

**BÚZA TARTALÉKFEHÉRJÉK FUNKCIONÁLIS
TULAJDONSÁGAINAK TANULMÁNYOZÁSA MODELL
RENDSZERBEN**

Zárójelentés

Pályázati résztvevők:
ELTE TTK Növényélettani Tanszék
BMGE Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék
Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ

2004-2008

BEVEZETÉS

Az OTKA pályázat keretében javaslatot tettünk egy olyan új modell rendszer kidolgozására és felhasználására reológiai kutatásokban, mellyel búza tartalékfehérjék funkcionális tulajdonságait tudjuk tanulmányozni nem búzaliszt alapú háttérben. A modell rendszer alapja a rizs, melynek géntechnológiai úton való módosítása biolisztikus módszerrel az egyszikűek között jelenleg a legkönnyebben megvalósítható. **Az eddig használt módszerekkel szemben, véleményünk szerint, ez a modell újat jelent abban, hogy a búza tartalékfehérjék tulajdonságainak, a tészta szerkezetére gyakorolt hatásának olyan elemei is vizsgálhatók, melyekre korábban nem volt lehetőség az endogén búzafehérjék hatása miatt. A fehérjék egyes szerkezeti elemeinek a funkcionális tulajdonságokra gyakorolt olyan változásait is képesek lehetünk tanulmányozni, melyek korábban rejtve maradtak.**

1. év

Az első év munkáinak célja: A rizsből őrölt liszt felhasználásával kenyértészta-jellegű konzisztenciával rendelkező alapanyag előállítás. A transzgenikus növények előállításának elindítása, rezisztens rizs növények regenerálása.

Az alábbi munkák elvégzését vállaltuk

- Modell rendszer alapjainak kidolgozása
 - rizsszem őrlés, frakcionálás,
 - vízfelvétel tanulmányozása,
 - viszkozitás változtatása adalékanyagok és kezelések hatására
- Transzformálás
 - rizs transzformálása 1Dx5 és 1Dy10 HMW génekkel külön-külön
 - transzgenikus növények regenerálása, jellemzése DNS szinten,

Az első évben elvégzett munka összefoglalása:

1. A hazai, kereskedelmi forgalomban kapható rizsliszteket vizsgáltunk. Olyan rizsliszteket vizsgáltunk, melyek összetételüket és fiziko-kémiai tulajdonságaikat tekintve különböznek. Származásuk szerint a következő mintákat választottuk: egy vietnami, egy hosszú szemű baszmati, egy kunsági, és egy kínai fajta. Emellett, kísérleti jelleggel, kunsági „A” kategóriás rizsből és vietnami darából laboratóriumi körülmények között is állítottunk elő lisztet, amelynek a későbbi transzformációs kísérletekből származó szemtermés feldolgozása során lesz jelentősége. Valamennyi rizsliszt minta esetében a beltartalmi paraméterek közül

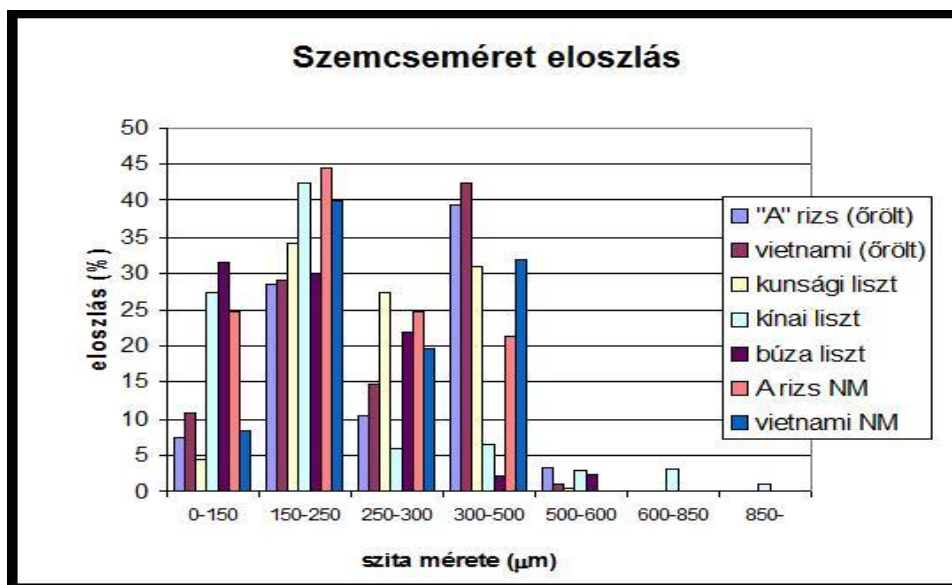
meghatároztuk a minták fehérje, zsír, hamu és nedvességtartalmát. A rizs funkcionalitásának alakulása szempontjából a keményítő összetétele szintén meghatározó lehet. Ezért az amilóz/amilopektin arányt is megmértük rizsliszt mintákra. A beltartalmi paraméterek mellett az egyes lisztek fizikai paraméterei közül a minták szemcseméret eloszlását és vízfelvevő képességét is vizsgáltuk. A szemcseméret eloszlást különböző méretű sziták használatával, a vízfelvevő képességet tömeg visszamérési módszerrel határoztuk meg.

Eddigi eredményeinket az **1. táblázat** és az **1. ábra** összegzi:

- A táblázatban látható, hogy a rizsliszt minták kémiai összetétele (nedvesség-, zsír-, és hamu tartalom) nem különbözik szignifikánsan egymástól. A fehérjetartalomban közel 2%-nyi különbsége azonban várhatóan a rizslisztekből készült tészták funkcionális tulajdonságok alakulására is hatással lesz.
- A különböző rizslisztek szemcseméret eloszlás-profilja és vízkötő képesség jelentősen különbözik. Mivel a rizstészták kialakulása során és reológiai tulajdonságaiknál a vízfelvételnél meghatározó szerepe van, a minősítő módszerek kidolgozása során a mintaelőkészítés módját is standardizálni kellett.

1. táblázat. A vizsgálat rizslisztek beltartalmi adatai és fizikai tulajdonságai

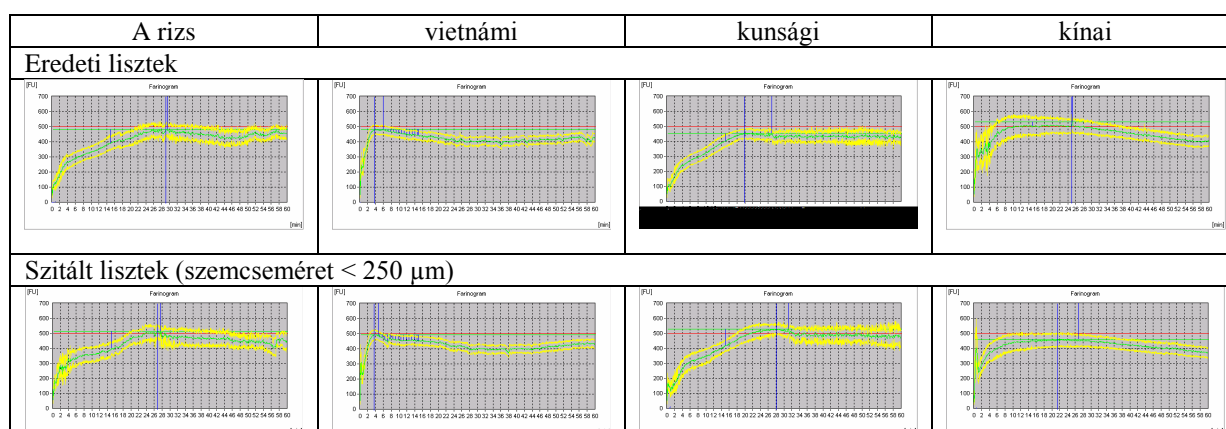
Minta	fehérje (% Nx5,95)	nedvesség (%)	zsír(%)	hamu (%)	WA teljes liszt (%)	WA>250nm (%)
A rizs	6,54	14,25	0,49	0,37	71	52,6
vietnami	7,37	14	0,59	0,26	52	55
baszmati	8,1	12,54	0,19	0,31	xx	xx
kunsági	6,52	13	0,26	0,46	66	62
kinai	6,96	13,3	0,09	0,08	76	62,5



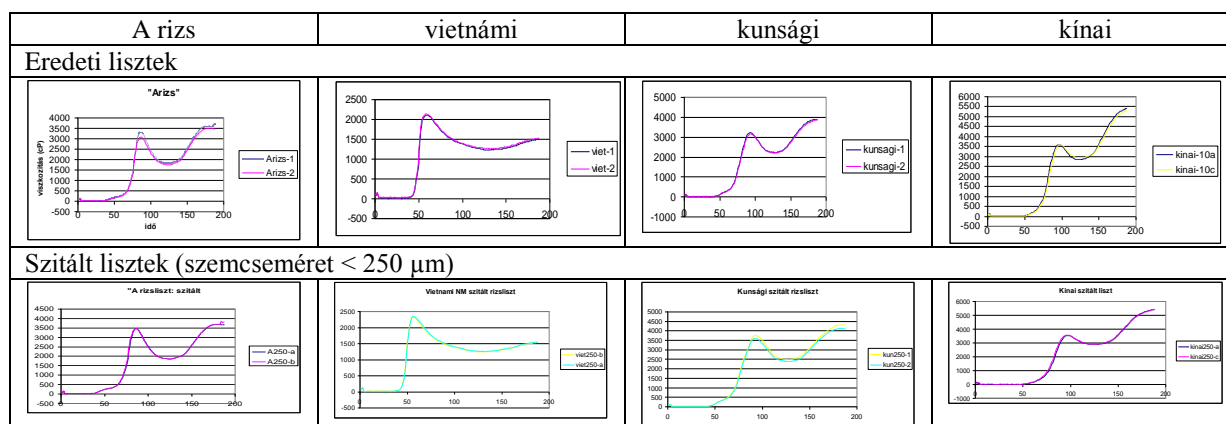
1. ábra. A vizsgált rizsliszt minták szemcseméret eloszlása

2. A rizstészta reológiai tulajdonságainak jellemzésére az irodalomban nagyon kevés mérési eljárás található. Ugyanakkor a kutatómunka eredeti célkitűzéseinek megvalósítása rutinszerűen alkalmazható módszer nélkül nem képzelhető el. Ezért a búzalisztek minősítésénél szabványos módszerként alkalmazott farinográfos, és komplex minták viszkozitásának mérése alkalmas és az utóbbi években rohamosan terjedő mérés technikát a gyors viszko analízatoros (RVA) mérés technikákat adaptáltuk, alkalmasságukat tanulmányoztuk, illetve a kapott eredményeket értelmeztük.

A munka során elsősorban búzaminősítési tapasztalatainkra támaszkodva dolgoztuk ki a módszert a rizslisztek Farinográfos vizsgálatára. Az RVA esetében irodalmi referenciák alapján adaptáltuk a módszereket, amelynek ismertetésétől most eltekintünk. A módszerek segítségével elvégeztük valamennyi vizsgálati rizsliszt minta minősítését.



