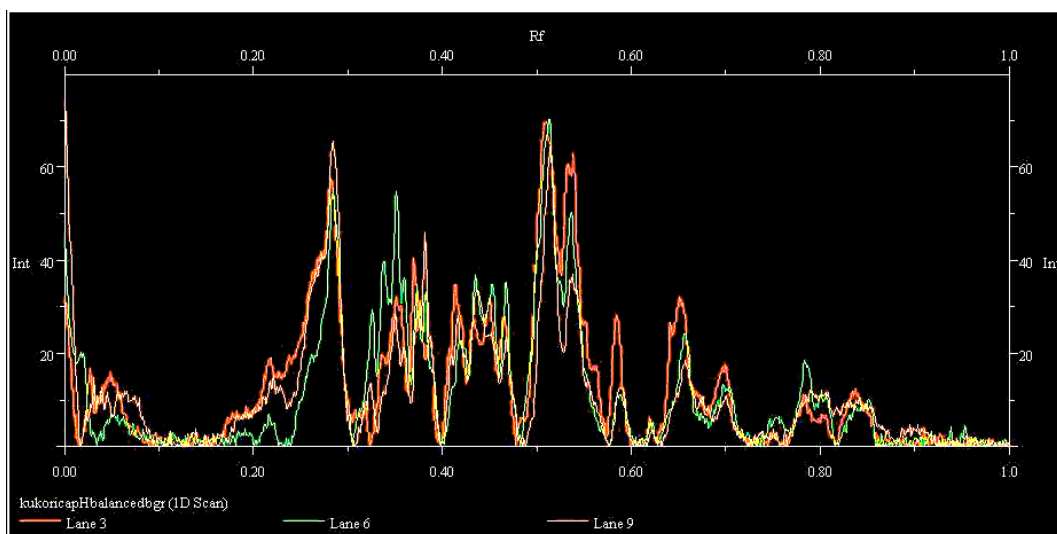


21. ábra
Gazda kukorica NEpHGE fehérjemintázatainak denzitogramjai
(19. ábra, 4, 5, 6 sáv)



22. ábra

NK 643 kukorica NEpHGE fehérjemintázatainak denzitogramjai
(19. ábra, 7,8,9 sáv)



23. ábra

Borbála (piros), Gazda (zöld) és NK 643 (sárga) jelzésű kukoricák pH 7,9-en megoszlott
fehérjéinek NEpHGE mintázatairól felvett denzitogrammok (19. ábra 3, 6, 9 sáv)

A 21-23. ábrák alapján a kukoricafehérjék megoszlása, pontosabban a vizes fázisból a középrétegbe jutó fehérjék mennyisége és összetétele, az alkalmazott analitika szintjén, független a pH-tól a 4,8–7,9 tartományban. Ezt az eredményt még a 23. ábra is megerősíti, ahol az egyes kukoricafajták közötti különbség és a pH-függetlenség trendje együtt érzékelhető.

IV. 5. A fehérjeátvitel és a háromfázisú megoszlás megismételhetősége

Nagyszámú minta szűrésére alkalmas módszernél fontos kérdés a módszer megismételhetősége, illetve egyetlen komponens sorsa. A kukoricafehérjék háromfázisú megoszlását ezért a pH 7,9 rendszerben három-három párhuzamos alkalmazásával, a 11. táblázat szerint hozzáadott ovalbuminnal is elvégeztem. A modell fehérjéket (ovalbumin és glükóamiláz) 0,0125 M borát pufferben (pH 10) oldottam, és a 3 kukoricamintával együtt kapott 12 rendszert, 25°C-on, 15-ször ráztam össze. A rendszereket (23-26. ábrák) 1-1 percig 200xg-vel, illetve 4500xg-vel centrifugáltam, majd mértem a B és C paramétereket.

A kiindulási fehérjeoldatok, továbbá a vizes és szerves fázisok fehérjetartalmát Bradford assay-vel (III.3.5.) mértem és nem egyensúlyi pH gradiens elektroforézissel jellemeztem.

11. táblázat. A HFM reprodukálhatósága 4x3 párhuzamos rendszer mérése alapján

Minta	Hozzáadott OVA (mg)	Összfehérje (mg)	B (cm)	C (cm)	Fehérjetartalom (mg/ml)	
					Szerves fázis	Vizes fázis
Modell ₁	1,23	2,45	0,6	0,05	0,85	0,02
Modell ₂	1,23	2,45	0,6	0,05	0,85	0,03
Modell ₃	1,23	2,45	0,6	0,05	0,89	0,00
X_{átlag} ±SD			0,6±0,0	0,05±0,00	0,86±0,02	0,025±0,007
Borbála ₁	0,16	4,6	0,8	0,1,	1,27	0,14
Borbála ₂	0,16	4,6	0,8	0,1	1,32	0,22
Borbála ₃	0,16	4,6	0,8	0,1	1,27	0,20
X_{átlag}±SD			0,8±0,0	0,1±0,0	1,29±0,03	0,19±0,04
Gazda ₁	0,32	4,62	1,1,	0,3	1,20	0,13
Gazda ₂	0,32	4,62	1,1,	0,25	1,28	0,15
Gazda ₃	0,32	4,62	1,1	0,25	1,24	0,09
X_{átlag}±SD			1,1±0,0	0,27±0,03	1,24±0,04	0,12±0,03
NK643 ₁	0,48	4,68	1,2	0,5	1,03	0,15
NK643 ₂	0,48	4,68	1,2	0,5	1,10	0,12
NK643 ₃	0,48	4,68	1,2	0,5	1,13	0,19
X_{átlag}±SD			1,2±0,0	0,5±0,0	1,09±0,05	0,15±0,04

A 11. táblázat adatai azt mutatják, hogy a háromfázisú megoszlás megismételhetősége jó, amit például a szerves fázisokban mért fehérjetartalom 2-3 % szórása is jelez.

A vizes fázisban mért 20-190 $\mu\text{g/ml}$ maradék fehérjetartalom %-ban megadott szórása ennek tízszerese, ezek az értékek azonban a Bradford módszer alsó határértéke körül ingadoznak, itt tehát elfogadható a nagyobb SD.

A megismételhetőség és fehérjeátvitel vizsgálatának teljes folyamata követhető a 24-27. ábrák alapján. Ha a három kukoricafajtával hozzáadott fehérje nélkül végezzük a HFM-t, a C értékekben nem mérhető szignifikáns különbség (ld. M2 2. ábra).



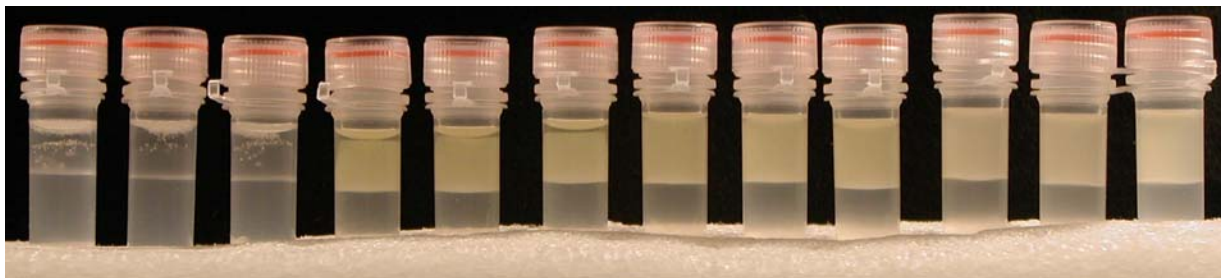
24. ábra

Kétfázisú rendszerek (modellfehérjék, baloldali 3 cső, és Borbála kukorica fehérjék, jobboldali 3 cső) a háromfázisú megosztás előtt



25. ábra

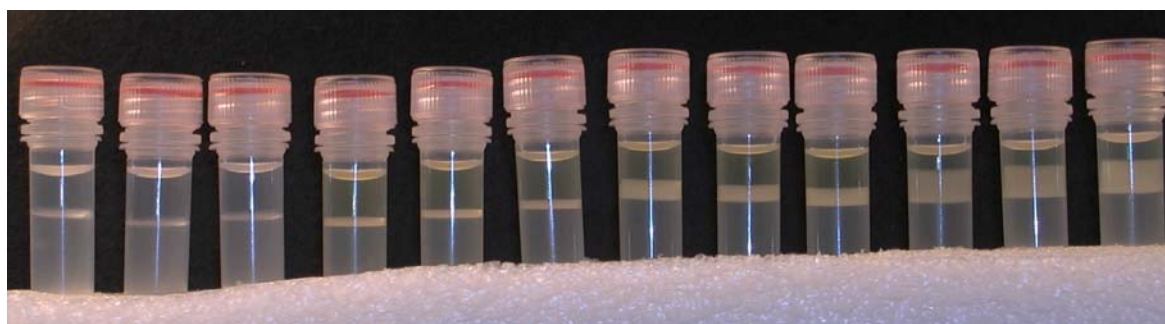
A modellfehérjéket és „Borbála” kukoricafehérjét tartalmazó rendszerek közvetlenül az összerázás után



26. ábra

200xg-vel centrifugált rendszerek, a határfelület feletti fehérjeréteg vastagsága a B érték.

