

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**HÁROMFÁZISÚ MEGOSZLÁS ALKALMAZÁSA
ÉLELMISZERFEHÉRJÉKVIZSGÁLATÁBAN**

Szamos Jenő

KÖZPONTI ÉLELMISZER-TUDOMÁNYI KUTATÓINTÉZET

Budapest

2004

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

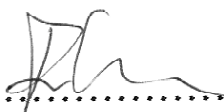
tudományága: Élelmiszertudományok

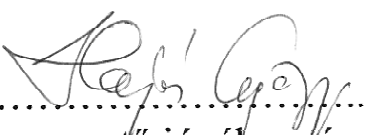

vezetője: Dr. Fekete András, DSc
egyetemi tanár
Budapesti Corvinus Egyetem

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


BEVEZETÉS

Az élelmiszer összetétel, ezen belül a fehérje összetétel vizsgálata napjainkban egyre nagyobb hangsúlyt kap, amit többek között a genetikailag módosított növények elterjedése, a funkcionális élelmiszerek megjelenése, a növényeket érő stressz-hatások, az élelmiszer azonosítás és eredet bizonyításának igénye indokol. Az élelmiszerfehérjék vizsgálatának számos módszere ismert, de a gyorsabb adatgyűjtés és a jobb megismerés igénye miatt az új megközelítéseken alapuló módszerek fejlesztése és alkalmazása állandó feladatot jelent. Az értekezés egy egyszerű fehérjefrakcionáló lépés, a háromfázisú megoszlás növényi, illetve állati fehérjék vizsgálatára alkalmas módszerré fejlesztését mutatja be.

A háromfázisú megoszlás (HFM) kisózás típusú frakcionáló módszer, amelyben a fehérjék oldatból való kiválása ammónium-szulfát és *terc*-butil-alkohol együttes alkalmazásának hatására következik be. A módszert első ismertetése óta (Odegaard et al., 1984) különböző enzimek tisztítására alkalmazták, ugyanakkor a folyamat mechanizmusa viszonylag kevésbé ismert (Dennison, Lovrien, 1997).

A KÉKI-ben először 1988-ban alkalmazták a HFM-et enzimek tisztítására, majd olyan torma peroxidáz tisztítási eljárást dolgoztak ki, amelynek meghatározó lépése a háromfázisú megoszlás (Szamos, Hoschke, 1992). Neutrális proteináz megoszlását tanulmányozva azt találták, hogy a fehérjementes, azonos összetételű kétfázisú rendszer határfelületi feszültsége korrelál a harmadik fázisban levált fehérje mennyiségével (Szamos, Kiss, 1995). A HFM-et marha és sertéshús fehérjék vizsgálatára alkalmazva egy kvalitatív analitikai módszer lehetőségét körvonalazták (Szamos et. al, 1998).

A vizes oldatból levált és visszaoldott fehérjék elektroforézisével vagy kromatografálásával a háromfázisú megoszlás detektáló, vagy *screening* jellegű fehérjeanalitikai eljárássá fejleszthető.

A HFM fehérjevizsgálatra való alkalmazásának keretében az alábbi célokat tűztem ki:

A/ ovalbumin, illetve β -laktoglobulin háromfázisú megoszlását jellemző paraméterek meghatározása különböző összetételű (só, alkohol, fehérjetartalom) rendszerekben

B/ a háromfázisú rendszerrel közölt mechanikai energia hatásának vizsgálata

C/ növényi (kukorica) és állati (ponty) fehérjék háromfázisú megoszlásának tanulmányozása a levált és visszaoldott fehérjék nem egyensúlyi pH gradiens elektroforézisével (NEpHGE).

MÓDSZEREK

Az egyes fehérjék (ovalbumin, β -laktoglobulin) háromfázisú megoszlását kilenc különböző összetételű rendszerben vizsgáltam, míg a mechanikai energiaközlés hatását egy adott összetételű rendszerrel tanulmányoztam. A növényi és állati fehérjék megoszlásához kis só- és alkoholtartalmú, egyúttal a fázisok összetételének könnyű mérhetőségét biztosító rendszert dolgoztam ki.

A háromfázisú megoszlás után centrifugálásos módszerrel vizsgáltam a harmadik fázist alkotó fehérjék kompresszibilitását.

A fehérjetartalmat a festékkötődésen alapuló Bradford módszerrel mértem.