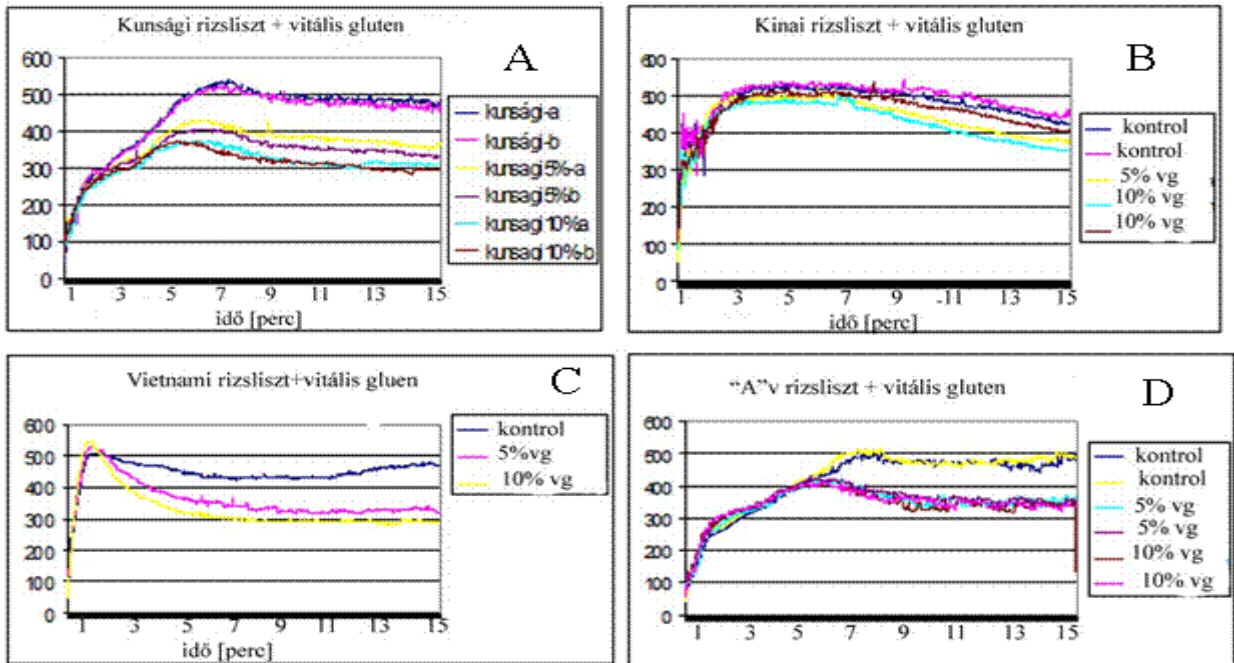
2. ábra. Rizslisztek farinogram görbéi



3. ábra. Rizslisztek viszkozitás görbéi

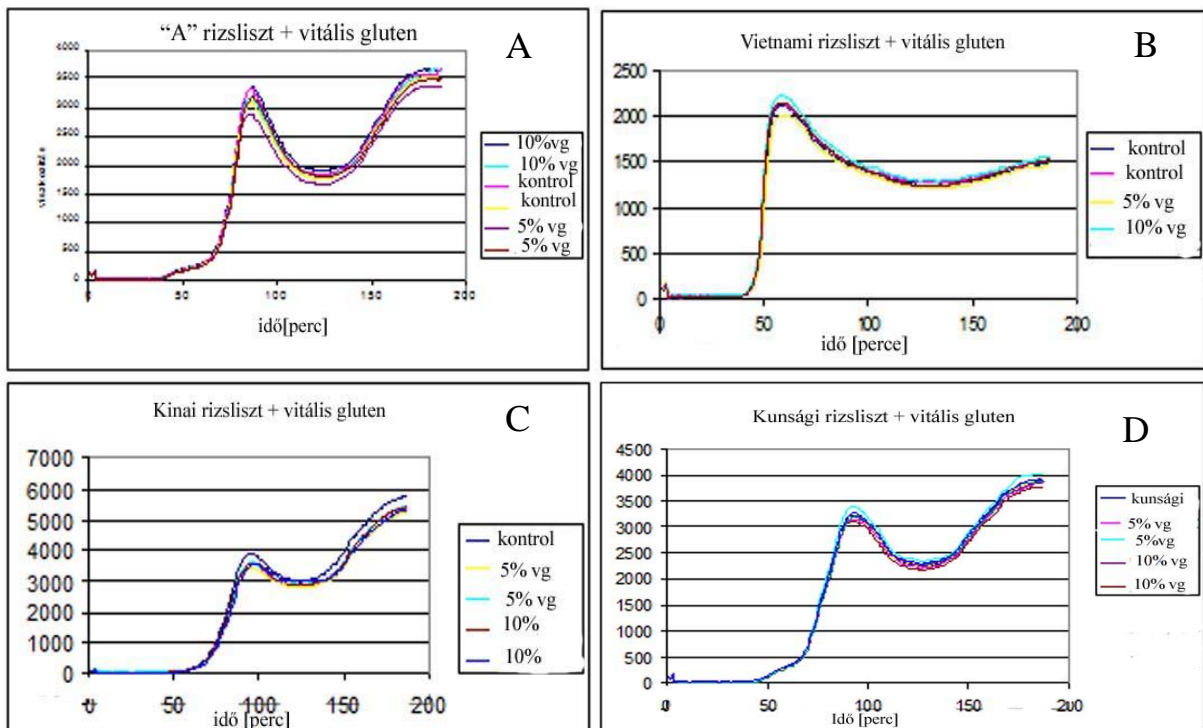
3. A kutatás célkitűzésének megvalósítása szempontjából alapvető fontosságú annak a kérdésnek az eldöntése, hogy a vizsgált funkcionális tulajdonságok kialakításában a fehérjék milyen szerepet játszanak. Az ismeret, hogy amíg a búzátészta esetében a jellegzetes fehérje (sikér) szerkezet meghatározó, addig a rizstészta tulajdonságait a keményítő összetétele és szerkezete döntő módon befolyásolja. Annak a kérdésnek az eldöntésére, hogy vajon a fehérjék befolyásolhatják a rizslisztből készült tészta dagasztási tulajdonságait, kísérleteinkben a vizsgált rizslisztekhez, fehérjetartalomra számított különböző mennyiségű sikérfehérjét adagoltunk *in vitro*, és vizsgáltuk a dagasztási és a viszkozitási jellemzők változását.

Eredményeinket a 4. ábra foglalja össze. Az eredményeket a következőképpen értelmeztük. A farinográfus vizsgálatokkal jellemezhető fizikai-kémiai tulajdonságok, a dagasztási jellemzők viszonylag érzékenyen változnak az adagolás hatására. Meglepő módon a változás iránya minden esetben, az eredeti tulajdonságtól függetlenül azonos: a tészták stabilitása csökken, ellágyulása nő az adagolással. Ez nagy valószínűséggel a fehérjék tulajdonságaira, vagy arra is visszavezethető jelenség, amelynek értelmezése meghatározó az *in vivo* fehérjebeépítés lehetséges funkcionális hatásainak előrejelzése, majd a későbbiekben szabályozása szempontjából. Véleményünk szerint a legfontosabb kérdés az, hogy a rizsfehérjék mekkora szerepet játszanak a dagasztási paraméterek alakításában, illetve milyen kölcsönhatások jöhetnek létre a rizsfehérjék és a búza tartalékfehérjék között. Ennek indirekt úton történő tanulmányozása céljából ismert tulajdonságú (MvSuba, Martonvásár) búzából készült lisztek tartalékfehérjeinek frakcionálását és ezeknek a tisztított frakcióknak az adagolását végeztük el.



4. ábra. Rizslisztekből készült tészta farinogramjainak változása búzasikér adagolásakor

A farinográfus vizsgálatokkal ellentétben a viszkozitás vizsgálata során viszont a búzafehérje adagolás egyik esetben sem okozott szignifikáns változást a göbék lefutásában (5. ábra).



5. ábra. Rizslisztekből készült tészta viszkozitás görbéinek változása búzasikér adagolásakor

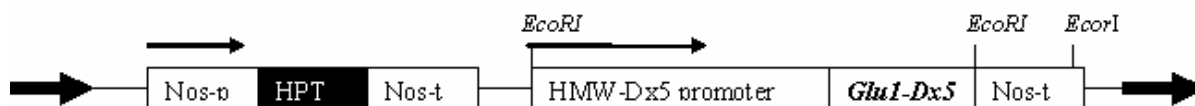
Ez alapvetően azzal magyarázható, hogy a viszkozitás változása leginkább a keményítő tulajdonságtól függ. Ugyanakkor komplex értelmezést kíván az a tény, hogy mindkét módszerrel meg tudjuk különböztetni az egyes rizsliszteket, tehát a funkcionális tulajdonságok alakításában mindkét főkomponens valamilyen szerepet betölt. Ezen funkciók feltárása és a kölcsönhatások vizsgálata vezethet a komplex rendszer viselkedésének legalább részleges megértéséhez.

II., Transzformálás

A rizs genetikai transzformációját az éretlen embrióból nyert kalluszokból indítottuk. A transzformációhoz használt rizsnövényből érett magokat steril lombikban, 70%-os etanollal, majd 50%-os háztartási hipóval 20 percig sterilizáltunk. A ráztatás után a rizsszemeket, steril desztillált vízben 5-6 alkalommal mostuk. A sterilizálás után a magokat steril körülmények között N6 kallusz indukáló táptalajra helyeztük. Az embriókat 7-9 napig 25 °C-on gyengébb megvilágítás mellett (10-30 $\mu\text{E-2s-1}$) tartottuk. A transzformációt megelőző napon, a kifejlődött kalluszokat az endospermiumról leválasztottuk, majd sötétben N6CO táptalajon inkubáltuk. A kalluszokat 24 órán belül biolisztikus módszerrel transzformáltuk.

A transzformálást magát a Jenes és mtsai. által kidolgozott módszer szerint végeztük el. A biolisztikus transzformációhoz a hazai fejlesztésű, szabadalmaztatott GENEBOOSTERTM-t használtuk (ELAK Bt, Budapest, MBK, Gödöllő). A 50 mg 0,6 μm átmérőjű aranysemcséket előzetesen 1 ml abszolút etanolban 3 percig intenzíven rázattuk majd centrifugáltuk (5 perc, 10000g). Az alkoholt elöntöttük, az aranysemcséket desztillált vízben 3x mostuk, majd 50% glicerinnel oldatba keverve tároltuk. A transzformációhoz 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNS molekulákat 0,1 mM-os frissen preparált spermicid és 2,5 M-os CaCl_2 oldat segítségével 50 mg/ml-es koncentrációjú aranyrészecskékhez kötöttük. Az így elkészített aranysemcsékkel minden célszövetre, 1100 psi nyomással, vákuum alatt a fékező rácstól 9 cm távolságra két lövést adtunk le.

A búza tartalékfehérjék közül az 1Dx5 és az 1Dy10 HMW glutenin fehérjék génjeit használtuk, mint transzgén, külön-külön. A gének promótere búza eredetű, endospermium specifikus promóter. A terminátor szekvencia is búzából származik. Az általunk alkalmazott szelekciós markergén a *hpt*, mely higromicinnel szembeni rezisztenciát biztosít. A szelekciós gén promótere a kukoricából származó, ubiquitin promóter. A transzformáláshoz felhasznált konstrukció sematikus rajzát a 6. ábra mutatja.



6. ábra. A transzformáláshoz felhasznált konstrukció

Első kísérletben 1250 embrióból indukáltunk elő kalluszt. A válogatás után 1120 kalluszt meglőttünk Dx5 HMW glutenin fehérje gént tartalmazó transzformációs kazettával.

A transzformáció után a kalluszokat négy-öt napig sötétben tartottuk, majd az integrálódott gént tartalmazó kalluszok kiválasztására hygromycin tartalmú N6SEh táptalajra helyeztük. A kalluszokat szelekciós táptalajon 3-4 hétig erőteljesebb megvilágítás mellett (45-55 μ E-2s-1) 25 °C-on tartottuk. Rendszerint a harmadik/negyedik héten a kalluszok felületén megjelenő kallusz kezdeményeket leválasztottuk és friss szelekciós táptalajon egy-két hétig növesztettük. A következő lépésben a szelektált kalluszokból hajtás- és gyökér regenerációt indukáltunk. A kalluszokat MS (Murashige és Skoog, 1962) 2 mg/l BAP és 1 mg/l NAA hormont tartalmazó regeneráló táptalajra helyeztünk. A hajtással rendelkező növényeket MS hormonmentes táptalajon gyökerezettük. A teljesen regenerálódott rizsnövények üvegházban nevelkedtek. A regenerálás során 10 növényt kaptunk. A szelekciós merkgén jelenlétének kimutatását a transzformált rizs növényekben DNS oldalról, PCR módszerrel végeztük.

PCR reakció

A bejuttatott gének integrációjának bizonyítására első lépésként a feltételezeten transzgenikus növények leveleiből DNS-t izoláltunk. AGS (Aqua Genomic Solution, product No.: 1011, Lot: 03052006) kit felhasználásával 25 mg levélmintát folyékony nitrogénben kvarchomokkal dörzsöltünk. Az elroncsolt levélszövetet 250 μ l AGS oldatban homogenizáltuk. Az oldathoz 30 μ l i-propanolt adtunk, majd 60°C-on 15 percig rázattuk, végül centrifugáltuk (4 perc, 12000 g). A DNS-t a felülúszóból azonos térfogatú i-propanollal kicsaptuk, majd az oldatot centrifugáltuk (2 perc, 12000g). A csapadékot 1 ml 70%-os etanollal háromszor mostuk, majd ismét centrifugáltuk (12000g). A DNS molekulákat 37°C-os termosztátban szárítottuk, majd 50 μ l 10 mM Trisz -ben (pH 8.0) 37°C-on oldatba vittük. A DNS oldatok koncentrációját 260 nm-en UV spektrofotométerrel határoztuk meg.

A transzformált gének beépülését PCR reakcióval bizonyítottuk. A PCR reakciókhoz a BioRad iCycler Thermal Cycler típusú készülékét használtuk. A reakciót 10 μ l végtérfogatban

20 mg DNS-sel, 1 µl PCR pufferrel (Dynezyme), 2 x 1µl primerrel, 0,2 µl dNTP-vel, 0,2 µl, enzimmel (Dynezyme) és 5,6 µl MilliQ-val végeztük.

2. táblázat. PCR reakcióban használt primerek szekvenciája

RIZS PROLAMIN PRIMEREK	
Rp6F	5'-CATCGGCTTAGGTGTAG-3'
Rp6R	5'-ATTGTTGTTGGATTCTACTAC-3'
BÚZA GLU1 DX5 PRIMEREK	
Prim51	5'-GCC TAG CAA CCT TCA CAATC-3'
Prim52	5'-GAA ACC TGC TGC GGA CAAG-3'
SZELEKCIÓS HTP PRIMEREK	
htp-F	5'-CAGAAGAAGATGTTGGCGAC-3'
htp-R	5'-TTATCGGCACTTTGCATCGG-3'

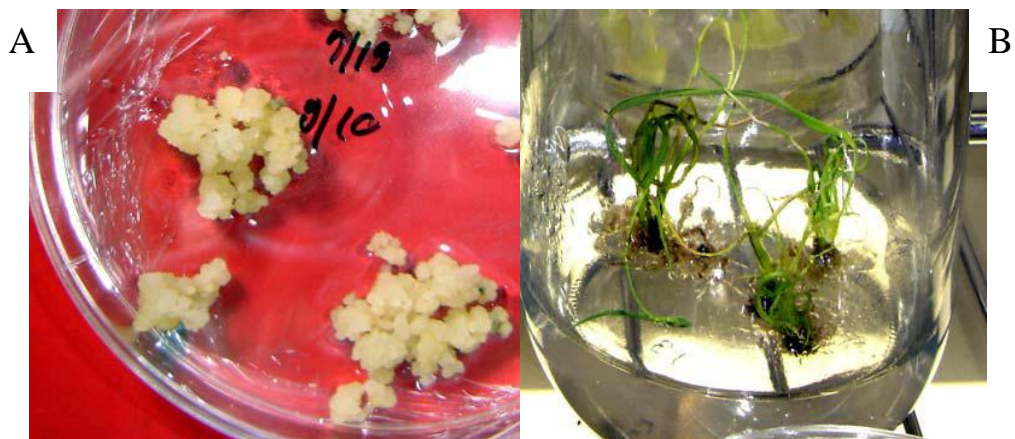
Az izolált növényi DNS-re három különböző PCR reakciót végeztünk. A rizs prolamin génnek, a HMW Dx5 glutenin fehérje gén és a *htp* szelekciós gének kimutatásához a génre specifikus primereket használtunk (2. táblázat). A reakciók során alkalmazott körülményeket a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat. PCR reakció körülményei

GÉN	PRIMER	KAPCSOLÁSI HŐM.	KAPCSOLÁSI IDŐ	ELONGÁCIÓS IDŐ	ELONGÁCIÓS IDŐ
Rizs prolamin	Rp6FRp6R	55oC	20 sec	72oC	30 sec
Búza Glu1 Dx5	prim51-52	58 oC	25 sec	72oC	30 sec
Szelekciós Htp	HtpF-HtpR	55oC	20 sec	72oC	30 sec

A PCR reakció után a termékeket 1,5 %-os agaróz gélen futattuk, majd a DNS termékeket etidium-bromiddal megfestve UV fényben analizáltuk.

A PCR vizsgálatok eredménye alapján eddig 8 higromicin rezisztens növényt találtunk, melyek további nevelése magfogásig növényházban történt. Következő kísérletben 980 embrióból állítottunk elő kalluszt, melyből válogatás után 870-et transzformáltunk Dy10 HMW glutenin fehérje gént tartalmazó transzformációs kazettával. A növényeket szelekció után regeneráltuk (7. ábra).