A csövek sorrendje balról jobbra, 3-3- modell fehérje, Borbála+ 0,16mg OVA, Gazda+ 0,32mg OVA, NK643+ 0,48mg OVA

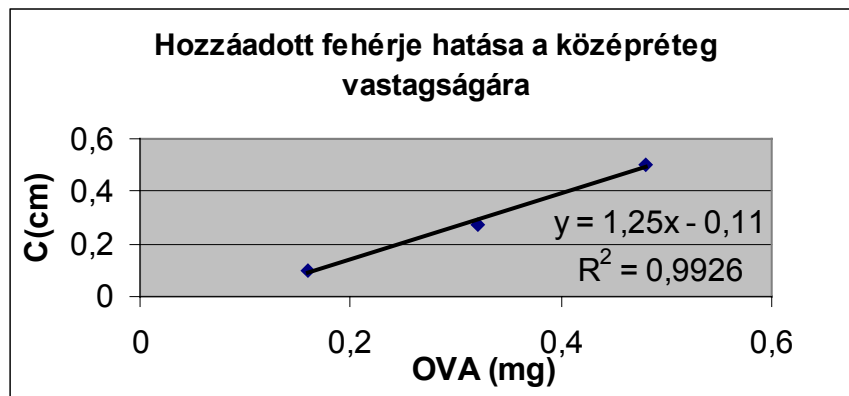


27. ábra

4500xg-vel centrifugált rendszerek, a határfelület feletti fehérjeréteg vastagsága a C érték.

A csövek sorrendje hármassával balról jobbra: modell fehérje, Borbála+ 0,16mg OVA, Gazda+ 0,32mg OVA, NK643+ 0,48mg OVA

Ugyanakkor, amint a 27. ábrán látható, ebben a kísérletsorozatban a kukoricafehérjék C értékei egyre nagyobbak, ami a hozzáadott ovalbumin jelenlétének tulajdonítható. A 11. táblázatban megadott ovalbumin mennyiségek és a C átlagértékek közti lineáris összefüggés a 28. ábrán látható.

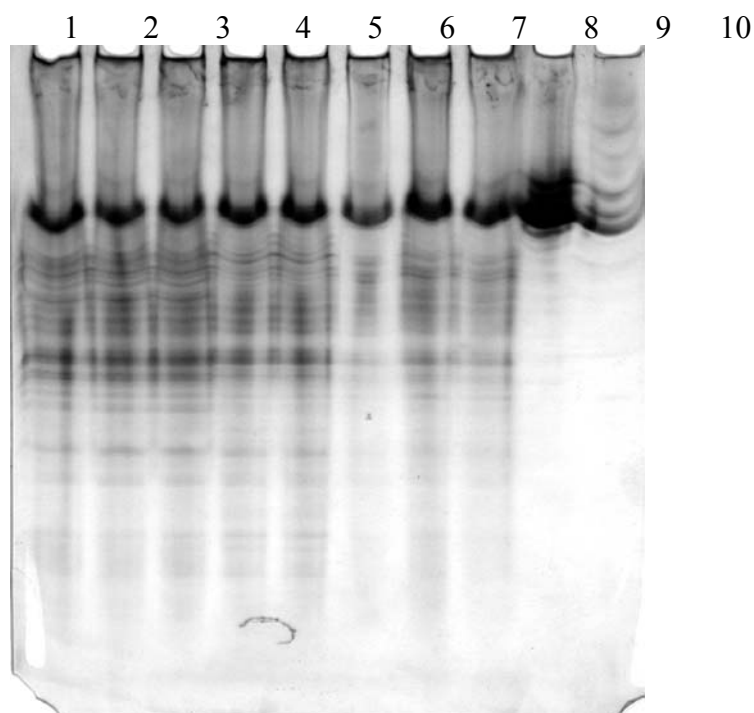


28. ábra

A középréteg méretének változása ismert mennyiségű (0,16, 0,32, 0,48 mg) ovalbumin hatására

A kukoricafehérjéhez adott ovalbumin hatására megnyilvánuló méretváltozás jól jelzi a fehérjetartalom változását, és egy sokoldalúan alkalmazható új, addíciós mérés technika lehetőségét körvonalazza.

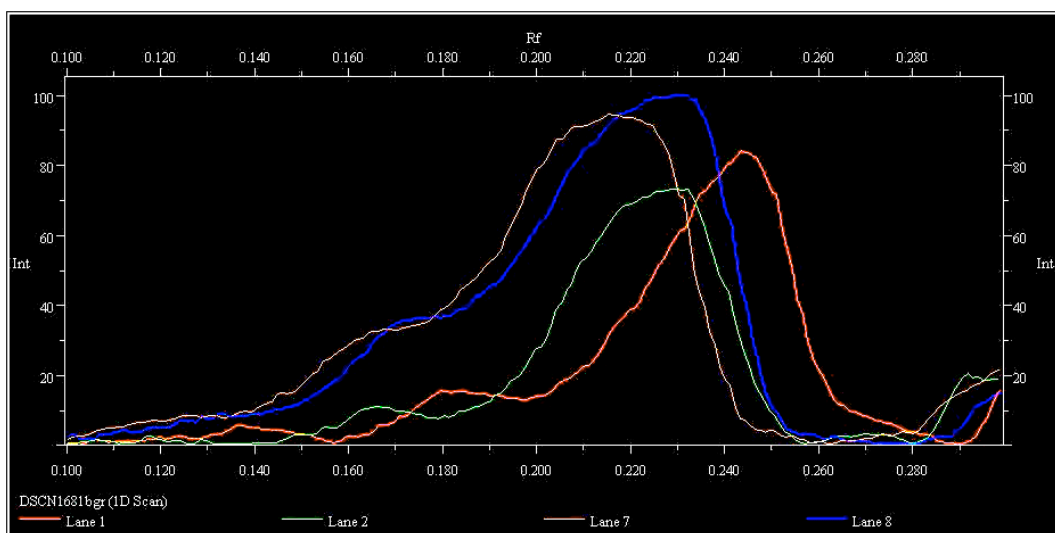
A 29. ábrán látható NEpHGE mintázatok megerősítik a HFM megismételhetőségére korábban kapott eredményeket. A vizuális megítélésen kívül a hozzáadott ovalbumin detektálásához a 29. ábra 1, 2, illetve 7 és 8 sávjának 30. ábrán látható denzitogramjait is alkalmaztam.



29. ábra

HFM megismételhetőségének vizsgálata NEpHGE-vel.

(1,2,3-Borbála, 4,5-Gazda, 6,7,8-NK 643, 9-OVA, 10-modellfehérjék felvitt minta 20-20 µl, kivéve a 6. minta -15 µl, 9. minta 7 µl, 10. minta 10 µl)

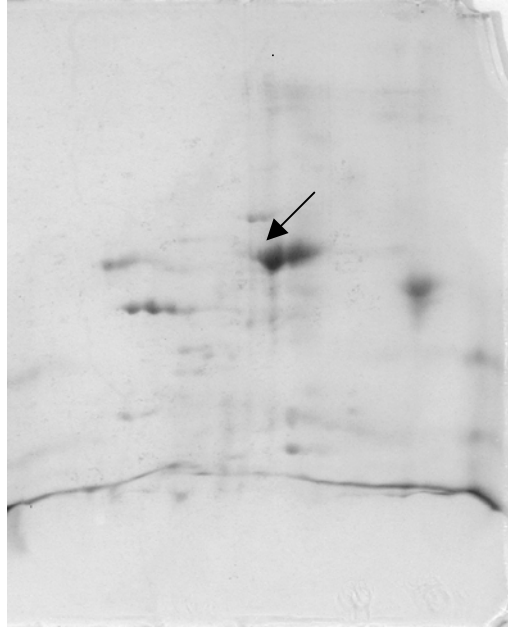


30. ábra

Hozzáadott ovalbumint tartalmazó Borbála kukoricafehérjék (piros és zöld párhuzamosok), illetve NK 643 kukoricafehérjék (kék és fehér párhuzamosok) NEpHGE mintázatának denzitogramja (Rf 0,1-0,3 tartomány)

A Borbála kukorica 1-es (Rf=0,24) és 2-es (Rf=0,23) párhuzamos sávjainak intenzitásai 0,16 mg hozzáadott OVA-t, az NK 643 7-es (Rf=0,22) és 8-as (Rf=0,23) párhuzamos sávjainak intenzitásai 0,48 mg hozzáadott ovalbumint tartalmazó rendszerből levált fehérjéket jeleznek. Az NK 643 kukoricafehérjéhez tartozó csúcsok alatti terület a Borbála kukoricafehérjék csúcs alatti területeinek kétszerese, tehát az ovalbumin mennyiségének növekedése a NEpHGE-vel is detektálható.