A fehérjekomponensek szétválasztásához a nem egyensúlyi pH gradiens elektroforézist, NEpHGE, alkalmaztam.

Kétdimenziós elválasztásra a NEpHGE-SDS-t alkalmaztam.

Az elektroforézissel elválasztott fehérjéket G 250 kolloid festéssel detektáltam.

A fehérje mintázatok dokumentálásához digitális kamerát alkalmaztam.

A fehérjesávok denzitométeres értékelését Quantity One szoftverrel végeztem.

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 sertéshús és marhahús fehérjék megkülönböztetésére.
- 3./ Megállapítottam, hogy a centrifugálás (4500xg) hatására kialakult harmadik fázis vastagsága, C (cm), és a levált fehérje mennyisége (sertés szarkoplazma fehérjék 0,6-3,1 mg/ml tartományban) között lineáris függés van. Hasonlóképpen C és a vizes fázis pH-ja (ponty szarkoplazma fehérjék, pH 3,7-8,0 tartomány) között is lineáris függés van.
- 4./ A HFM különleges enzimrögítő 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.
A β -laktoglobulin az összes (45) rendszerben gyakorlatilag 100 %-ban a harmadik fázisba került, tehát leválása független a rendszer összetételétől.
Az ovalbumin leválása a harmadik fázisban csak részleges a 2,8 mN/m-nél kisebb határfelületi feszültségű rendszerekben. A $\gamma=2,8-4,9$ mN/m tartományban szoros lineáris függést mutat a határfelületi feszültséggel ($r^2=0,94$), tehát függ a rendszer összetételétől.
- 7./ Megállapítottam, hogy a 41/24 (ammónium-szulfát relatív telítés/*terc*-butil-alkohol térfogatszázalék) összetételű rendszerekben a szarkoplazma fehérjék (búza, csirke, marha és sertés) leválása független a közölt mechanikai energiától.

A centrifugálással kapott fehérjekorong vastagsága a mechanikai energiával kétféleképpen változik; 1./ növekszik, majd állandósul (sertés, csirke), illetve 2./ csökken (búza, marha).

8./ Megállapítottam, hogy a ponty szarkoplazma fehérjék háromfázisú megoszlása pH-függő, mivel a 21/30 (relatív sótelítés/*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 borát pufferral (pH 10,0) kioldható fehérjéinek háromfázisú megoszlása 21/30 (relatív ammónium-szulfát telítés/ *terc*-butil-alkohol térfogatszázalék) rendszerben, a pH 4,8 – 7,9 tartományban pH független.

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.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

- Adányi, N., **Szamos, J.**, Szabó, E.E., Váradi, M. (1999): Interfacial enzyme partitioning as a tool for constructing biosensors. *Acta Alimentaria*, 28, 329-338
- Borbás, R., Turza., S., **Szamos, J.**, Kiss, E. (2001): Analysis of protein gels formed by interfacial partitioning. *Colloid and Polymer Science* 279, 705-713
- 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.
- Kiss, É., **Szamos, J.**, Tamás, B., Borbás, R.B. (1998): Interfacial behavior of proteins in three-phase partitioning using salt-containing water/tert-butanol systems. *Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 142, 295-302
- Jánosi, A., **Szamos, J.** (2001): Comparison of two methods in purification of meat-DNA for PCR. *Acta Alimentaria*, 30, 113-118
- Kiss É., Tamás, B., Borbás, R., **Szamos, J** (1998): Fehérjék határfelületi viselkedése a háromfázisú megoszlás során víz-tercier-butanol-só háromkomponensű rendszerben. *Magyar Kémiai Folyóirat*, 104, 422-429.p.
- Szamos, J.**, Hoschke, Á. (1992): Purification of horseradish peroxidase by three-phase partitioning (TPP). *Acta Alimentaria*, 21, 253-260
- 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.
- Szamos, J.**, Jánosi, A., Tamás, B., Kiss, É. (1998): A novel partitioning method as a possible tool for investigating meat. I. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A*, 206, 208-212
- CD: Szamos, J.**(2004): Comparison of fish proteins by nonequilibrium pH gradient electrophoresis (NEpHGE). In: Congress Proceedings, Folder P-S-36_Jen, 2nd Central European Congress on Food, 26-28 April 2004, Budapest
- Szamos, J.** (2005): Behaviour of carp drip proteins and corn proteins in three phase partitioning (in preparation)