7. ábra. (A) kalluszok szelekciója (B) regenerált transzgenikus növények

2. év

Az olyan kutatási területeken, mint a gabonafajták nemesítési folyamatainak kezdeti szakaszában történő vizsgálatok, a genetikai módosítás lehetőségeinek tanulmányozása vagy a változások molekuláris szinten történő magyarázatához szükséges vizsgálatok esetében a minta rendszerint korlátozott mennyiségben áll rendelkezésre. A hagyományos búzaliszt minősítési műszerek analógiájára készült, ún. mikro-készülékek, valamint mikro módszerek alkalmazása lehetővé tette, hogy néhány grammnyi liszt minőségi paramétereit, illetve a minőségi paramétereknek néhány mg tisztított fehérjekomponens adagolása hatására bekövetkezett változásait követni tudjuk.

A mikro műszerek fejlesztése és az eredmények automatikus regisztrálása jobb reprodukálhatóságot és objektívebb értékelést tett lehetővé. Az ilyen méretű műszerekkel olyan kísérleteket lehetett elvégezni, melyek korábbi technológiáikkal nem voltak megvalósíthatók. A mikro vizsgálatokra alkalmas műszerek egyik tagja a mikro-valorigráf (mikro z-arm mixer). A mikro z-arm mixer állandó fordulatszámon, a tengelyen ébredő erővel arányos és a motor teljesítményében bekövetkező áramerősség-változást méri.

A Mikro-valorigráfos mérés technika alkalmazása rizslisztre

Az első évben elvégzett Farinográfus kísérletek vizsgálatok kedvező eredményei után a rizslisztek reológiai tulajdonságainak részletesebb megismeréséhez, a lisztek összehasonlításához a búzaliszt minősítés hagyományos mikro-módszerek közül a Farinográfal analóg elvű mikro z-arm mixert használtuk. Erre azért volt szükség, mert a

későbbiekben a rizs genetikai transzformációja után kapott szemtermés mennyisége limitált, így az *in vitro* és *in vivo* kísérletek során kapott eredményeket össze tudtuk hasonlítani.

A munka során 11 fajtaazonos lisztet vizsgáltunk meg. Ebből 5 nemesített magyarfajta, melyet Simonné, Dr. Kis Ibolya bocsátott rendelkezésünkre, valamint 6 ausztrál, melyet a CSIRO Plant Industry nemesítőitől kaptunk. A rizsmagokat először laboratóriumi malmom (METEFÉM, Budapest) megőröltük, majd 250 µm átmérőjű szitán megszitáltuk.

A rizslisztek dagasztási görbáját egy standard búzátészta görbéjéhez viszonyítva a farinográfus kísérletekben is tapasztalt hosszú hidratációs folyamat jellemezte. Amint az irodalmi adatokból ismert búzaliszt esetében is, ez a hidratációs folyamat a görbe korai szakaszánál tapasztalt nagyobb mértékű „zaj” formájában mutatkozik. A különböző szintű hidratációs háttérű „zaj” miatt egy ún. „hidratációs” (Hyd) paramétert vezettünk be a rizslisztekre, amely a tészta-kialakulás előtt a hidratációhoz szükséges időt jelenti.

A vizsgált fajták dagasztási paramétereit a 4. táblázat foglalja össze. A mért dagasztási idők széles intervallumban változtak (463-1086 sec). A fajták több mint 25%-nál a mért DDT értékek meghaladták a 1000 sec-t, és mindösszesen 2 fajta volt jellemezhető 700s alatti dagasztási idővel. A dagasztással szembeni ellenállás értékei (PR) 339 és 633 között nagy variabilitást mutattak.

4. táblázat. Rizslisztek z-arm mixeren mért dagasztási paramétereit

	DDT (SEC)	PR (VU)	HYD (SEC)
BIORYZA-6	1026	455	520
M-60	699	339	405
DAMA	1077	383	330
JANKA	893	420	200
SANDORA	881	466	220
BROWN	846	525	402
KYEEMA	753	587	530
LANGI	789	502	365
DOONGARA	862	633	250
REIZIQ	1086	496	250
ILLADONG	463	587	245

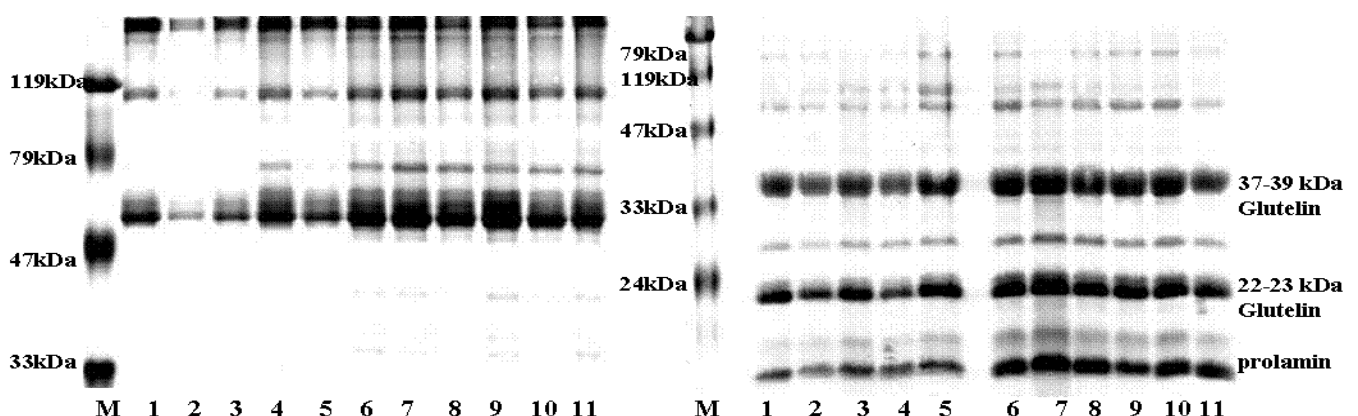
A táblázatból látható, hogy a különböző rizslisztek hidratációs ideje 200 sec és 530 sec között változott. A hidratációhoz szükséges idő a minták 45%-ban 250 sec vagy ennél kisebb érték volt. A vizsgált fajták alapján a magyar nemesített fajták hosszabb hidratációs idővel, alacsonyabb PR értékkel, és hosszabb dagasztási idővel rendelkeztek, mint az ausztrál fajták. A magyar rizslisztek viselkedése a dagasztás folyamán hasonló az irodalomban is leírt rizslisztekkel. Az ausztrál rizsfajták esetében a DDT illetve a Hyd értékek átlagosan alacsonyabbak voltak, míg a dagasztással szembeni ellenállás értéke nagyobb volt. Az

ausztrál rizslisztek dagasztása során felvett görbéi jellegükben hasonítottak a búzaliszt dagasztási görbéjéhez. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a mikro z-arm mixer alkalmas a különböző rizsfajtáknak a reológiai tulajdonságuk alapján történő csoportosításra. A rizslisztek dagasztási görbéiben megjelenő különbségekből azonban még nem tudtunk közvetlen következtetni a fehérjék összetételére, a fehérjéknek a reológiai tulajdonságok meghatározásában játszott szerepére. A korábbi farinográfós addíciós kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a fehérjéknek fontos szerepe van, illetve lehet a rizstészta funkcionális tulajdonságainak kialakításában. Ennek igazolására a rizsliszt fehérjék részletes jellemzésére volt szükség.

2. A rizsfehérje polimerek vizsgálata poliakrilamid gélelektroforézissel és HPLC-vel

A rizslisztek fehérjéinek kinyerésére Furukawa és mtsai. [2003] módszerét alkalmaztuk. A vizsgálat rizslisztek fehérjéit 50 mg lisztből nyertük ki 1,5 mL 2% SDS –t (nátriumdodecyl szulfát) tartalmazó Trisz-HCL pufferrel (pH=8.0) 30 percig 60°C-os vízfürdőn inkubálva. Ezután a szuszpenziót centrifugáltuk (30 perc, 10000g). A további kísérletekben a felülúszót használtuk.

A rizsliszt fehérjefrakcióinak izolálására alkalmas körülményeket teremtve, azaz a diszulfidkötések (merkaptóetanol), illetve a másodlagos kötések (SDS) megbontásával a rizsfehérje alegységek jellemzésére alkalmas preparátumokat is előállítottuk. Ez esetben az extrakció során használt extrahálószerhez 5% 2-ME-t adtunk, majd a továbbiakban a fent leírt módon jártunk el.



8. ábra. Rizsfehérjék SDS gélelektroforézise redukálószer nélkül (A), és redukálószerrel (B)

M: molekulásúly standard, 1-11 rizslisztek: Biorysa”, “Dama”, “Janka”, “M-60”, “Sandora”, “Dongara”, “Illadong”, “Brown”, “Langi”, “Klyeema”, és “Reiziq”.

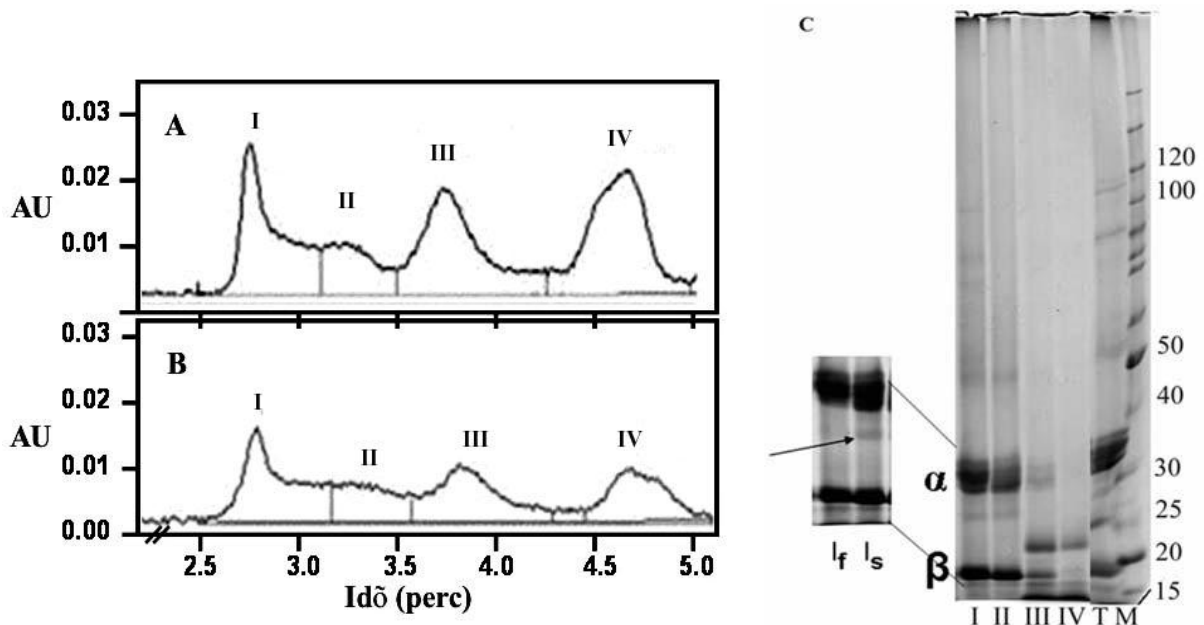
A rizs polimer fehérjéi a polimerizálódni képes globulin fehérjékből felépülő glutelinek, melyek 47 kDa-nál nagyobb molekulatömegűek. A 8/A ábra felső és középső részén látható fehérjesávok a 120 kDa-t is meghaladó glutelin polimereket, a legalsó tartományban a globulin oligomereket mutatja. A redukálószer nélkül extrahált fehérjék között a 47 kDa –nál nagyobb molekulaméretű rizsfehérjék a legtöbb esetben eltűnnek a redukálószer (β -ME) hozzáadása után. A fehérjék redukciója után a 47 kDa-nál kisebb molekulaméretű fehérjék jelzik, hogy ezek a rizsfehérje polipeptidek eredetileg diszulfid hidakkal stabilizált polimer formában vannak jelen a lisztben. Az 8/B ábrán feltüntetett nyilak közül a legalsó a legkisebb molekulatömeggel (13-16 kDa) rendelkező prolaminokat, az azt követő a 22-23 kDa nagyságú glutelin alegységeket jelzi, a legfelső nyíl a 37-39 kDa nagyságú, ugyancsak glutelin alegységeket mutatja.

Tartalékfehérjék SE-HPLC vizsgálata

A fajtaazonos rizslisztek teljes fehérje összetételét SE-HPLC-vel vizsgáltuk. Meghatároztuk a teljes fehérje extraktum relatív glutelin, globulin, prolamin és albumin tartalmát. A kísérletek kezdetén a szakirodalomban a rizslisztek ilyen jellemzéséről nem volt adat. A munka során jelent meg Van der Borgh és mtsai.-nak [2006] publikációja, amelynek célkitűzései és az elvégzett kísérletek metodikai megoldásai átfedésben voltak az általunk végzett kísérletekkel. A megjelent irodalom segítségünkre volt az eredmények értékelésében.

A rizsfehérjék molekulaméret eloszlásának vizsgálatára az addigi irodalmi ismeretek alapján a búzafehérjékre kidolgozott SE-HPLC módszert alkalmaztuk. A HPLC analízishez a rizsliszt- illetve tészta- mintákból háromféle kinyerést végeztünk. A kétlépéses extrakció során először 10 mg liszthez 1 ml pH 6.9-es foszfát-puffert adtunk, majd az oldatot 30 percig rázattuk, végül centrifugáltuk (10 perc, 12000g). A felülúszót 45 μ m átmérőjű szűrőn szűrtük. Az így kinyert fehérje oldatot 'oldható' frakciónak neveztük el. A centrifugálás után visszamaradt csapadékot 1 ml pufferben 30 másodpercig 50%-os amplitúdóval, szobahőmérsékleten szonikáltuk, majd a fehérjeoldatot centrifugáltuk (10 perc, 12000g) és szűrtük. Ezt a fehérjeoldatot 'oldhatatlan' frakciónak hívtuk. A teljes fehérjét egy lépésben, 10 mg mintából 1 ml pufferrel 50%os amplitúdóval 45 másodpercig tartó szonikálással nyertük ki, melyet a fent leírtak szerint centrifugálás, és szűrés követett. Az így kinyert fehérjét Alliance, Waters 2695 típusú HPLC készüléken méretkizárásos HPLC (Phenomenex BioSep-SEC-S4000, 300 x 7, 80 mm, 5 micron clone) oszlopon elválasztottuk. A mintákat acetonitril, desztillált víz és TFA (50:50:01) keverékében eluáltuk. Az analízis ideje 10 perc volt.