Az ovalbumin jelenlétének detektálásához kétdimenziós technikákat is alkalmaztam. A NEpHGE után az SDS elektroforézis egy olyan változatát alkalmaztam, amelyhez nem kell különböző folyadékokban „egyenlíteni” a gél csíkot, így minden fehérje belép a gél lemezbe. Ezt a 2D-változatot a jelenlegi munkához adaptáltam. A módszer egyetlen hátránya, hogy technikailag nehezebben kivitelezhető, mivel a NEpHGE gél csík alatt nincs hordozómembrán, így a lemezre illesztése nehezekebb.



31. ábra

NK 643 kukorica kioldható fehérjéinek NEpHGE-SDS elektroforézise

(A nyíl az ovalbumin pozícióját jelzi)

A 31. ábrán a hozzáadott ovalbumint tartalmazó NK 643 kukorica NEpHGE-SDS-elektroforetogramja látható. A Coomassie Brilliant Blue G 250 kolloidfestés viszonylag kevés fehérjét detektál, de az ovalbumin folt észlelhető. A fehérjeátvitelt izofókuszáló strip és SDS-elektroforézis alkalmazásával is ellenőriztük, de a 2D-elektroforézis, bár felbontása jobb, mint a NEpHGE-SDS-é, a mini formátumban nem ad több információt, mint ez utóbbi (ld. M2 3. ábra).

V. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Az élelmiszerfehérjék vizsgálatára alkalmazott háromfázisú megoszlási kísérletek eredményei alapján a módszer fehérjeanalitikai, illetve élelmiszer analitikai szempontból hatékonyabb és sokoldalúbb, mint a megfelelő hagyományos elválasztás technikai eljárások, így a kisózás, vizes kétfázisú megoszlás vagy a folyadék-folyadék extrakció. A háromfázisú megoszlás rugalmasan illeszthető különböző élelmiszermátrixokhoz, és a makromolekulák megoszlásán kívül további lehetőségeket kínál kis molekulák elválasztására is.

Az ovalbumin és β -laktoglobulin modell komponensek háromfázisú megoszlása és a rendszerek centrifugálásos módszerrel való értékelése a fehérjék egy olyan tulajdonságra mutat rá, ami a fenti, rokon módszerek egyikében sem nyilvánul meg. Ez a tulajdonság a fehérjék által alkotott harmadik fázis alakjának és szerkezetének centrifugális erőter hatására történő eltérő kialakulása, ami a fázisalkotó fehérjék mennyiségén kívül azok minőségétől is függő kvalitatív információkat ad. Fokozatosan növekvő kicsapó erősségű háromfázisú rendszerekben, 2-10 mg/ml fehérjekoncentráció tartományban végzett kísérletek eredménye szerint az ovalbumin és β -laktoglobulin megoszlása a vizes fázis és a harmadik fázis között a fehérjekoncentrációtól független, szignifikáns eltérést mutat, tehát a két fehérje megoszlása teljesen más típusú. A β -laktoglobulin már a 0,86 mN/m határfelületi feszültségű fehérjementes kétfázisú alaprendszernek megfelelő összetételnél gyakorlatilag teljesen kiválik, míg erre az ovalbuminnál csak a három legnagyobb határfelületi feszültségű (4,9, 5,4 és 6,8 mN/m) rendszerben kerül sor. A harmadik fázisba jutó β -laktoglobulin mennyisége tehát független a kétfázisú alap rendszerek kezdeti határfelületi feszültségétől, ezzel szemben a harmadik fázisba jutó ovalbumin mennyisége nagyon jó lineáris függést mutat a megosztó rendszerek kezdeti határfelületi feszültségével a 2,8 - 4,9 mN/m tartományban ($y = 23,14x - 11,98$, $n = 4$, $r^2 = 0,94$). Az ovalbumin harmadik fázisba jutó β mennyiségének a kezdeti határfelületi feszültségtől való függése ebben a tartományban hasonlóságot mutat a neutrális proteináz 1,5 M sóoldatokban tapasztalt megoszlásával a 0-2,0 mN/m tartományban (Szamos, Kiss, 1995). Az ovalbumin és β -laktoglobulin eltérő megoszlási viselkedéséből természetesen nem lehet arra következtetni, hogy a globulinok és albuminok háromfázisú megoszlása általában ilyen jellegű, de a fehérjeszerkezeti különbségek ismeretében megoszlásuk valószínű típusa behatárolható.

A háromfázisú megoszlás során azok a fehérjék távoznak a vizes fázisból, amelyeket az már nem tud oldatban tartani. A kicsapást befolyásoló fő tényezők eddigi ismereteink szerint a fehérjék hidrofóbitása, molekulatömege, koncentrációja, különleges oldhatóságot biztosító egyéb csoportjai, pl. cukrok, illetve a *terc*-butil-alkohol és az oldott só jelenléte, valamint "egyéb" anyagok, így lipidek, poliszacharidok. Az oldatból kivált fehérjék sorsa kétféle lehet: ha hidrofób felületelemeik

száma kellően nagy, a *terc*-butil-alkohollal asszociálva harmadik fázist képeznek. Abban az esetben, ha ez az asszociáció valamilyen okból gátolt, vagy a hidrofób foltok száma vagy mintázata nem megfelelő, negyedik fázist képezve lebegnek, vagy leülepednek. A β -laktoglobulin felületi hidrofobitása 3,3-szerese az ovalbuminénak és utóbbival ellentétben nem tartalmaz jó vízdoldhatóságot biztosító kötött szénhidrátot. Az eltérő megoszlási viselkedés okát nagy valószínűséggel e két paraméter különbözőségére kell visszavezetni, mert a két fehérje többi jellemzői nagyon hasonlóak. Meg kell jegyezni, hogy a háromfázisú megoszlásról publikált viszonylag nagy számú eredmény egyike sem érinti az "egyéb" anyagok befolyásoló hatását, amelyek közül a poliszacharidok és lipidek szerepének vizsgálata különösen fontos lehet.

Nagy fehérjekoncentrációjú mintákon a háromfázisú rendszerrel közölt mechanikai energia hatását vizsgálva, a centrifugálás hatására komprimálódott korongokat méretváltozásuk alapján két típusba lehetett sorolni: a közölt mechanikai energia hatására növekvő, majd állandósult méretű, illetve a csökkenő méretű korongok típusára. A legkisebb ingadozást közepes (10-20 összerázás) energiaközlés okozta a centrifugált busa, csirke, marha és sertés fehérjekorongok méretében. A húslé fehérjék HFM után kapott vizes fázisainak A_{280} értékei alapján a középrétegbe jutó fehérje mennyiségét a közepes energiaközlés nem befolyásolta. Természetesen a 200xg és 4500xg hatására kialakult rétegvastagságnak nincs specifikussága, mivel egymással semmilyen hasonlóságot sem mutató rendszerekben is mérhetők azonos B és C értékek. Azonos jellegű és a C mérhetőségéhez elegendő fehérjetartalmú élelmiszerminták vizsgálatához azonban a centrifugálásos módszer hasznos kvalitatív adatokkal szolgálhat, ha a rendszerrel közölt energia közelítőleg állandó.

A ponty szarkoplazma fehérjék háromfázisú megoszlásának gazdaságos, analitikai léptékű változata valósítható meg Eppendorf csőben. A HFM-hez szükséges fehérjemintát a házilag konstruált szeparátorral nagy mintaszám esetén is gyorsan, kíméletesen és megismételhető módon lehet kinyerni. A HFM pH-jának növekedésével párhuzamosan növekvő C-érték a ponty szarkoplazma fehérjéknél azt jelzi, hogy a harmadik fázis szerkezetének kialakításában a fehérjék töltött csoportjai szerepet játszanak. A középrétegben kivált fehérjék nem egyensúlyi pH gradiens elektroforézissel kapott mintázata alapján a háromfázisú módszer több célra is alkalmazható. A különböző, főleg tengeri halfajok azonosítását izoelektromos fókuszálással kapott parvalbumin mintázataik alapján végzik (Esteve-Romero et al. 1996, Rehbein et al. 2000). A vizsgálathoz szükséges fehérjemintát a halhús desztillált vízzel való homogenizálása, centrifugálás, majd a felülúszó 5 percen át, 100 °C-on való forralása után centrifugálással kapják. A savas pI-jú parvalbuminok izoelektromos fókuszálását pH 3,0-6,0, vagy 3,0-10,0 tartományban végzik. A pontyfehérjék vizsgálatához kidolgozott szeparátorral egyszerű módon, homogenizálás nélkül állítható elő nagytöménységű szarkoplazma fehérjeoldat, amelyből közvetlenül vizsgálható a parvalbumin mintázat változása.