A fehérje extraktumok „oldható”, illetve - egy szonikálási lépést követően nyert - „oldhatatlan” frakcióinak kromatogramján megjelenő négy csúcsot a 7. ábra mutatja be. Feltételezéseink szerint ezek a frakciók az α és β glutelin alegység-fehérjék különböző mértékben oligomerizálódott termékei, vagyis trimer- dimer- és monomer fehérjék, amelyekben a 151 kDa, illetve 105 kDa molekulásúlyú monomerek inter-molekuláris diszulfidhidak révén kapcsolódnak össze. Az utolsó (negyedik) frakció kisebb polipeptidek, albuminok, monomer globulinok és prolaminok keveréke.



9. ábra. Rizslisztek SE-HPLC kromatogramja: (A) „oldható” és (B) „oldhatatlan” frakciók (C) az SE-HPLC frakciók redukált/alkilált fehérjéinek SDS-PAGE elektroforézissel
I frakció: - α - β glutelin trimer, II frakció: - α - β glutelin dimer, III frakció: - α - β glutelin monomer –IV frakció: monomerek T: teljes fehérje, M: molekulastandard

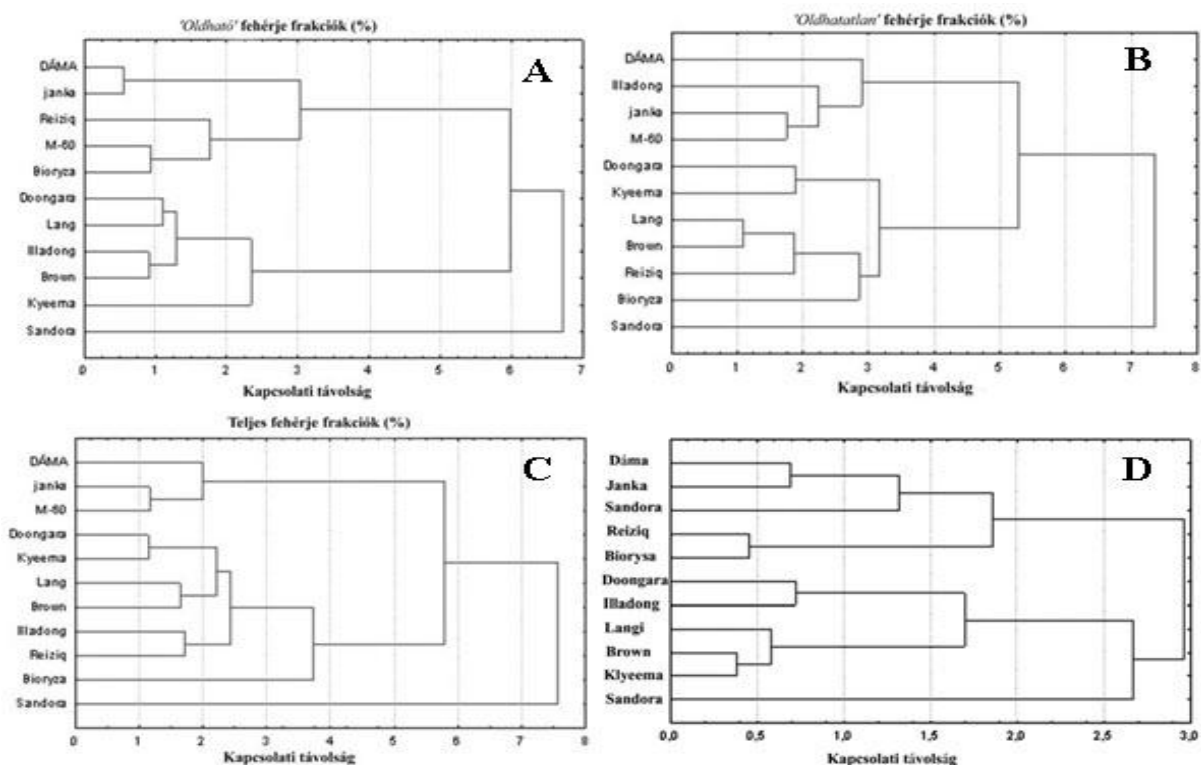
A redukált/alkilezett HPLC frakciók jellemzése az eredeti elképzelések mellett további részleteket tárt fel a fehérjék összetételéről illetve szerkezetéről. Az első frakciót két, egy gyorsabban és egy lassabban elváló rész-frakcióként gyűjtöttük össze (If illetve Is). Ezen frakcióknak az elektroforetikus képe azt mutatta, hogy az α és β glutelin alegységek két régiója között megjelenik egy extra sáv. Ez a fehérje nem látható azon az elektroforetikus képen, melyen a mintákat nem redukált körülmények között futtattuk. Ebből arra következtettünk, hogy ezek a fehérjék feltehetően a glutenin polimerek komponensei. Az elektroforézis eredményéből az is látható, hogy a kisebb fehérjék már a III frakció monomerjeivel, az α és β glutelin alegységekkel együtt kezdtek leválni.

A kapott eredmények mennyiségi értékelése számos, a búza- és rizsfehérje komponensek közötti kölcsönhatások eltérő mértékére és természetére utaló következtetés levonására adnak alkalmat. A minta-előkészítés során alkalmazott kétlépéses extrakció miatti megoszlás az „oldható” és „oldhatatlan” frakció között eltérő az irodalomból ismert búza és az általunk vizsgált rizs esetében. Míg valamennyi monomer búzafehérje (albumin/globulin frakció és gliadinok) szonikálás nélkül is kinyerhető, addig a rizsfehérje monomerek körülbelül egyharmada nem nyerhető ki szonikálás nélkül. Ezek a különbségek feltehetően inkább a fehérje-fehérje kölcsönhatásokból származnak, nem pedig az egyes fehérje molekulák szerkezeti különbségéből. Ezeknek a kölcsönhatásoknak a jellemzésére a minták oldhatósági százalékát, illetve az oldhatatlan polimer fehérjék százalékos mennyiségeinek (UPP%) értékeit alkalmaztuk.

Az oldhatósági % értékét az egyes SE-HPLC frakciók mennyiségi arányát kifejező paraméterként definiáltuk.

A teljes görbe alatti területek és fehérjefrakciók számított relatív mennyiségére statisztikai módszerrel varianciaanalízist végeztünk. A lisztek oldhatósági%-ára és az UPP% értékekre elvégzett statisztikai elemzés alapján a két paraméter között szignifikáns negatív korreláció áll fenn ($r = -0.788$, $n-1$, $p=0,05$). Ez azt jelenti, hogy a nagy mennyiségű oldhatatlan polimereket tartalmazó mintákban az oldhatóságot a monomer fehérjék negatívan befolyásolják. A kisebb oldhatóság annak a jele, hogy a nagy polimer fehérjék a monomer fehérjékkel könnyebben kölcsönhatásba léphetnek.

A rizslisztek SE-HPLC vizsgálata során kapott UPP% értéke alapján rokonsági kapcsolatot tudunk felállítani a fajták között. A dendogram szerint a fajták két nagy csoportra oszthatók, de a „Sandora” rizsliszt ebben a paraméterben szignifikánsan különbséget mutat a többi fajtához képest. A rizslisztek a fehérjefrakciók relatív mennyisége alapján is csoportosíthatók (10. ábra).



10. ábra. Cluster analízis: Rizslisztek kapcsolata az SE-HPLC fehérjefrakciók alapján.
(A) 'oldható' frakciók; (B) 'oldhatatlan' frakciók; (C) teljes fehérje frakciók

A rizsfehérjék analitikai és funkcionális jellemzése után a tartalékfehérje mennyiségi paraméterei és a tészta dagasztási paraméterei között fennálló összefüggéseket vizsgáltuk. A fehérjék szerepét a rizstészta dagasztási paramétereinek kialakításában a rizsfehérje frakciók relatív mennyisége és a mikro z-arm mixerrel mért dagasztási paraméterek közötti kapcsolattal bizonyítottuk. A tartalékfehérje frakciók abszolút és relatív mennyiségére, valamint a tészta reológiai paramétereire statisztikai elemzést végeztünk (5. táblázat).

5. táblázat. Korreláció a fehérje frakciók relatív mennyisége és a dagasztási paraméterek között. * <0.1 , ** <0.05 és *** <0.01 szignifikancia szint

	α/β GLUTELIN timer (%)	α/β GLUTELIN dimer (%)	α/β GLUTELIN monomer (%)	MONOMEREK (%)	TELJES TERÜLET (%)
oldható					
PR	0,68***	0,55**	0,77*	068**	0,82*
DDT	-0,42	-0,35	-0,6	-0,45	0,00
HYD	0,05	-0,21	0,3	0,11	0,13
oldhatatlan					
PR	-0,01	0,39	0,49	0,61**	0,57***
DDT	0,65**	0,09	-0,02	0,00	0,28
HYD	0,24	0,05	0,42	0,15	0,36
teljes					
PR	0,36	0,49	0,70**	068**	081*
DDT	0,27	-0,13	-0,37	-0,3	-0,27
HYD	0,21	-0,09	0,39	0,13	0,25

A vizsgált oldható és oldhatatlan rizsfehérje extraktum teljes mennyisége szignifikáns korrelációt mutatott a dagasztási idővel. A korrelációs vizsgálatok eredményeiből arra következtettünk, hogy a nagy polimerek mennyisége számottevően befolyásolja a tészta dagasztási idejét. Szignifikáns korreláció volt a lisztek DDT értéke és a glutelin trimerek frakciójának mennyisége között a teljes fehérje extraktumban. Ez azt jelenti, hogy a nagyobb mennyiségű, illetve nagyobb méretű polimer molekulák jelenléte megnöveli a tészta dagasztásához szükséges időt.

A búzaliszt kísérletekből ismert, hogy az optimális dagasztással szembeni ellenállásához szükséges víz mennyiségét a fehérje és pentozán tartalom, valamint a keményítősérülés befolyásolja a legnagyobb mértékben. A rizsliszt esetében nem találtunk kapcsolatot a hidratációs (Hyd) paraméter és az teljes fehérje mennyiség értéke között, amiből arra következtettünk, hogy a rizs esetében a fehérjék a hidratációs folyamatokban és a víz abszorpcióban az egyéb komponensek mellett kisebb szerepet játszanak.

A korrelációs vizsgálatok pozitív kapcsolatot mutattak a DDT és fehérjefrakciók UPP% értéke között, míg a korreláció negatív volt a dagasztási idő és az oldhatósági % értékei között. Azok a minták tehát, melyek UPP%-a magas volt nagyobb dagasztási idővel rendelkeztek. Összefoglalva megállapítottuk, hogy a mikro z-arm mixerrel végzett dagasztási kísérletek és az SE-HPLC eredmények igazolták, hogy a búzatésztahoz hasonlóan a rizstészta reológiai paramétereit a fehérje összetétele is befolyásolja.

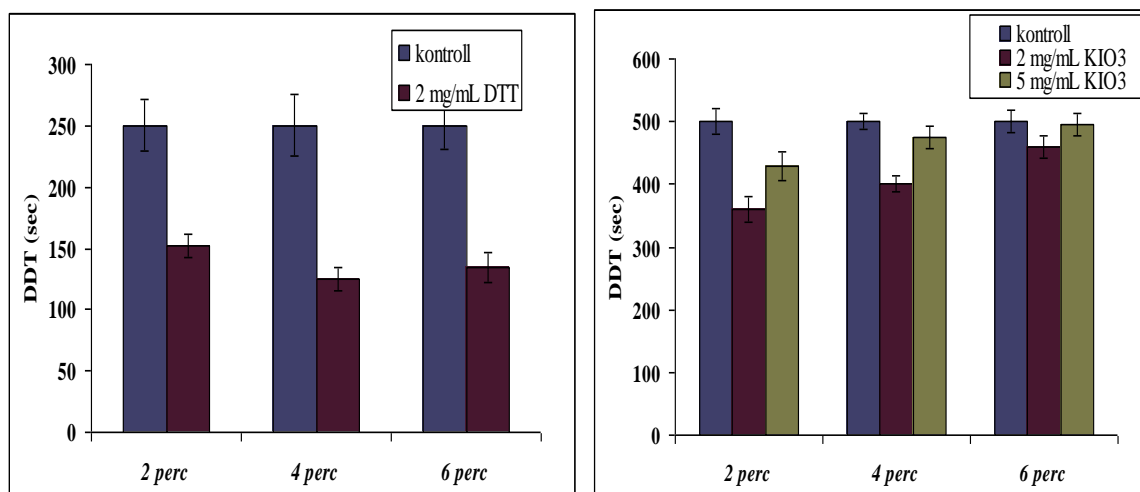
Redukció/oxidáció paramétereinek optimalizálása rizsfehérjékre

A búza glutenin alegységek hatását a rizstészta funkcionális tulajdonságaira az alegységek polimerbe történő beépítésével vizsgáltuk. Az alegységek beépítéséhez egy, a rizsre specifikus módszert dolgoztunk ki, amely a fehérjék diszulfidkötéseit megbontó, majd a kötéseket felépítő redukciós/oxidációs folyamat optimalizálásának Békés és mtsai. [1994] által búzára kidolgozott módszerén alapul. Az optimális paraméterek meghatározásához a módszer gyors kidolgozhatósága érdekében az 'Illadong' fajtaazonos rizslisztet választottunk, melynek dagasztási ideje a mikro z-arm mixerben végzett kísérletek során rövid volt. A korábbi búzára elvégzett kutatásokból kiderül, hogy a redukálószerrel a tészta kialakulása előtt kell a liszttel összekeverni. Kísérleteinkben az adagolás pillanatától kezdve 30, illetve 45 másodpercig regisztráltuk a görbét. A rizslisztekre jellemző lassú hidratációs folyamat miatt az optimális időszükségletet 45 másodpercben állapítottuk meg. A redukálószerként DTT- t alkalmaztunk. A DTT koncentrációt úgy határoztuk meg, hogy a tészta fehérjéinek redukciója

csak részleges, később visszafordítható legyen, azaz a tészta a redukció után továbbra is megtartsa tésztajellegét.

A fehérjék részleges redukciójához szükséges DTT koncentrációt 2 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml és 30 mg/ml oldatokat felhasználásával állapítottuk meg. A redukálószer szignifikánsan befolyásolta a tészta erősséget. A kezelt tészta dagasztási ideje a kontroll tészta dagasztási idejének 70%-46%-ával csökkent. A dagasztással szembeni ellenállás és a tészta stabilitás értékei az alkalmazott redukálószer mennyiségétől függően csökkentek, átlagosan 621-519 VU illetve 24-4 sec között változtak. A tésztaellágyulás értéke a redukálószerrel kezelt tésztaéknál növekedett. A fehérjék részleges redukciójához a vizsgált koncentrációk közül a 2 mg/ml DTT oldatot találtuk optimálisnak. A magasabb koncentrációban alkalmazott redukálószer a polimer teljes megbontását eredményezheti, megszüntetve ezzel a reológiai tulajdonságok szempontjából esetleg fontos másodlagos kölcsönhatásokat, amelyek a re-oxidáció alkalmával nem vagy csak részlegesen alakulnának vissza. A 20 mg/ml felett alkalmazott redukálószer esetében nem tapasztaltunk szignifikáns változást a tészta funkcionális tulajdonságaiban.

A liszthez adagolt DTT oldat térfogatát úgy határoztuk meg, hogy 450 µl és az 1 ml 2 mg/ml oldatot kevertünk ahhoz a vízmennyiséghez, mely a dagasztással szembeni ellenállás maximális értékének az eléréséhez szükséges. Amikor 1ml 2 mg/ml koncentrációjú DTT-t alkalmaztunk a polimert fehérjék redukciójára szignifikáns változást figyeltünk meg a dagasztási paraméterekben



11. ábra. A különböző reakcióidők összefüggései a dagasztási idővel és az oxidáció idejének összefüggése a dagasztási idővel

A reakcióhoz szükséges idő optimalizálásához a tészta 2, 4 és 6 percig pihentettük.

A dagasztási idő 2 perces reakció idő után is mintegy 38%-kal csökkent, de a hosszabb reakció idő 45%-os csökkenést is eredményezett a dagasztási idő értékében. A 4 és a 6 perc redukció utáni az egyes paraméterek nem mutattak szignifikáns változást a reológiai paraméterekben. Ebből arra következtettünk, hogy a 4 perc reakcióidő elegendő a fehérjék diszulfidkötéseinek részleges megbontásához. A fehérjék redukciója után a diszulfidkötések újbóli kialakításához szükséges paramétereket határoztuk meg úgy, hogy a kezelt (redukált, majd re-oxidált) tészta dagasztási paraméterei minél jobban megközelítse a kezeletlen minta értékeit. Az oxidálószer mennyiségét 2.5 mg/ml, illetve 5 mg/ml koncentrációjú kálium-jodát oldatok hozzáadásával állapítottuk meg. A KIO₃ hatására az előzetesen redukált rizstészta erősödött, a PR és DDT értéke nőtt. Az 5mg/ml KIO₃ hatására a tészta dagasztási paraméterei (DDT, PR) közelebb álltak a kontroll tésztaéhoz (9. ábra). Az oxidáció hatására a tészta dagasztási görbéje arányaiban megegyezett a kezeletlen tészta görbéjével. Az oxidálószer optimális térfogatát 250 µl-ben állapítottuk meg. Az oxidáció hatását a tészta dagasztási paramétereire három időintervallumban tanulmányoztuk. A kétféle koncentrációjú oxidálószer és a három oxidáció idejének hatását a tészta dagasztási idejére a 11. ábra mutatja be.

Az oxidáció idejének megállapításához különböző ideig pihentettük a tésztákat. A 2 és 4 perces oxidációs idő után bekövetkezett változások nem érték el a kontroll tészta dagasztási paramétereinek értékét. Az 5 mg/ml KIO₃ hatására a dagasztási idő 2 és 4 perces oxidáció után is a kezeletlen tészta DDT értékének csak 88% illetve 93%-a. A tésztafehérjék redukált diszulfidhídjainak 6 percig tartó oxidációja után a dagasztással szembeni ellenállás és a dagasztási idő értéke közel azonos volt a kontroll tésztaéval. Ezért a fehérjék diszulfidkötéseinek újbóli kialakításához a 6 perces oxidációs időt alkalmaztuk.

A rizstészta fehérjeire optimalizált redukciós/oxidációs folyamat paramétereit összefoglalóan A 6. táblázat tartalmazza.

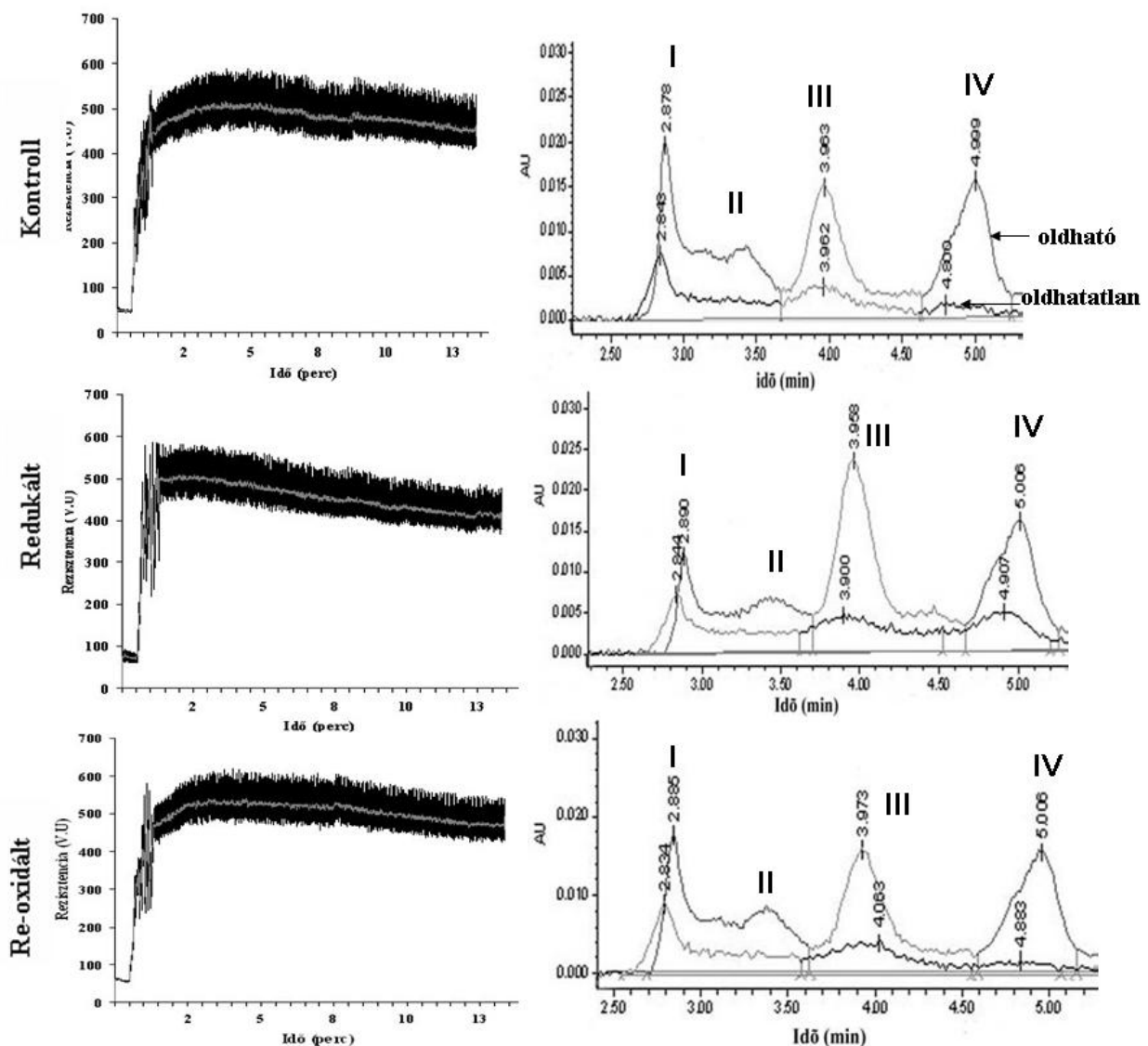
6. táblázat. Redukció és oxidáció folyamatának paraméterei a rizslisztre

KEVERÉS-1	45 sec
REDUKÁLÓSZER MENNYISÉGE	2 mg/ml DT
REDUKCIÓ IDE	4 perc
KEVERÉS-2	30 sec
OXIDÁLÓSZER MENNYISÉGE	5 mg/ml KIO ₃
OXIDÁCIÓ IDEJE	6 perc

A redukció/oxidáció hatása a rizs tartalékfehérjék összetételére

A fehérjék redukciója és oxidációja hatására megváltozott tartalékfehérje összetételt SE-HPLC-vel vizsgáltuk. A kezelés után a dagasztási görbén, illetve a fehérje extraktumok kromatogramján bekövetkezett változásokat a 12. ábra szemlélteti.

Az ábrán látható, hogy a dagasztási paraméterek értékei és a dagasztási görbe jellege szignifikánsan változik a redukció hatására, amely az oxidációt követően az eredeti formájára visszahozható. A dagasztási görbékkel párhuzamosan az oldható és oldhatatlan extraktumok fehérjefrakcióinak mennyiségi arányai is számottevően változnak.



12. ábra. A redukció és oxidáció hatása dagasztási tulajdonságokra és fehérje összetételre. (A) mikro z-arm mixer, (B) SE-HPLC profilja

A redukálószer az oldható fehérjék extraktumában megnövelte a glutelin monomerek (frakció III) mennyiségét, míg a glutelin trimerek és dimerek mennyisége csökkent. A csökkenés

5,5%-a volt a redukálatlan tésztának. A glutelin monomerek mennyiségének növekedése 54,7% volt. Emellett 3,3% növekedést tapasztaltunk az egyéb monomereket tartalmazó frakcióban. Az oldhatatlan extraktum fehérjéinek mennyisége hasonlóan változott. A polimer glutelinek mennyisége 35,1 %-kal csökkent. Az albumin/globulin/prolamin fehérjék frakciója megduplázódott, 149,9 %-kal több fehérjét tartalmazott, mint a kontrol tészta.

A tartalékfehérjék össz mennyisége a redukció következtében a glutelin trimer/dimer formában 87,2%-ra csökkent, a monomer glutelinek mennyisége 39%-kal, az albumin/globulinok/prolamin fehérjéké 22,6% -kal nőtt. Az oxidáció az oldható és oldhatatlan fehérje extraktumokban is növelte a glutelin trimer/dimer mennyiséget, ami csaknem megközelítette a kontrollnak megfelelő 100%-ot. A monomer glutelinek és az egyéb monomer fehérjék is nagyobb arányban voltak jelen. Az összfehérje mennyisége a frakciókban 89,4% és 99,4% között változott, ami megközelítette az eredeti kezeletlen tészta fehérje összetételét.

Az UPP% értéke a redukció hatására az eredeti 23,64%-ról 17,3% csökkent, majd az oxidációval 28,79%-ra nőtt. A kiindulási értéknél nagyobb UPP% feltehetően túloxidálásnak az eredménye.

A redukálószernek, mint a DTT vagy a 2-ME hatására a fehérjék közötti inter- vagy intramolekuláris diszulfidkötések felszakadnak, a fehérjék alegységeikre esnek szét. Ezáltal a fehérjék átlagos molekulatömege is csökken. A rizs polimer glutelin fehérjéinek redukciója után az alegységek a monomer glutelinek frakciójában halmozódik fel (Frakció III). Az egyéb monomer fehérjék frakciójában megnövekedett fehérjemennyiség oka lehet, hogy az eredetileg dimer formában lévő glutelinek, vagy a polimerizációra képes globulinok illetve a prolaminok alegységeire esnek szét. A fehérjék oxidációja során a fehérjék cisztein molekulái között visszarendeződnek a diszulfidkötések. Az újból megjelenő inter- és intramolekuláris diszulfidkötések megnövelik a polimer fehérjék mennyiségét. Ezek a fehérjék a glutelin trimer illetve dimer formákat tartalmazó frakcióiban halmozódtak fel. Az oxidáció után létrejött fehérje-összetétel eloszlás megközelítőleg azonos volt a kontroll tésztaéval.

A rizslisztre kidolgozott módszerünk hatása mind a tészta dagasztási paraméterei, mind a fehérje-összetétel eloszlásra megegyezik az irodalomban a búza fehérjékre kidolgozott módszer eredményeivel. A redukció csökkentette a polimer fehérjék mennyiségét, az UPP% értéket, ami a tészta erősség csökkenéséhez vezetett. A részlegesen redukált tészta oxidációja indukálta a fehérjék polimerizációját, növelve ezzel az UPP% értékét és a tészta erősségét. Ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy polimer és a monomer glutelinek aránya a rizsliszt esetében is befolyásolja a dagasztási tulajdonságokat.

3. év

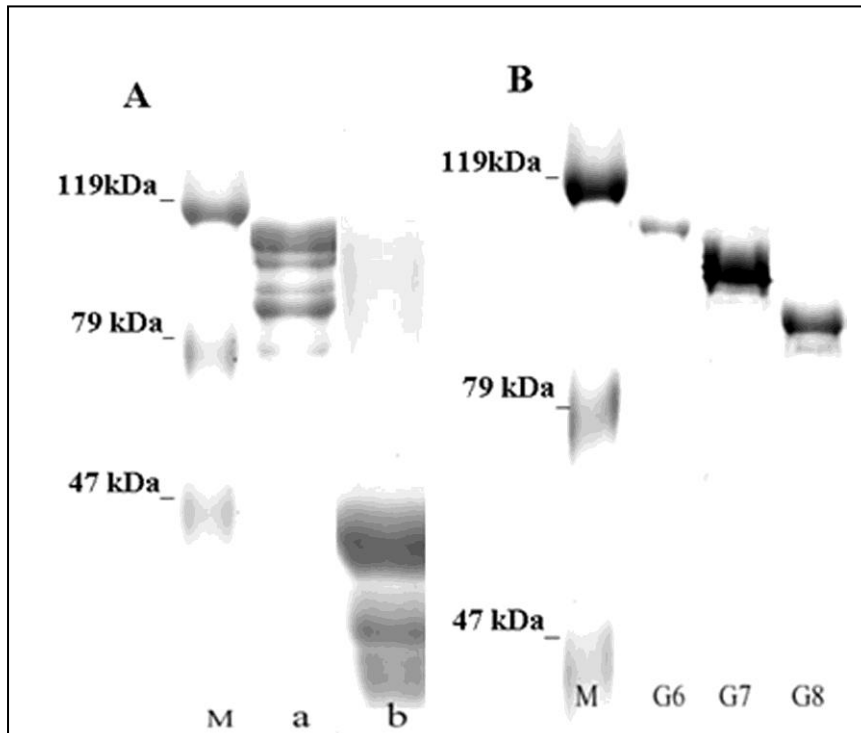
Addíció és inkorporáció

A rizstészta kidolgozott re-oxidációs technika segítségével a búza glutenin alegységfehérjéknek a rizstészta reológiai tulajdonságaira gyakorolt hatásának vizsgálatára addíciós és inkorporációs kísérleteket végeztünk. Ezekhez a kísérletekhez a búza tartalékfehérjéket jó minőségű, illetve nemesített búzalisztekből izoláltuk. A HMW és LMW gazdag frakciókat a martonvásári Mv Suba fajtából nyertük ki. Az egyéni HMW glutenin alegységek hatásának a vizsgálatára, nemesített, csak egy adott típusú HMW glutenin alegységet termelő búzafajtából izoláltunk fehérjéket. Ezek a fajták a Galahad -6, Galahad-7 és Galahad-8 nevet viselik. Az egyes fajták a búza B koromszóma hosszú karján kódolt Bx6 és 7, illetve a rövid karon kódolt By8 HMW glutenin alegységeket expresszálják.