A HFM hatékony mintakészítő eljárás az elektroforézishez, mert a mintában található különféle szennyezőktől elválasztja, és egyúttal koncentrálna a fehérjéket, továbbá a fehérjekivonáshoz használatos oldatok, például foszfát puffer, nátrium-klorid oldat, nagy vezetőképességű ionjait is eliminálja, amelyek jelenléte az elektroforézis alatt hátrányos (Osterman, 1984). A ponty szarkoplazma fehérjék háromfázisú megoszlásában a savas és bázisos fehérjék leválásának pH-függése lehetőséget ad arra, hogy a rendszer pH-jának változtatásával dúsítsuk a neutrális közeli szarkoplazma fehérjefrakciót. A ponty szarkoplazma fehérjék megoszlása részben egyezik Pike és Dennison (1989) eredményeivel. A savas izoelektromos pontú parvalbuminok harmadik fázisba jutása a pI-jükhöz közeli pH-n teljes, annak növekedésével pedig, csökken. A bázisos fehérjék leválása a pH növekedésével szintén csökkenést mutat, ami analóg a citokróm C viselkedésével. A módszer más állatok szarkoplazma fehérjeinek vizsgálatára változtatás nélkül alkalmazható, beleértve a technológiai lépések hatásainak vizsgálatát is.

A kukoricafehérjék háromfázisú megoszlásakor számítani kellett az alkoholban oldható zein fehérjék szerves fázisba jutására és arra, hogy kismértékben szennyezik a harmadik fázist. A 21 % relatív telítésű (0,86 M) ammónium-szulfát, 30 térfogatszázalék *terc*-butil-alkohol összetételű rendszer azonban mind a vizes fázis, mind a szerves fázis fehérjetartalmának közvetlen mérését teszi lehetővé, tehát a fehérjemegoszlás gyorsan ellenőrizhető. A pontyfehérjékkel ellentétben a nem zein fehérjékből képződött harmadik fázisban a töltött csoportok nem játszanak szerepet a réteg szerkezetében, mivel a rendszer pH-jának növekedésével a fehérjemintázatban sem vizuálisan, sem a denzitogramban nem észlelhető ehhez rendelhető változás. A harmadik fázist reprezentáló fehérjekorong visszaoldására kidolgozott eljárás a kb. 1 mm vastag, nem törékeny korongoknál megfelelő eredményt adott. A só és a *terc*-butil-alkohol eltávolítása a rétegből a megoszlást követő hideg vizes és etanolos mosással, majd a fehérjék újraoldása, egy dializálást és/vagy ultraszűrést helyettesítő lépés.

A hozzáadott ovalbumin C érték alapján való mérése új fehérjedetektálási megközelítést jelent, amivel elektroforézis nélkül is észlelni lehetett az "idegen" fehérje jelenlétét. Az ovalbumint nem tartalmazó, mindhárom kukoricafajtából azonos protokoll szerint izolált fehérjékre kapott C érték 0,1 cm (M2 1. ábra). Ebből az következik, hogy a három kukoricafehérje mintával a 21/30 rendszerbe vitt 0,16, 0,32 illetve 0,48 mg ovalbumin, ami ebben a megosztó rendszerben egyedül nem képezett volna mérhető vastagságú réteget, továbbá a kukoricafehérjék közötti kölcsönhatás következtében olyan új fehérjeszerkezet alakult ki, ami külön sem a kukoricafehérjékre, sem az ovalbuminra nem jellemző. Ez az eredmény alátámasztja azt a feltevést, hogy az egyes fehérjék harmadik fázist képező tulajdonságait, más fehérjék jelenléte és a közeg összetétele nagymértékben befolyásolja.

A referenciafehérjék megjelenése a szerves fázisban új, és meglepő eredmény. Az irodalomban korábban közzétett, de elsősorban nem élelmiszerfehérjékre vonatkozó eredményekben nem említik a fehérjék szerves fázisban való megjelenését (Lovrien et al., 1987). Ennek a jelenségnek a szisztematikus vizsgálata fokozott jelentőségű lehet, mert a terc-butil-alkoholos fázis a prolaminok miatt potenciálisan nagyon értékes.

A háromfázisú megoszlás mindhárom fázisa általában jól konzerválja a benne foglalt anyagokat szobahőmérsékleten. A korábbi torma peroxidáz, illetve a DNS izolálási kísérletek mellékeredménye, hogy a középértékben levált makromolekula hosszú időn át stabil marad, ami az ammónium-szulfát és a *terc*-butil-alkohol együttes hatásának tulajdonítható. Különböző állatok szarkoplazma fehérjéből képződött nagy C értékű korongokból azonban néhány hét elteltével a fehérjekorong egy része levált, és a cső aljára süllyedt, ami a gél öregedésére, a *terc*-butil-alkoholt megtartó képesség csökkenésére utaló jelenség. A három fázis összetételének az idő függvényében mért változásáról jelenleg nem állnak rendelkezésre adatok. Egy ilyen irányú tanulmány nagy gyakorlati haszonnal járna, főleg, ha beigazolódna az a sejtés, hogy a háromfázisú megoszlás adott esetben olyan tárolási stabilitást biztosít, ami összevethető a -25°C-os tárolásával. Ez különösen nagyobb számú, vagy nagy munkaigényű minták elemzésekor tenne lehetővé jelentős megtakarítást.

Az esetek többségében nem állnak rendelkezésre egyszerű kioldással vagy más izolálási módszerrel készíthető fehérjeminták. Nagyszámú változata képzelhető el a "nehéz" mintáknak, így nagyon kis fehérjetartalmú, viszkózus, transzparens élelmiszer; kis, illetve nagy viszkozitású, átlátszatlan élelmiszertermék; nagy mennyiségű lipidet és/vagy fenolszármazékot, jelentős rostmennyiséget tartalmazó nyersanyag; különböző technológiai lépésekből származó termékek. A hagyományos fehérjefrakcionálási módszerek ezekben az esetekben időigényesek, vagy alkalmatlanok. A HFM ilyen mintákból is lehetővé teszi fehérjék izolálását, mivel az oldott anyagkeveréket szétosztja az egyes fázisokba, így ez egyetlen lépésben is nagyobb mértékű frakcionálást jelent, mint ami a szokásos előkészítő módszerekkel elérhető. A centrifugálásos módszer elvben lehetővé teszi, hogy ismeretlen összetételű rendszerekkel komparatív vizsgálatot végezzünk, aminek például élelmiszerhamisítás vagy termékreklamáció esetében lehet jelentősége.

A háromfázisú megoszlás ugyanakkor nem alkalmazható korlátlan érvényességgel. A fehérjék óriási változatossága és előfordulásuk szélsőséges mennyiségi paraméterei miatt előfordulhat, hogy a módszer látszólag nem működik. A harmadik fázis centrifugálásos vizsgálata nem alkalmazható bizonyos esetekben, például ha a réteg nagyon vékony, bár a határfelületen 50-100 µg fehérje kiválása még látható. A nagyon kis mennyiségű fehérjét tartalmazó korong folyadékfázisoktól való elválasztása technikailag is nehezebben kivitelezhető, stb. Más esetekben viszont a háromfázisú megoszlás éppen a fehérjék eltávolítása révén elősegítheti a vizes fázisban

visszamaradt poláros, valamint a *terc*-butil-alkoholos fázisba került apoláris kismolekulák meghatározását.

A háromfázisú megoszlás nagy hatékonyságú, könnyen kivitelezhető és gazdaságos elválasztás-technikai lépés, amelynek alkalmazási területe jóval szélesebb annál, mint amit az értekezés behatárol, és további tanulmányozása még számos eredményre vezethet.