A Mv Suba a jelenlegi magyar búza szortiment egyik kiemelkedő javító minőségű búzafajtája, amely nagy fehérjetartalommal és kimagasló fehérjeminőséggel rendelkezik. Az OMMI adatai alapján a fehérjetartalma 15,6%, sütőipari minőségi faktora A1. Kiváló a sikerterülete, a sikerindexe és az esésszáma. Alveográfus W-értéke alapján a „kiváló” csoportba sorolható (350 -400×10⁻⁴ J).

A kísérletek során felhasznált búza HMW és LMW glutenin alegységeket 3 gramm Mv Suba lisztből, illetve az egyéni HMW és LMW alegységeket 3-3 g Galahad6, Galahad7 és Galahad8 lisztből kiindulva állítottuk elő. Első lépésben 50 (v/v)%- n- propanollal 30 percig 3x ismételve rázattuk. Az extraktumot 15 percig 2500g-n centrifugáltuk. A keletkezett csapadékot 50 (v/v)% n-propanol és 1% DTT oldatban oldottuk, majd 30 percig 60°C-on inkubáltuk. Az inkubálás után az oldatot 30 percig centrifugáltuk (10000g). A kapott felülúszó alkoholtartalmát n-propanollal 60%-ra állítottuk, majd 1% DTT jelenlétében 1 órán keresztül 4°C-on tartottuk. Ezután az oldatot ismét centrifugáltuk (30 perc, 10000g). Az így kapott csapadék tartalmazta az Mv Suba búzaliszt HMW alegységeit, illetve a Galahad fajták egyéni HMW alegységét. A centrifugálás után kapott felülúszó alkoholtartalmát n-propanollal 85%-ra állítottuk be, majd 1 órán keresztül 4°C-on tartottuk. Ezután a fent leírtaknak megfelelően jártunk el. A centrifugálás után kapott csapadék tartalmazta a búzalisztek LMW glutenin alegységben gazdag fehérjefrakcióját. Az izolált HMW fehérjefrakciót 2x 500 µl 60 (v/v)% n-propanollal, míg az LMW fehérjefrakciót 2x500 µl 85 (v/v)% propanollal mostuk. Mindkét fehérjefrakciót a további kísérletekhez fagyaszttva szárítottuk. Az izolált frakciók fehérjetartalmát Duma módszerrel, összetételét SDS gélelektroforézissel ellenőriztük.

Az izolált HMW és LMW alegységeket az 13. ábra mutatja.



13. ábra. Izolált fehérjefrakciók elektroforetikus képe.

A tartalékfehérje alegységek addíciója a tésztafehérjék polimer szerkezetének megbontása nélkül történt, míg a búzafehérjék inkorporációja során a tészta fehérjemátrixának megbontása után építettük be az alegységeket a polimer láncba. Az addíciós és inkorporációs kísérletek során kapott étékekre varianciaanalízist végeztünk.

HMW és LMW glutenin frakciók addíciója

Az addíció során a rizs alapliszthez a HMW és LMW glutenin fehérjefrakciókat a fehérjetartalomnak 5, 10 és 20%-ában kevertük. Az alapliszt fehérjetartalma 7 % volt, ezért a lisztbe 14, 28 és 56 mg HMW és LMW glutenin alegységfehérje frakciókat homogenizáltunk. A tészta dagasztását redukáló- és oxidálószer helyett desztillált vízzel végeztük. A fehérjefrakciók addíciója után a tészták dagasztási paramétereit 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat. A rizstészta dagasztási paraméteri a fehérjefrakciók addíciója után.

Sample	VU _{max}		DDT [sec]		BD [VU]		ST [sec]	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Control	585	15.15	240	11.54	95	7.35	102	6.41
HMW-5%	594	18.21	225	21.36	109	6.57	82	5.28
HMW-10%	561	11.46	205	14.78	119	5.95	70	4.72
HMW-20%	575	13.45	174	20.87	144	4.96	59	8.48
LMW-5%	606	18.74	230	17.21	106	9.42	81	10.21
LMW-10%	582	17.87	212	13.25	112	8.24	73	9.12
LMW-20%	536	22.43	185	12.41	135	7.32	63	10.02

HMW-5%-HMW-20%: alapliszthez 5% -20% mennyiségben adagolt HMW-GS-t tartalmazó rizstészta; LMW-5%-LMW-20%: alapliszthez adagolt 5%-20% mennyiségben LMW-GS fehérjét tartalmazó rizstészta.

A búza fehérjealegységek addíciója szignifikáns változást eredményezett a tészta dagasztási paramétereiben. A 5% HMW glutenin alegység adagolása 10%-kal csökkentette a dagasztási időt, míg a maximális mennyiségben adagolt HMW-GS (20%) hatására mintegy 20%-os csökkenést tapasztaltunk. Az LMW glutenin alegységeknek az alapliszthez történő hozzáadása után a HMW glutenin alegységnek megfelelő változást tapasztaltunk a dagasztási időben. A legnagyobb mértékű változás a DDT esetében, mindegy 48%-os csökkenés a 20%-ban adagol LMW glutenin alegységek hatására következett be.

A tészták dagasztással szembeni ellenállás értéke is változott. A kontroll tészta PR értékéhez viszonyítva a glutenin alegységek addíciója csökkentette a tészták maximális konzisztencia értékét. Emellett az adagolt tartalékfehérjék akár 40%-kal is csökkentették a tészta stabilitását. A tészta ellágyulás értéke a fehérjék hatására növekedett a kontroll tésztához képest. A rizstészták dagasztási görbéje a fehérjefrakciók addícióját követően gyorsabban kialakuló, kisebb stabilitású, gyenge tésztát mutatott.

A dagasztási idő, a stabilitás valamint a dagasztási ellenállás csökkenése, az ellágyulás növekedése a fehérjealegységek adagolása következtében megváltozott polimer/monomer aránynak a következménye.

A kísérletek eredményei azt mutatják, hogy már 5% HMW glutenin alegység hozzáadása az alapliszthez elegendő volt a rizsliszt dagasztási tulajdonságainak szignifikáns változásához. A paraméterekben bekövetkezett változás arányos az adagolt fehérjefrakció mennyiségével. A búzára végzett kísérletekből ismert, hogy az azonos mennyiségű HMW és LMW glutenin alegységek addíciójának hatása azonos, de különböző mértékű változást eredményez a tészta dagasztási paramétereinek értékében. Az LMW-GS fehérjék hatása nagyobb, mint a HMW-GS fehérjéké.

Inkorporáció

A HMW és LMW glutenin alegység fehérjefrakciók hatását a rizstészta funkcionális tulajdonságaira inkorporáció segítségével, a fehérjéket a rizstészta polimer mátrixába építve is megvizsgáltuk. A mérést megelőzően a fehérjetartalomnak 5-10 és 20%-ában a fehérje alegységeket a liszttel homogenizáltuk. A rizsfehérjékre kidolgozott módszerrel redukáltuk a liszt és a hozzákevert búzafehérje alegységeket, majd a diszulfidhidak összekötésével beépítettük őket a rizsfehérje polimer szerkezetébe. Az inkorporáció változást eredményezett tészták dagasztási paramétereiben és a görbék jellegében is. Az inkorporációs kísérletek során az Mv Suba lisztből izolált HMW és LMW glutenin alegységek mellett a nemesített Galahad fajták egy-egy HMW glutenin alegységfehérjét tartalmazó frakciókat is felhasználtuk. A Galahad -6 a búza B koromoszóma hosszú karján kódolt 6-os alegységet (Bx6) expresszálja, a Galahad-7 ugyanezen a karon kódolt 7-es alegységet (Bx7), míg a Galahad-8 a B koromoszóma rövid karján kódolt 8-as alegységet (By8) termeli.

Az inkorporáció után vizsgált dagasztási paraméterek értékeit a 8. táblázat tartalmazza.

8. táblázat. Rizstészta dagasztási paraméterei glutenin alegységek inkorporációja után

Sample	VUmax		DDT [sec]		BD [VU]		ST [sec]	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Control	585	15.15	240	11.54	95	6.25	96	5.21
HMW-5%	546	20.21	262	21.36	78	5.54	109	4.21
HMW-10%	583	12.58	274	14.78	70	4.98	117	3.54
HMW-20%	596	11.12	326	20.87	49	5.69	152	6.78
LMW-5%	555	19.84	249	17.21	62	8.12	99	7.21
LMW-10%	564	16.27	260	13.25	60	3.24	109	7.89
LMW-20%	567	21.43	291	12.41	55	4.32	146	11.02
G6-5%	537	12.54	250	10.22	86	5.21	101	3.56
G6-10%	572	18.78	262	12.17	75	2.31	112	4.51
G7-5%	469	14.35	256	11.45	87	4.56	107	6.87
G7-10%	469	11.23	286	10.34	72	5.12	125	4.52
G8-5%	472	10.12	268	18.64	68	5.64	110	3.98
G8-10%	521	15.28	301	17.63	57	3.25	136	7.41

HMW-5%-HMW-20%: alapliszthez 5% -20% mennyiségben beépített HMW-GS-t tartalmazó rizstészta; LMW-5%-LMW-20%: alapliszthez inkorporált 5%-20 LMWGS fehérjét tartalmazó rizstészta; G6-5%-10%: alapliszthez 5-10%-ban inkorporált HMW Bx6 alegységet, G7-5-10%: 5-10%-ban inkorporált HMW Bx7alegység, G8-5%: 5%-ban inkorporált HMW Bx8 alegységet tartalmazó rizstészta.

A beépített fehérjealegységek mennyisége ellentétes hatással volt a mért dagasztási paraméterekre, mint az addíció esetében. A dagasztási idő átlagértéke a beépített HMW-GS frakciók hatására növekedett. A legnagyobb értékű változást, a kontrollhoz viszonyított 41%-

os növekedést a 20%-ban beépített HMW fehérje frakció esetén tapasztaltunk. Az LMW glutenin alegységek beépítése szintén szignifikáns növekedést okozott a dagasztási idő értékében. A nemesített Galahad-7 fajtából származó HMW Bx7-es alegységfehérje 5%-ban történő beépítésével 8,5%-kal volt magasabb a dagasztási idő. A Bx6 illetve By8 HMW alegységek beépítése a polimer mátrixba szintén megváltoztatta a dagasztási időt. 28 mg HMW By8 alegységfehérje 15%-os növekedést eredményezett a DDT értékében.

A dagasztás utáni tészta stabilitás növekedése az inkorporált fehérjefrakciók következtében 10% és 56% között volt. A HMW glutenin alegységek beépítésével létrejött tészta nagyobb stabilitási értékkel rendelkezett, mint az LMW-GS-t tartalmazó tészta. A tészta BD értékei az inkorporáció után csökkentek, 125 és 67 VU*sec között változott annak függvényében, hogy milyen glutenin alegységfehérjét építettünk be. Az eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a búzafehérje frakciók inkorporációja mennyiségétől és minőségétől függetlenül erősebb tészta eredményezett. A dagasztási paraméterekben bekövetkezett változás értéke viszont függött a fehérje frakció allél-összetételétől.

A HMW és LMW glutenin alegységek inkorporációja következtében létrejött változások polimer/monomer arány eltolódásnak a következménye. A HMW és LMW glutenin alegységek a tészta polimer szerkezetébe való beépülése növeli az átlagos molekulatömeget. A búza kísérletekből ismert, hogy a polipeptidek mérete egy fontos paraméter az inkorporáció során. Minél hosszabb a beépített glutenin alegység, annál hosszabb a tészta dagasztási ideje. A rizslisztekre végzett dagasztási kísérletekben bizonyítottuk az UPP% és az DDT közötti erős korrelációt. A búza alegységfehérjék inkorporációjának hatására a megnövekedett UPP% hosszabb dagasztási időt eredményezett.

A statisztikai számítások alapján szignifikáns különbséget találtunk dagasztási paraméterek és az UPP% értékei között, amiből arra következtettünk, hogy a beépített búzafehérje szignifikáns hatással van a rizstészta funkcionális paramétereire.

In vitro fehérjemódosítások hatásának komplex értékelése

A búza glutenin alegységek addíciós és inkorporációs kísérletei után a rizstészta molekulatömeg eloszlását SE-HPLC-vel vizsgáltuk. Az összterület és az UPP% értékét a 9. táblázat tartalmazza.