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

- 1./ Élelmiszerek vizsgálatára alkalmazható analitikai léptékű háromfázisú megoszlást (HFM) dolgoztam ki különböző élelmiszerfehérjékre, így β -laktoglobulinra, ovalbuminra, ponty szarkoplazma fehérjékre és kukoricafehérjékre.
- 2./ Megállapítottam, hogy a HFM-ben a vizes fázisból levált β -laktoglobulin, illetve ovalbumin mennyisége, és/vagy a fehérjerétegek centrifugális erő hatására fellépő méretváltozása, szignifikáns különbségeket mutat a határfelületi feszültséggel jellemzett tartományban.
- 3./ Különböző állatok, busa, csirke, marha és sertés húsleveinek háromfázisú megoszlásakor vizsgáltam a közölt mechanikai energia (összerázás) rendszerekre gyakorolt hatását. Megállapítottam, hogy a 4500xg hatására komprimálódott fehérjerétegek mérete függ, a harmadik fázisban levált fehérje mennyisége azonban nem függ, a közölt mechanikai energiától.
- 4./ A ponty szarkoplazma fehérjék megoszlását 21 % relatív telítésű ammónium-szulfátot, 30 térfogat% *terc*-butil-alkoholt tartalmazó, pH 3,7- pH 8,0 vizes fázisú rendszerekben vizsgáltam nem egyensúlyi pH gradiens elektroforézissel. Megállapítottam, hogy a ponty szarkoplazma fehérjék megoszlása pH-függő, amennyiben a pH növekedésével csökken a harmadik fázisban levált savas és bázisos fehérjék mennyisége. A 4500xg hatására komprimálódott fehérjeréteg vastagsága lineáris függést mutat a pH-val, ami arra utal, hogy a réteg szerkezetének kialakításában a fehérjék töltése szerepet játszik.
- 5./ A Borbála, Gazda és NK 643 kukoricafajták kioldható összes fehérjéinek háromfázisú megoszlását 21 % relatív telítésű ammónium-szulfátot és 30 térfogat% *terc*-butil-alkoholt tartalmazó, pH 4,8- pH 7,9 vizes fázisú rendszerekben vizsgáltam és megállapítottam, hogy a harmadik fázisban levált fehérjék összetétele a megadott tartományban független a pH-tól.
- 6./ Eredményeim alapján megállapítottam, hogy a háromfázisú megoszlás hatékony és megismételhető mintafrakcionáló módszer, amely újszerű megközelítést jelent az élelmiszerek összetételének vizsgálatában.

SUMMARY

- 1./ The method of three-phase partitioning (TPP) using ammonium-sulfate and tert-butanol was elaborated on an analytical scale to study the behavior of various food proteins, namely β -lactoglobulin, ovalbumin, carp sarcoplasmic proteins and soluble corn proteins.
- 2./ It was verified that the amount of precipitated proteins and/or thickness of centrifuged third phases of ovalbumin, and β -lactoglobulin, showed significant differences when they were plotted as a function of interfacial tension of the protein free two-phase system of identical composition.
- 3./ The effect of transmitted mechanical energy (by shaking) was investigated on the three-phase systems containing drip of silver carp, chicken, beef and pig. According to the obtained results, the size of protein layers compressed at 4500xg depends on the amount of mechanical energy transmitted to the three-phase system, while the amount of proteins present in the third phase is independent of the number of shakings applied.
- 4./ The partitioning of carp sarcoplasmic proteins was investigated in systems consisting of 21% relative saturation ammonium-sulfate solutions of pH 3,7-8,0 and 30% (v/v) tert-butanol, and the protein components of midlayers were separated by nonequilibrium pH gradient electrophoresis (NEpHGE). It was found that TPP of carp sarcoplasmic proteins is pH-dependent, inasmuch as the pH-change is accompanied by a change in the amount and composition of precipitated proteins. The thickness of the third phase compressed at 4500xg showed a good linear correlation with the pH, indicating the contribution of charged proteins to the structure of the third phase.
- 5./ Total soluble proteins (borate buffer pH 10) of different corn varieties, as Borbála, Gazda, NK 643, were partitioned in systems consisting of 21% relative saturation ammonium-sulfate solutions of pH 4,8-7,9 and 30% (v/v) tert-butanol. It was demonstrated by NEpHGE that protein composition of the third phase was independent of the pH in the range investigated.
- 6./ Three-phase partitioning is a novel approach and an effective and repeatable sample fractionation method to be used for investigation of food composition.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- 1./ Bevezettem a háromfázisú megoszlásban (HFM) levált fehérje mennyiségével korreláló új paramétert, a fehérjementes kétfázisú rendszer határfelületi feszültségét.
- 2./ Bevezettem a levált fehérjekorong centrifugális erő hatására fellépő kompresszibilitásának fogalmát, és kvalitatív módszert dolgoztam ki sertés és marha húsfehérjék megkülönböztetésére.
- 3./ Megállapítottam, hogy a centrifugálás (4500xg) hatására kialakult harmadik fázis vastagsága, C (cm), és a levált fehérje mennyisége (sertés szarkoplazma 0,6-3,1 mg/ml tartományban) között lineáris összefüggés van. Hasonlóképpen C és a vizes fázis pH-ja (ponty szarkoplazma fehérje, pH 3,7 – 8,0 tartományban) között is lineáris függés van.
- 4./ A HFM különleges enzimrögzítő eljárásként is alkalmazható, amellyel bioaktív réteget állítottam elő.
- 5./ A HFM-et eredményesen használtam makromolekulák(peroxidáz, DNS) analitikai és preparatív dúsítására és tisztítására.
- 6./ Megállapítottam, hogy az ovalbumin, és a β -laktoglobulin háromfázisú megoszlása során levált fehérje mennyisége, és a fehérjekorongok kompresszibilitása szignifikáns különbséget mutat. Az alkalmazott rendszerek összetétele 30/17-70/50 (ammónium-szulfát relatív telítés/*terc*-butil-alkohol térfogatszázalék) tartományban, a határfelületi feszültsége 0,86 – 6,8 mN/m között, a fehérjekoncentráció pedig, 2 és 10 mg/ml között változott.
A β -laktoglobulin leválása a harmadik fázisban az összetételtől függetlenül teljes mértékű az összes rendszerben.
Az ovalbumin leválása a harmadik fázisban csak részleges a 2,8 mN/m határfelületi feszültség alatti rendszerekben. A $\gamma = 2,8-4,9$ mN/m tartományban (50/17, 50/34, 50/50, 70/17 rendszerek) levált ovalbumin mennyisége szoros függést mutat az alaprendszerek határfelületi feszültségével($y = 23,14x - 11,98$ ($r^2=0,94$)).
- 7./ Megállapítottam, hogy a 41/24 (ammónium-szulfát relatív telítés/*terc*-butil-alkohol térfogatszázalék) összetételű rendszerekben a szarkoplazma fehérjék (busa, csirke, marha és sertés) leválása független a közölt mechanikai energiától. A centrifugálással kapott fehérjekorong C értéke kétféleképpen változik: növekszik, majd állandósul (sertés, csirke), illetve csökken (busa, marha). Ennek alapján megállapítható, hogy a C értékek csak közel azonos mechanikai energia közlése esetén hasonlíthatók össze.

- 8./ Megállapítottam, hogy a ponty szarkoplazma fehérjék háromfázisú megoszlása pH-függő, mivel a 21/30 (ammónium-szulfát relatív telítés/*terc*-butil-alkohol térfogatszázalék) összetételű, pH 3,7 - pH 8,0 rendszerekben a fehérjék leválása a pH növekedésével csökken.
- 9./ Megállapítottam, hogy a Borbála, Gazda és NK 643 kukoricafajták háromfázisú megoszlása pH független, mert a NEpHGE-vel kapott fehérjemintázatok intenzitása a pH 4,8-7,9 tartományban gyakorlatilag nem változik.
- 10./ Megállapítottam, hogy az egyes fehérjékből képződött harmadik fázis szerkezetét a rendszer összetétele és más fehérjék (pl. ovalbumin) jelenléte nagymértékben megváltoztatja.
- 11./ Új konstrukciójú mintavevő szeparátort készítettem, ami egyszerűsíti a szarkoplazma fehérjék kinyerését izomszövetből.
- 12./ Screening-re alkalmazható eljárást dolgoztam ki állati (pontyizom) és növényi (kukoricaliszt) fehérjék vizsgálatára.

VII. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

ADÁNYI, N., SZAMOS, J., SZABÓ, E.E., VÁRADI, M. (1999): Interfacial Enzyme Partitioning as a Tool for Constructing Biosensors. *Acta Alimentaria*, 28, 329-338

ANDERSEN, M.D., MOLLER, B.L. (1998): Double Triton X-114 phase partitioning for the purification of plant cytochromes P450 and removal of green pigments. *Protein Expression and Purification*, 13, 366-372

BAILEY, J.E., OLLIS, D.F. (1987): *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill Book Co. New York, 984 p.

BIACS, P.A., NÉMEDI, E., SZABÓ, E.E., SZAMOS, J. (2000): Experiences of sample preparation and EU screening obtained for soy products. Brussels, Belgium December 11-13, Abstracts 45

BORBÁS, R., TURZA, S., SZAMOS, J., KISS, É. (2000): Analysis of gels developed by interfacial partitioning. *Third International Conference of the Kolloid-Gesellschaft*, Budapest, Hungary, September 25-28, Abstracts, 115. p.

BORBÁS, R., TURZA, S., SZAMOS, J., KISS, É. (2001): Analysis of Protein Gels formed by Interfacial Partitioning. *Colloid and Polymer Science*, 279, 705-713

BORDIER, C. (1981): Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem*, 256, 1604-1607

BOUCHER, E.A., EVANS, M.J.B., JONES, T.G.J. (1987): The computation of interface shapes for capillary systems in a gravitational field. *Adv. Colloid Interface Sci.* 27, 43

COHN, E., J.(1925): The physical chemistry of the proteins. *Physiol. Rev*, 5, 349-437

DENNISON, C., LOVRIEN, R. (1997): Three Phase Partitioning: Concentration and Purification of Proteins. *Protein Expression and Purification*, 11, 149-161

DIEZEL, W., KOPPERSCHLÄGER, G., HOFMANN, E. (1972): An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomasie Brilliant Blue. *Analytical Biochemistry*, 48, 617-620

ESTEVE-ROMERO, J.,S., YMAN, I., M., BOSSI, A., RIGHETTI, P., G. (1996): Fish species identification by isoelectric focusing of parvalbumins in immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 17, 1380-1385

EVERBERG, H., SIVARS, U., EMANUELSSON, C., PERSSON, C., ENGLUND, A., HANESKOG, L., LIPNIUNAS, P., JÖRNTÉN-KARLSSON, M., TJERNELD, F.(2004): Protein prefractionation in detergent-polymer aqueous two-phase systems for facilitated proteomic studies of membrane proteins. *Journal of Chromatography A*, 1029, 113-124.

FALCONER, J.S., TAYLOR, D.B. (1946): A specific property solubility test for protein purity, and its application to the preparation of pure liver esterase. *Biochem.* 40, 835-843

FOSTER, P.R., DUNNIL, P., LILLY, M.D. (1976): The kinetics of protein salting-out: precipitation of yeast enzymes by ammonium sulfate. *Biotechnology and Bioengineering*, 18, 545-580

FRANKOVSZKIJ, V.A., PJATNICKIJ, I.V., ALEJNOVA, A.P. (1989): Trechfaznaja ekstrakcija b analize szmesi mineralnűch maszel, zsirov, aminov i, kraszityelej. *Ukr. Khim. Zsurn.*, 55, 485-488

GERECS Á. (1983): Bevezetés a kémiai technológiába. Budapest: Tankönyvkiadó. 605 p.

HAMAKER, B.R., MOHAMED, A.A., HABBEN, J.E., HUANG, C.P., LARKINS, B.A. (1995): Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. *Cereal Chemistry*, 72, 583-588

KISS, É., SZAMOS, J., TAMÁS, B. (1996): Interfacial Behavior of Proteins in Three Phase Partitioning I. 7th Conference on Colloid Chemistry, Eger, Hungary, September 23-26, Proceedings, 294-297. p.

KISS, É., SZAMOS, J., TAMÁS, B. (1997): Protein adsorption at liquid/liquid interface - three phase partitioning. 11th Conference of the European Colloid and Interface Society, Lunteren, The Netherlands, September 14-19., Posters, 95. p.

KISS, É., SZAMOS, J., TAMÁS, B., BORBÁS, R. B. (1998a): Interfacial behavior of proteins in three-phase partitioning using salt-containing water/*tert*-butanol systems. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 142, 295-302.p.

KISS, É., SZAMOS, J. (1994): Three Phase Partitioning of Crude Protein Extracts. 12th Scandinavian Symposium on Surface Chemistry, Espoo, Finland, 15-17 June Extended Abstracts, 80-82.p.

KISS, É., TAMÁS, B., BORBÁS, R., SZAMOS, J. A.(1998b): Fehérjék határfelületi viselkedése a háromfázisú megoszlás során víz-tercier-butanol-só háromkomponensű rendszerben. *Magyar Kémiai Folyóirat*, 104, 422-429.p.

KOCHER, P.N., FOEGEDING, E.A: (1993): Microcentrifuge-based method for measuring water-holding of protein gels. *Journal of Food Science*, 58, 1040-1046.p.

LOVRIEN, R.E., GOLDENSOPH, C., ANDERSON, P.C., ODEGAARD, B.H.(1987): In Burgess R. (ed) Protein purification: micro to macro. Liss, New York, 131-148.p.

MONDAL, K., SHARMA, A., GUPTA, M.N. (2004): Three phase partitioning of starch and its structural consequences. *Carbohydrate Polymers*, 56, 355-359.p

NEUHOFF, V., STAMM, R., EIBL, H. (1985): Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. *Electrophoresis*, 6, 427-448

NEUHOFF, V., AROLD, N., TAUBE, D., EHRHARDT, W. (1988): Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 9, 255-262

ODEGAARD, B.H., ANDERSON, P.C., LOVRIEN, R.E.(1984): Resolution of the Multienzyme Cellulase Complex of *Trichoderma reesei* QM9414. *Journal of Applied Biochemistry* 6, 156-183

O'FARRELL, P.Z., GOODMAN, H.M., O'FARRALL, H.O. (1977): High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell*, 12, 1133-1142

OSTERMAN, L., A. (1984) Methods of protein and nucleic acid research 1. Electrophoresis. Isoelectric focusing. Ultracentrifugation. Springer Verlag Heidelberg. 342 p.

PAULE, B.J.A., MEYER, R., MOURA,-COSTA, L.F., BAHIA, R.C., CARMINATI, R., REGIS, L.F., VALE, V.L.C., FREIRE, S.M., NASCIMENTO, I., SCHAER, R., AZEVEDO, V. (2004): Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Protein expression and Purification* (in press)

PENNY, I.F. (1975): Use of a centrifuging method to measure the drip of pork *Longissimus dorsi* slices before and after freezing and thawing. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 26, 1593-1602

PERICIN, D., ANTOV, M., DIMIC, N., VUJICIC, B. (1997): Rapid method for detecting low basal activity of exo-pectinase of *Polyporus squamosus*. *Biotechnology Techniques*, 11, 833-836

PIKE, R.N., DENNISON, C. (1989): Protein Fractionation by Three Phase Partitioning (TPP) in Aqueous/t-butanol Mixtures. *Biotechnology and Bioengineering*, 33, 221-228

RABILLOUD, T. (2000): Proteome research: Two-dimensional gel electrophoresis and identification methods. Springer Verlag Berlin Heidelberg 248 p.

REHBEIN, H., KÜNDIGER, R., PINEIRO, C., PEREZ-MARTIN, R., I. (2000): Fish muscle parvalbumins as marker proteins for native and urea isoelectric focusing. *Electrophoresis*, 21, 1458-1463

RICHARDSON, P., HOARE, M., DUNNIL, P. (1990): A new biochemical engineering approach to the fractional precipitation of proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 36, 354-366

ROY, I., GUPTA, M.N. (2002): Three-phase affinity partitioning of proteins. *Analytical Biochemistry*, 300, 11-14

SANCHEZ-FERRER, A., BRU, R., GARCIA-CARMONA, F. (1989): Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenol oxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiol* 91, 1481-1487

SCOPES R. (1982): Protein Purification, Principles and Practice. New York Heidelberg Berlin, Springer Verlag. 282 p.

SHARMA, A., GUPTA, M.N. (2001): Three phase partitioning as a large-scale separation method for purification of a wheat germ bifunctional protease/amylase inhibitor. *Process Biochemistry*, 37, 193-196

SHARMA, A., GUPTA, M.N. (2002): Three phase partitioning of carbohydrate polymers: separation and purification of alginates. *Carbohydrate Polymers*, 48, 391-395

SHARMA, S., GUPTA, M.N. (2001): Purification of phospholipase D from *Dacus carota* by three-phase partitioning and its characterization. *Protein Expression and Purification*, 21, 310-316

SHIH, Y., PRAUSNITZ, J.M., BLANCH, H.W. (1992): Some characteristics of protein precipitation by salts. *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 1155-1164

SINGH, R.K., GOURINATH, S., SHARMA, S., ROY, I., GUPTA, M.N., BETZEL, C., SRINIVASAN, A., SINGH, T.P. (2001): Enhancement of enzyme activity through three-phase partitioning: crystal structure of a modified serine proteinase at 1.5 angstrom resolution. *Protein Engineering*, 14, 307-313

SZAMOS, J., AUBRECHT, E., GELENCSE, É. (1998b): Detection of wheat by adapted polymerase chain reaction (PCR) methodology. *Acta Alimentaria*, 27, 87-95

SZAMOS, J., HOSCHKE, Á. (1992): Purification of Horseradish Peroxidase by Three-Phase Partitioning (TPP). *Acta Alimentaria*, 21, 253-260

SZAMOS, J., JÁNOSI, A. (2001): Comparison of two methods in purification of meat-DNA for PCR. *Acta Alimentaria*, 30, 113-118

SZAMOS, J., JÁNOSI, A., TAMÁS, B., KISS, É. (1998a): A novel partitioning method as a possible tool for investigating meat. I. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A*, 206, 208-212

SZAMOS, J., KEVEI, F., HOSCHKE, Á. (1988b): An electrophoretic investigation of extracellular proteins of glucoamylase producing *Aspergillus niger* strains. 3rd (coordination) Workshop on Microbial Protoplasts, Békéscsaba, Hungary, May 17-21, Progress Report (6), 57.p.