9. táblázat. Fehérje-összetétel a tartalékfehérjék addíciója és inkorporációja után

Minta	UPP%	Minta	UPP%
Addition		Incorporation	
Control	100	Control	100
HMW-5%	97	HMW-5%	104
HMW-10%	88	HMW-10%	116
HMW-20%	91	HMW-20%	141
LMW-5%	97	LMW-5%	123
LMW-10%	96	LMW-10%	152
LMW-20%	94	LMW-20%	159
G6-5%	97	G6-5%	110
G6-10%	98	G6-10%	126
G7-5%	95	G7-5%	112
G7-10%	98	G7-10%	130
G8-5%	89	G8-5%	114
G8-10%	99	G8-10%	135
L.S.D.	2.00		3.57

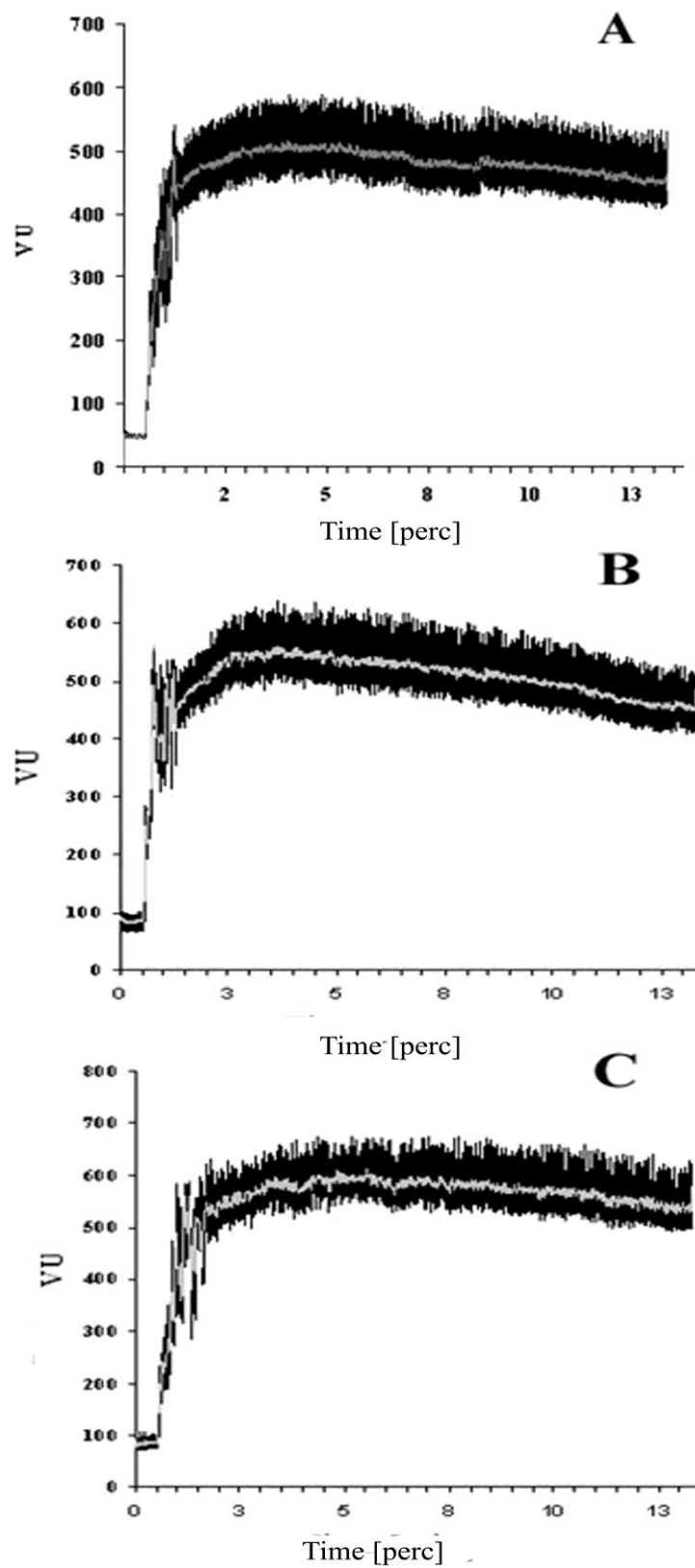
Control: alapliszt. **HMW-5, 10, 20%:** alaplisztbe 5%-20%-ban beépített illetve adagolt HMW-GS, LMW-GS, HMW Bx6, Bx7 and By8 fehérje alegységeket tartalmazó tészták.

A tartalékfehérjék addíciója, illetve beépítése megváltoztatta a rizstészta UPP% értékét, ami azt mutatja, hogy az oldhatatlan polimer fehérjék mennyisége is megváltozott. Az addíció után az UPP% értéke nem mutatott szignifikáns változást az alaptésztaéhoz képest. Értéke 21,48% és 23,69% között változott. A glutenin alegységek beépítése pozitívan befolyásolta a tészták UPP% értékét. Az 5% LMW-GS inkorporációja 7,8%-kal, míg az 5% HMW-GS beépítése 27%-kal növelte az UPP%-ot. A legnagyobb változást a mintegy 56 mg HMW glutenin alegység beépítése eredményezte, ahol 68,7%-os volt az oldhatatlan polimer fehérje mennyiségének növekedése. Az egyéni HMW glutenin alegységek az alapliszthez viszonyítva szintén szignifikáns eltérést mutattak az UPP% értékében.

A búzátészta elvégzett kísérletekben az UPP% az inkorporáció során a hozzáadott mennyiség függvényében nőtt, mind a HMW, mind az LMW glutenin alegységek esetében. A rizstészta esetében UPP% érték növekedése azonos mennyiségű HMW-GS fehérjének a polimer hálózatba építése után nagyobb volt, mint az LMW-GS esetében. Az addíció folyamatában a fehérjealegységek nem épülnek be a polimer láncba, így nem növelik az oldhatatlan polimer fehérjék mennyiségét sem. Az inkorporáció során a diszulfidkötések megbontása, majd újraoxidálása lehetővé teszi az alegységek beépítését növelve ezzel a

polimerláncok hosszát. Az SE-HPLC eredmények értékelése során a következő megfigyeléseket tettük. Mind az HMW, mind az LMW glutenin alegységek, amíg nem oxidáljuk őket, vagy valamilyen okból kifolyóan nem oxidálódnak, az 'oldhatatlan' monomer fehérjék frakciójában (IV. frakció) halmozódnak fel. Az oxidációt követően a búza tartalékfehérjék az 'oldhatatlan' glutelin trimert tartalmazó frakcióban (I. frakció) jelentek meg. Emellett az oxidáció esetén mind az 'oldható' mind az 'oldhatatlan' glutelin dimerek mennyisége (II. frakció) kismértékben csökken. Ennek oka, hogy az eredetileg monomer α és β glutenin alegységek (III. frakció) egy jelentős része is oxidálódik. Ebből arra következtettünk, hogy a rizslisztbe történő inkorporáció során nemcsak a búzafehérjéket építjük be a polimer szerkezetbe, hanem a rizs eredeti fehérjeit is.

A rizsliszt fehérje-összetételének *in vitro* megváltoztatása során megfigyelt eredményekből arra következtethetünk, hogy az összetétel megfelelő módosítása hatással van a rizstészta dagasztási paramétereire. A fehérje-összetétel megváltoztatásának egyik módja a fehérjék polimer/monomer arányának módosítása a fehérjék adagolásával a polimer megbontása nélkül, illetve a rizsfehérje polimer mátrixba történő beépítésével. Az addíció és inkorporáció ellentétes hatását a rizstészta dagasztási paramétereire a 14. ábra mutatja be, ahol 20% HMW-GS-t adagoltunk, illetve inkorporáltunk az alaplisztbe.



14. ábra. Az lapliszthez 20%-ban adagolt és beépített HMW-GS hatásának összehasonlítása a rizstészta dagasztási görbéin. A: kontrol, B: adagolt, C: inkorporált tészta.

Ha a fehérjeadagolással a polimer/monomer arányt a monomerek mennyiségének növelésével változtatjuk (addíció), akkor a tézta viszkozitása csökken, míg a polimer arány növelésével (inkorporáció) a tézta erősödik. Ehhez legalább 5%-ban növelni kell a polimerek mennyiségét, amit vagy plusz polimer molekulák jelenlétével, vagy polimerizációra képes monomerjellelű rizsfehérjék polimerizálásával biztosíthatunk. A búzafehérjék rizsfehérje polimerbe építése komolyabb biotechnológiai feladatot igényel, aminek egyik lehetősége a búzafehérjék génjeinek *in vivo* transzformációja.

Transzformálás

Négy, bizonyítottan transzgenikus rizs elvetett magjaiból növényt neveltünk. A transzgén öröklődésének vizsgálata során az első generációs növények leveleiből PCR segítségével kimutattuk mind a rezisztencia markergént, mind a transzgént. Megvizsgáltuk, hogy a következő generációban milyen arányban szegregálódik a transzgén illetve a szelekciós markergén. A PCR vizsgálat eredményeit a 10. táblázat tartalmazza.

10. táblázat. T1 generációs növények PCR analízise

NÖVENYI MINTA JELE	PRIMEREK			NÖVENYI MINTA JELE	PRIMEREK		
	RP6F-R	PRIM51-52	HTPF-R		RP6F-R	PRIM51-52	HTPF-R
T1/19-1	+	+	+	T1-23/6	+	+	+
T1/19-2	+	+	+	T1-26/1	+	+	+
T1/19-3	+	+	+	T1-26/2	+	+	+
T1/20	+	+	-	T1-26/3	+	+	+
T1-21/1	+	+	+	T1-26/4	+	+	+
T1-21/2	+	+	+	T1-26/5	+	+	+
T1-23/1	+	+	+	T1-26/6	+	-	+
T1-23/2	+	+	+	T1-26/7	+	+	-
T1-23/3	+	+	-	T1-26/8	+	+	-
T1-23/4	+	+	+	T1-26/9	+	+	+
T1-23/5	+	+	+	T1-26/10	+	+	+

Rp6-F-R primerek a prolamin 6 génre, prim51-51 a GluD1-d1 gén, a HtpF-R primerek a *htp* génre specifikusak. Piros: *htp* negatív; zöld: *Glu1D-1d* negatív növények

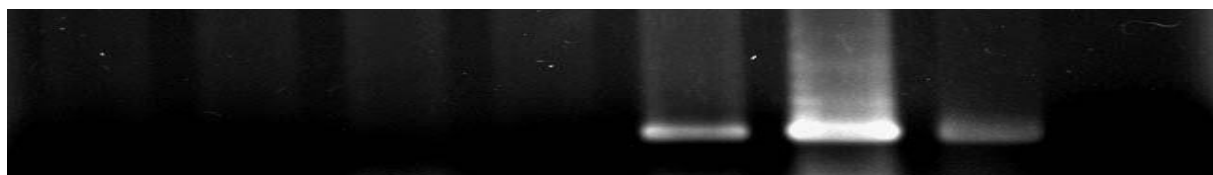
A PCR reakció eredményei alapján a *htp* gén az utódnemzedékekben 5:1, a *Glu1D-1d* gén 11:1 arányban öröklődtek.

A szegregációs vizsgálatok után a transzkripció szintjét vizsgáltuk a transzgenikus növényeinkben. A rizs magban expresszálandó mRNS RT-PCR reakciót végeztünk. A rizs endospermiumából teljes RNS-t izoláltunk, majd az RNS molekulákat az izolálás során fellépő DNS szennyeződések lebontására DNaseI enzimmel kezeltük. A reakció elegyet (50 µg RNS-hez, 1 µl 10xDNase puffer, 1 µl RNase inhibitor, 1 egység/µl enzim), 37 °C-on 30

percig inkubáltuk, majd az RNS molekulákat az oldatból 3M nátrium acetát hozzáadása után fenol:kloroform:izo-amilalkohol (25:24:1) elegyben visszanyertük. Az RNS molekulákat az oldatból i-propanollal 30 percig -20°C-on tárolva kicsaptuk, majd centrifugáltuk (30 min, 4 °C, 12 000 g). A csapadékot RNase mentes vízben oldottuk. Az 1-2 µg DNase-zal kezelt RNS molekulából cDNA syntesis kit (Fermentas) segítségével cDNS-t szintetizáltunk. Első lépésben a RNS molekulákat 10 percig 65°C-on denaturáltuk, majd a reakcióelegyet (RNase inhibitor, RT puffer, dNTP, DTT, AmV RT enzim) 42°C-on 1 óráig inkubáltuk. Az enzim működését 5 perces forralással inaktívtuk. Az így kapott cDNS molekulával a transzgénre specifikus primerekkel PCR reakciót végeztünk. A reakció termékeket agaróz gélen analizáltuk.

A transzgénikus rizs növények közül két vonalat vizsgáltunk az RT-PCR-rel (15. ábra).

15. ábra. RT-PCR a transzgénikus rizs növényekre



1: mRNS endospermium #21, 2: mRNS endospermium #26, 3: levél cDNS, 4: gyökér sDNS, 5: cDNS endospermium #21, 6: cDNS endospermium #26. 7: pozitív kontrol, 8: cDNS negatív kontrol.

A levél és gyökér RNS mintáiról nem képződött a várt fragment. A #21 és #26-os transzgénikus vonalak endospermium RNS-ről képződött a 450 bp hosszú fragment. A vizsgált két minta közül, azonos mennyiségű cDNS esetében a #26-os vonal 500 bp nagyságú fragmentje erősebb intenzitású volt, ami feltételezhetően az mRNS expresszió magasabb szintjét jelenti az endospermiumban. A RT-PCR reakció bizonyította a transzkripciót a Glu-1D-1d génről, illetve a HMW-Dx5 glutenin alegység fehérje endospermium specifikusságát.

A legtöbb magot produkáló három transzgénikus vonalat felszaporítottuk, majd a magjából fehérjét nyertünk ki SDS módszerrel, redukálószerrel nem tartalmazó SDS tartalmú pufferrel. A kapott fehérjét nem redukáló és redukáló SDS akrilamid gélen elválasztottuk és Western blot módszerrel kimutattuk a transzgénről termelődött búza HMW glutenin tartalékfehérjét. Az „idegen” fehérje mérete a rizsben megfelelt a búzából azonos módszerrel kinyert, akrilamid gélen elválasztott fehérje méretének. Így egyértelműen bizonyítottunk vettük, hogy

transzgenikus rizsünkbe a transzgen stabilan beépült, expresszáldott és stabilan öröklődik. A transzgenikus magok felét a megfelelő mennyiségű minta felszaporításához újból elvetettük.

Az mRNA expresszió után a translációt vizsgáltuk a transzgenikus rizsvonalak endospermiumában. Ehhez a magok endospermiumából fehérjét nyertünk ki.