SZAMOS, J., KISS, É. (1995): Three-Phase Partitioning of Crude Protein Extracts. *Journal of Colloid and Interface Science*, 170, 290-292

SZAMOS, J., KISS, É. (1996): Interfacial Behavior of Proteins in Three Phase Partitioning II. 7th Conference on Colloid Chemistry, Eger, Hungary, September 23-26, Proceedings 384-387. p.

SZAMOS, J., KISS, É. (1998): Határfelületi fehérjemegoszlás elválasztástechnikai alkalmazása. Elválasztástudományi Vándorgyűlés, Lillafüred, Kivonatok P48.

SZAMOS, J., KISS, É., HOSCHKE, Á. (1991): 3rd International Conference on Biochemical Separation, Sopron, September 30-October 4. Előadás.

SZAMOS, J., KISS, É., HOSCHKE, Á. (1996): Háromfázisú megoszlás és alkalmazásai. MTA, MÉTE és KÉKI 279. Tudományos Kollokvium, Szeptember 27.

SZAMOS, J., TÓTH, Á. (1992): Application of NIR Spectroscopy to study of industrial aqueous effluents. Euroenvironment, Budapest, 1992, Abstract p. 2/20

SZAMOS, J., TÓTH, Á. (1995): Phase partitioning of protein and non-protein organic materials and NIR-spectra of midlayers developed. 9th World Congress of Food Science and Technology, Budapest, Hungary, July 30 - August 4, Abstracts II, 115. p.

SZAMOS, J., TÓTH, Á. (1997): Investigation of Polymers of Waste Water by Near Infrared Spectroscopy. 8th European Congress on Biotechnology, Budapest, August 17-21, Book of Abstracts, 298. p.

SZAMOS, J., HOSCHKE, Á., PAIS, K. (1988a): Application of three phase partitioning for enzyme purification. 2nd International Conference on Biochemical Separation, Keszthely, Hungary October 2-7, Poster Section Complex Separation Systems.

TAMÁS, B. (1996): Fehérjék határfelületi viselkedése a háromfázisú megoszlás során. Szakdolgozat, ELTE Kolloidkémiai és Kolloidtechnológiai Tanszék.

TAN, K., H., LOVRIEN, R. (1972): Enzymology in aqueous-organic cosolvent binary mixtures. *The Journal of Biological Chemistry*, 247, 3278-3285

TOMARELLI, R., M., CHARNEY, J., HARDING, M., L. (1949): Lab. Clin. Med. 34, 428

M2.További mellékletek

1.táblázat 2mg/ml ovalbumin megoszlása háromfázisú rendszerekben

Relatív só telítés/ terc.-butanol térfogat%	A	B	F(ml)	I(ml)	P%	C (cm)
30/17	1,27	0,88	2,17	2,0	24,8	0,1
30/34	1,27	-	1,91	2,0	-	0,15
30/50	1,27	-	1,56	2,0	-	0,3
50/17	1,27	1,15	1,91	2,0	13,5	0,4
50/34	1,27	0,8	1,82	2,0	42,7	1,1
50/50	1,27	0,51	1,56	2,0	68,7	2,2
70/17	1,27	0,23	1,95	2,0	82,7	0,4
70/34	1,27	0,17	1,83	2,0	87,8	-
70/50	1,27	0,15	1,53	2,0	91,0	0,05

2.táblázat 4mg/ml ovalbumin megoszlása háromfázisú rendszerekben

Relatív só telítés/ terc.-butanol térfogat%	A	B	F(ml)	I(ml)	P%	C (cm)
30/17	2,54	0,79	2,00	2,0	69,0	0,15
30/34	2,54	0,97	1,83	2,0	65,2	0,3
30/50	2,54	1,59	1,48	2,0	53,7	0,5
50/17	2,54	1,24	1,91	2,0	53,6	0,5
50/34	2,54	1,14	1,74	2,0	61,0	1,3
50/50	2,54	0,48	1,56	2,0	85,4	2,2
70/17	2,54	0,03	1,91	2,0	98,8	0,5
70/34	2,54	0,16	1,74	2,0	94,6	0,45
70/50	2,54	0,08	1,52	2,0	97,8	0,1

3.táblázat 6mg/ml ovalbumin megoszlása háromfázisú rendszerekben

Relatív só telítés/ terc.-butanol térfogat%	A	B	F(ml)	I(ml)	P%	C (cm)
30/17	3,80	1,16	2,00	2,0	69,4	0,2
30/34	3,80	1,69	1,74	2,0	61,3	0,5
30/50	3,80	2,48	1,48	2,0	51,7	0,6
50/17	3,80	1,83	1,91	2,0	54,0	0,5
50/34	3,80	1,78	1,74	2,0	59,3	1,5
50/50	3,80	0,85	1,48	2,0	83,5	2,2
70/17	3,80	0,09	1,91	2,0	97,7	0,5
70/34	3,80	0,08	1,74	2,0	98,2	0,3
70/50	3,80	0,12	1,40	2,0	97,8	0,15

4.táblázat 8mg/ml ovalbumin megoszlása háromfázisú rendszerekben

Relatív só telítés/ terc.-butanol térfogat%	A	B	F(ml)	I(ml)	P%	C (cm)

30/17	5,07	1,87	2,00	2,0	63,1	0,2
30/34	5,07	2,30	1,74	2,0	60,5	0,4
30/50	5,07	3,67	1,48	2,0	46,5	0,4
50/17	5,07	2,77	1,91	2,0	47,8	0,4
50/34	5,07	2,85	1,74	2,0	51,1	1,4
50/50	5,07	1,10	1,56	2,0	83,1	2,3
70/17	5,07	0,18	1,91	2,0	96,6	0,5
70/34	5,07	0,19	1,30	2,0	97,6	0,6
70/50	5,07	0,13	1,65	2,0	97,8	0,1

5.táblázat 10mg/ml ovalbumin megoszlása háromfázisú rendszerekben

Relatív só telítés/ terc.-butanol térfogat%	A	B	F(ml)	I(ml)	P%	C (cm)
30/17	6,34	2,44	2,00	2,0	61,5	0,3
30/34	6,34	2,65	1,74	2,0	63,6	0,4
30/50	6,34	3,63	1,38	2,0	60,5	0,5
50/17	6,34	3,11	1,91	2,0	53,1	0,6
50/34	6,34	3,28	1,74	2,0	55,0	1,4
50/50	6,34	0,85	1,56	2,0	89,6	2,1
70/17	6,34	0,05	1,83	2,0	99,3	0,55
70/34	6,34	0,05	1,56	2,0	99,4	0,4
70/50	6,34	0,04	1,04	2,0	99,7	0,1

6.táblázat 2mg/ml β -laktoglobulinmegoszlása háromfázisú rendszerekben

Relatív só telítés/ terc.-butanol térfogat%	A	B	F(ml)	I(ml)	P%	C (cm)
30/17	2,19	0,095	2,14	2,0	95,3	0,15
30/34	2,19	0,06	1,87	2,0	97,6	0,15
30/50	2,19	0,14	1,65	2,0	94,6	0,05
50/17	2,19	0,06	1,88	2,0	97,5	0,15
50/34	2,19	0,04	1,87	2,0	98,2	0,15
50/50	2,19	0,04	1,74	2,0	98,6	0,1
70/17	2,19	0,03	1,88	2,0	98,9	0,05
70/34	2,19	0,02	1,78	2,0	99,1	0,1
70/50	2,19	0,02	1,74	2,0	99,3	0,04

7.táblázat 4mg/ml β -laktoglobulin megoszlása háromfázisú rendszerekben

Relatív só telítés/ terc.-butanol térfogat%	A	B	F(ml)	I(ml)	P%	C (cm)
30/17	4,37	0,12	2,14	2,0	97,0	0,15
30/34	4,37	0,13	1,87	2,0	97,3	0,2
30/50	4,37	0,22	1,65	2,0	95,9	-
50/17	4,37	0,18	1,88	2,0	96,1	0,1
50/34	4,37	0,09	1,87	2,0	98,1	0,15
50/50	4,37	0,09	1,74	2,0	98,1	-
70/17	4,37	0,04	1,88	2,0	99,1	0,1

70/34	4,37	0,05	1,78	2,0	99,9	0,15
70/50	4,37	0,05	1,74	2,0	99,9	0,1

8.táblázat 6mg/ml β -laktoglobulin megoszlása háromfázisú rendszerekben

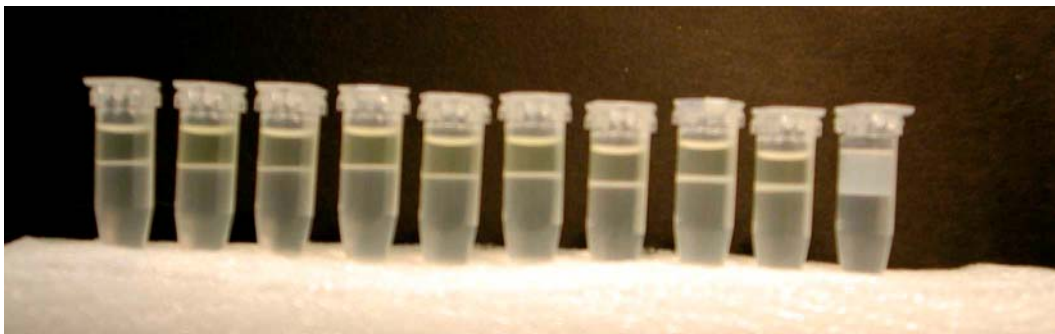
Relatív só telítés/ terc.-butanol térfogat%	A	B	F(ml)	I(ml)	P%	C (cm)
30/17	6,56	0,40	2,14	2,0	93,5	0,2
30/34	6,56	0,31	1,87	2,0	95,6	0,3
30/50	6,56	0,27	1,65	2,0	96,6	0,15
50/17	6,56	0,60	1,88	2,0	91,5	0,3
50/34	6,56	0,43	1,87	2,0	93,9	0,2
50/50	6,56	0,18	1,74	2,0	97,6	0,1
70/17	6,56	0,14	1,88	2,0	98,0	0,2
70/34	6,56	0,05	1,78	2,0	99,3	0,2
70/50	6,56	0,09	1,74	2,0	98,9	0,2

9.táblázat 8mg/ml β -laktoglobulin megoszlása háromfázisú rendszerekben

Relatív só telítés/ terc.-butanol térfogat%	A	B	F(ml)	I(ml)	P%	C (cm)
30/17	8,75	0,35	2,14	2,0	95,7	0,25
30/34	8,75	0,35	1,87	2,0	96,2	0,4
30/50	8,75	0,35	1,65	2,0	96,7	0,2
50/17	8,75	-	1,88	2,0	-	0,3
50/34	8,75	-	1,87	2,0	-	0,3
50/50	8,75	0,14	1,74	2,0	98,6	0,2
70/17	8,75	0,09	1,88	2,0	99,0	0,2
70/34	8,75	-	1,78	2,0	-	0,25
70/50	8,75	-	1,74	2,0	-	0,2

10.táblázat 10mg/ml β -laktoglobulin megoszlása háromfázisú rendszerekben

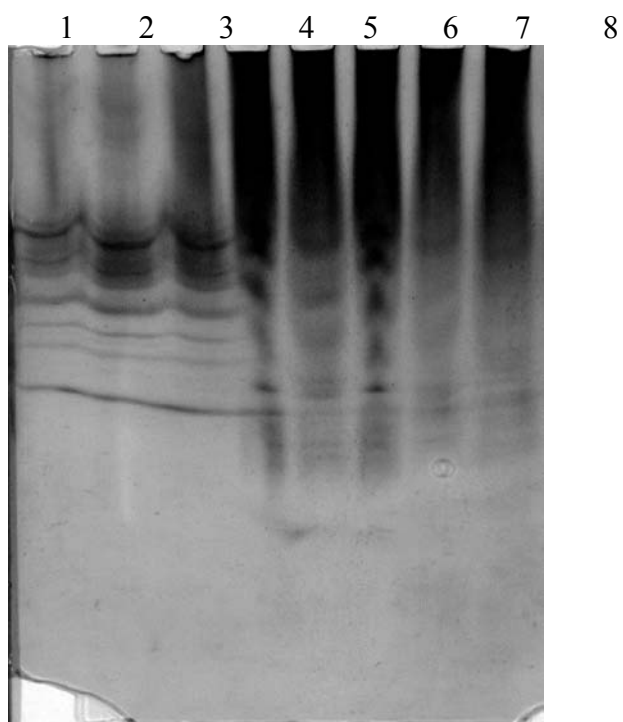
Relatív só telítés/ terc.-butanol térfogat%	A	B	F(ml)	I(ml)	P%	C (cm)
30/17	10,93	0,35	2,05	2,0	96,7	0,3
30/34	10,93	-	1,87	2,0	-	0,5
30/50	10,93	-	1,65	2,0	-	0,25
50/17	10,93	-	1,88	2,0	-	0,4
50/34	10,93	0,37	1,87	2,0	96,9	0,3
50/50	10,93	0,41	1,65	2,0	96,9	0,2
70/17	10,93	0,10	1,88	2,0	99,1	0,3
70/34	10,93	0,09	1,83	2,0	99,3	0,35
70/50	10,93	-	1,74	2,0	-	0,3



1. ábra

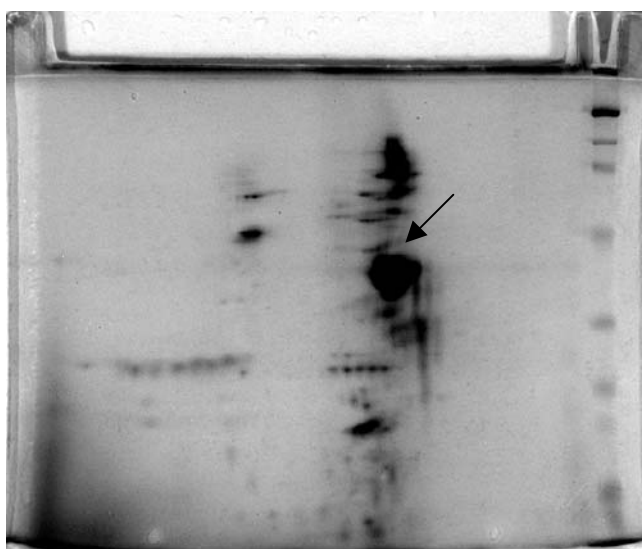
4500xg-vel centrifugált rendszerek („C” értékek).

(3-3 cső balról jobbra, Borbála, pH 3,7, 6,7, 7,9; Gazda, pH 3,7, 6,7, 7,9; NK 643, pH 3,7, 6,7, 7,9; 3,5 mg OVA)



2.ábra

HFM szerves fázisok NEpHGE
(1,2,3, sáv a modell fehérjék, 4,5,6 Borbála, 7,8 Gazda kukorica fehérjék)



4.ábra

NK 643 kukorica kioldható fehérjéinek kétdimenziós elektroforézise
(a nyíl az ovalbumin pozícióját jelzi)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Dr. Bánáti Diánának, a KÉKI főigazgatójának, aki PhD. értekezésem elkészítését kezdeményezte, és mindvégig támogatta. Köszönöm Dr. Hajós Gyöngyinek, a KÉKI Táplálkozástudományi Osztálya vezetőjének, témavezetőmnek, hogy kísérletes munkámat lehetővé tette és javaslataival hozzájárult az értekezés elkészítéséhez.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Hoschke Ágostonnak, a Budapesti Corvinus Egyetem Sör- és Szeszipari Tanszék tanszékvezető professzorának, aki felhívta figyelmemet a háromfázisú megoszlásra, és a kísérletes munkát a KÉKI-ben elindította.

Köszönöm Dr. Kiss Évának, az ELTE Kolloidkémiai és Kolloidtechnológiai Tanszék docensének a határfelületi feszültség szerepének tisztázására irányuló eredményes együttműködést.

Végül köszönetemet fejezem ki mindazon munkatársaimnak, akik résztvettek a háromfázisú megoszlással kapcsolatos kísérletekben, így dr. Tóth Árpádnak a NIR spektroszkópiai vizsgálatokért, Jánosi Annának a húsfehérje vizsgálatokban és a DNS izolálásban való együttműködésért, valamint Szabó Erzsébetnek a denzitogrammok felvételében nyújtott segítségért.

Köszönöm feleségemnek, dr. Szőnyi Ágnesnek az értekezés elkészítésében nyújtott sokrétű segítségét és türelmét.