A fehérjéket a rizs endospermiumából a következő módon izoláltuk: A regenerált rizsnövények magjait, a mag embrió részét leválasztva, egy dörzsmozsárban porrá törtük. Az alkoholban oldható fehérjealegységek kinyerése során a mintákhoz 160 µl 55 (v/v)% i-propanolt, 1M Tris-HCL -t (pH 8,0) és 10mM DTT-t tartalmazó puffert adtunk, majd 30 percig 65 °C-os vízfürdőben inkubáltuk. Az inkubáció után minden mintához 160 µl puffert és 40 mM IAA-ot adtunk. A mintákat 20 percig ismét 65 °C-os vízfürdőben tartottuk, majd az oldatot centrifugáltuk (30 perc, 120000g). A felülúszóban lévő fehérjéket tiszta Eppendorf csőben jéghideg acetonnal 1:4 arányban kicsaptuk. Az oldatot -20 °C-on 15 percig inkubáltuk, majd 4 °C-on centrifugáltuk (10000g, 15 perc). A felülúszót elöntöttük, a csapadékot SDS minta pufferben oldottuk

A fehérjék kinyerése után a három független rizsvonal tartalékfehérjéit SDS-PAGE segítségével azonosítottuk. A kontrollként használt rizsfehérje extraktumhoz képest egy új fehérje sáv volt megfigyelhető az SDS-PAGE gélen bizonyítva, hogy a T0 növények magjukban egy extra fehérjét termelnek (16. ábra). A mintákban megjelenő fehérje elektroforetikus mobilitása lassabb, mint a HMW Dx5 alegységszámított molekula tömege, bár hasonló a kontrollként használt búza megfelelő endogén fehérje mobilitásával. Az irodalmi adatokból ismert, hogy a HMW glutenin alegység fehérjék pálcika alakjuk miatt szabálytalan mobilitással rendelkeznek az SDS-PAGE gélen.

16. ábra. Transzgenikus rizsek SDS-PAGE vizsgálata



1: búza kontrol, 2: rizs kontrol, 3: regenerált, nem transzgenikus rizs, 4: 4-6 transzgenikus vonalak: #26, #23, #21.

A transzgenikus növények közül a #21, #23 és #26-as vonalból izolált fehérjéket vizsgáltuk. Az endospermiumban expresszált fehérjék mennyiségét az SDS-PAGE gél denzitometriás mérésével becsültük meg. A denzitométeres mérés alapján a #21 rizs növények nagyon

alacsony szinten expresszálták az 1Dx5HMW-GS alegység fehérjét, mindösszesen az i-probanolban oldható teljes magfehérjék 0,75%-ában. A #23 és #26 vonalak ellenben magasabb expressziós szintet mutattak, számszerűen a teljes alkoholban oldható fehérjék 3,19 és 3.81%-ában.

Western blot analízis

A transzgenikus rizs növények HMW-Dx5 glutenin alegység fehérje expresszióját western blot analízissel is vizsgáltuk.

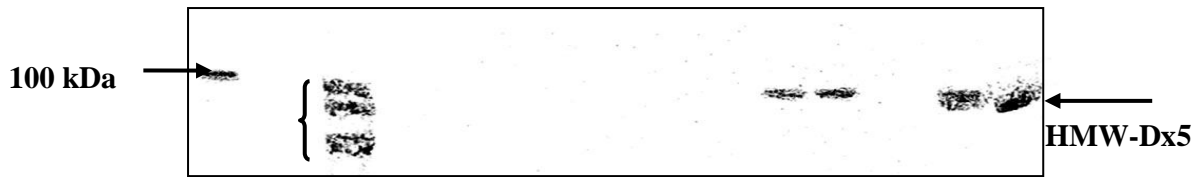
Első lépésben a transzgenikus növények endospermiumából kinyert fehérjéket SDS-PAGE – segítségével elválasztottuk, majd a fehérjéket egy nitrocellulóz (PVDF) membránra transzferáltuk. A szűrőpapírok között elhelyezett membránt és az akrilamid gélt tartalmazó „szendvicsben” a fehérjéket BioRAD Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell készülékben 130 mA állandó áramerősségen 15 percig „Towbeen” puffer segítségével transzferáltuk.

A fehérjéket a transzfer után egy éjszakán keresztül 10% zsírintes tejporthoz tartalmozó TBST oldatban blokkoltuk. Ezután a membránt 3x 15 percig TBST oldatban mostuk, majd az első, HMW fehérjékre specifikus antitestet 1:200 hígításban tartalmozó TBST oldatban 1 óráig keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután a membránt 3x 15 percig mostuk, majd TBST oldatban 1:7000 arányban hígított másodlagos (nyúl) antitesttel egy óráig kezeltük. Majd a membránt 3x mostuk, a transzferált antigén specifikus fehérjék megjelenítéséhez 10 ml TMN oldatban oldott 132 µl NBP és 100 µl BCPI szubsztráttal és enzimmel kezeltünk. A színesen megjelenő sávokat analizáltuk.

Az antigén-antitest reakció határára megjelent sávok a fehérje expressziót igazolták. A levélből, a gyökérből izolált fehérje minták nem léptek reakcióba a specifikus antitesttel.

A vizsgálat során búza endospermium fehérjéket használtunk pozitív, és nem transzformált rizsfehérjét negatív kontrollként. Ahogyan az előzetes denzitás mérés eredményeiből vártuk a különböző transzgenikus vonalak különbséget mutattak a membránon megjelenő sávok intenzitásában. Azonos koncentrációjú teljes fehérje esetében az expresszált HMW-Dx5 alegység fehérjének a #26-os transzgenikus rizs vonalakban nagyobb expressziós szintje volt.

17. ábra. Western blot analízis



1: molekulásúly standard (100 kDa), 2: búza endospermium, 3 negatív kontrol, 4: transzgénikus levél, 5: transzgénikus gyökér, 6-7: transzgénikus rizs; #21, 8-9: transzgénikus rizs; #26.

Az általunk sikeresen létrehozott transzgenikus rizs tehát megközelítően 3-4%-ban termeli a HMW Dx5 glutenin alegységfehérjét. Ahhoz, hogy az rizs endospermiumban expresszált fehérjének a rizstészta dagasztási paramétereire gyakorolt hatását megvizsgáljuk, egy erre alkalmas módszerre volt szükség. Az *in vitro* kísérletekből kiderült, hogy a mikro z-arm mixer rizslisztre történő alkalmazása lehetővé teszi a fehérje-összetétel módosítása után létrejövő változások követését. Így ez a módszer alkalmas lehet a transzgenikus rizslisztekben bekövetkező változások vizsgálatára is.

Mivel a búza tartalékfehérjéknek a rizsfehérje polimer mátrixba való *in vitro* beépítésére elvégzett kísérleteink szerint az egyéni HMW glutenin alegységfehérjék 5%-os inkorporációja már hatással van a rizstészta dagasztási paramétereire, ezért feltételezzük, hogy a módszerünk alkalmas a transzgenikus rizsben ilyen mennyiségben expresszált fehérjék hatásának a vizsgálatára is.

4. év

Az egyéni illetve összes HMW és LMW glutenin alegységeket tartalmazó búza fehérjefrakciók rizslisztbe elvégzett addíciója, illetve inkorporációja után megvizsgáltuk azt is, hogy a bakteriálisan expresszált fehérjék hogyan befolyásolják a rizstészta dagasztási, funkcionális paramétereit. Ehhez baktériumban termeltettünk különböző glutenin alanóg fehérjéket (korábbi saját munkáinkból származnak (a gliadin alapú ANG és ANG1N1C), illetve LMW (low molecular weight) glutenin alegységeket. A vizsgálni kívánt álló fehérjét kódoló expressziós vektort *E. Coli* kompetens sejtbe transzformáltuk elektroporációval. A transzformáció után a sejteket a megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB táptalajon szétkentük, majd egy éjszakán keresztül 37 °C-on tartottuk. A másnap reggelre kinőtt kolóniákat 5 ml antibiotikumot tartalmazó LB tápoldatba leoltattuk, majd 37 °C-on ráztattuk. 9-10 óra növesztés után, 500 ml LB oldatba oltottuk tovább és ráztattuk egy éjszakán keresztül. Ezt követte az indukció 10mM IPTG felhasználásával, majd a baktérium szuszpenziót 24 h keresztül 30°C-on ráztattuk. A baktérium szuszpenziót 10 percig 10000g-en centrifugáltuk, a felülúszót elöntöttük, a csapadékot a baktérium tömegtől függően (10 ml/g baktérium) 50%-os izo-propanolban 1% DDT jelenlétében re-szuszendáltuk, majd 1 órán keresztül ráztattuk. A rázatást követően az oldatot 30 percig maximális rpm-en centrifugáltuk. Ezt a lépést 3x ismételtük. A csapadékot 50%-os izo-propanolban ismét felszuszendáltuk, majd kétszeres mennyiségű 1M NaCl jelenlétében a fehérjéket lecsaptuk. Az oldatot 4°C-on, legalább 1 óráig tartottuk. Ezt egy centrifugálási lépés követet, a felülúszót izopropanollal 60% koncentrációjura egészítettük ki, majd ismét a hidegen tartottuk. Az oldatot 15 percig 10000g-én centrifugáltuk, a felülúszót az előbbieik szerint 70%-re egészítettük ki. Az így kapott fehérje szuszpenziót 10 mM-os Tris-HCL –lel szemben dializáltuk. A dialízis során a fehérjék kicsapódtak az oldatból. A centrifugálással összegyűjtött fehérjéket fagyasztva szárítottuk. Megmértük a fehérjetartalmát, majd fehérje extraktumokat a rizsliszt z-arm mixer kísérletekben használtuk fel.

Az előzetes kísérletekből kiderült, hogy a búzafehérjék hatása a rizsliszt dagasztási tulajdonságaira úgy figyelhető meg a legjobban, ha a fehérje alegységeket beépítjük, azaz inkorporáljuk a rizs polimer mátrixába.

A mérést megelőzően a fehérjetartalomnak 6 és 15%-ában a tisztított fehérje alegységeket a rizsliszttel homogenizáltuk. A rizsfehérjékre korábban kidolgozott módszerrel redukáltuk a liszt és a hozzákevert búzafehérje alegységeket, majd az oxidációs lépésben a diszulfidhidak összekötésével beépítettük őket a rizsfehérje polimer szerkezetébe. Az inkorporáció változást eredményezett tésták dagasztási paramétereiben és a görbék jellegében is. A baktériumban

expresszált fehérjék inkorporációjának hatását a dagasztási paraméterekre a 11. táblázat mutatja. A beépített CH1N fehérje olyan glutenin analóg fehérje, melynek N terminális végén egy extra cys (cisztein) molekula található.

11. táblázat. Baktériumban expresszált fehérjék inkorporációja

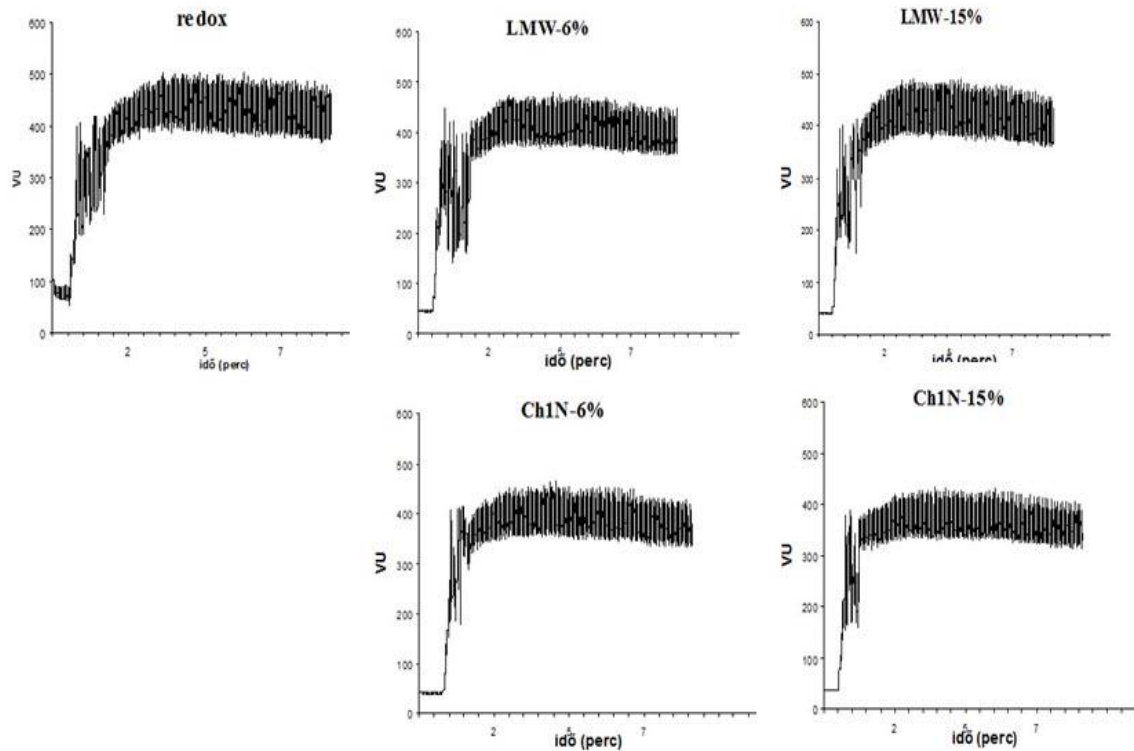
MINTA	PR	DDT	BD	ST
redox	444	4,14	97	0,85
redox	503	3,61	94	0,95
LMW-6%	478	4,77	122	1,12
LMW-6%	480	4,39	113	1,15
LMW-15%	491	5,52	126	1,24
LMW-15%	522	3,55	71	1,05
CH1N-6%	465	3,65	83	1,04
CH1N-6%	493	5,27	74	1,12
CH1N-15%	435	4,55	97	1,34
CH1N-15%	435	4,55	117	1,28

A táblázatból kiderül, hogy a rizstészta dagasztása során a tészta kialakulási idő mind az LMW mind a CH1N fehérje alegységek inkorporációja után növekedett. A re-oxidált tésztához képest a teljes fehérjetartalomnak a 6%-ában beépített LMW-GS fehérjék már 21%-ban megnövelték a DDT értékét. A 15%-os fehérje beépítés arányosan növelte a tészta kialakulásához szükséges időt a kontrolhoz (redukált tésztához) viszonyítva. A CH1N tisztított fehérjék esetében hasonló változást tapasztaltunk a DDT értékében. A két fehérje hatását összehasonlítva azt látjuk, hogy a bakteriálisan expresszált CH1N fehérjéknek erősebb hatása volt a rizstészta dagasztási paramétereire, mint az LMW glutenin alegységeknek. Az egyes fehérjefrakciók inkorporálása után a tészta stabilitása is megváltozott a re-oxidált kontrol tésztához viszonyítva. A legstabilabbnak a CH1N fehérjék 15%-os beépítése után találtuk a rizstésztát. A változás minden esetben szignifikáns volt.

A tisztított fehérjék beépítés után a rizstészták dagasztási görbéinek a jellege is megváltozott. Az inkorporáció után regisztrált z-arm mixerés görbék az 18. ábrán láthatók. A re-oxidált rizstésztához viszonyítva valamennyi esetben erősebb, stabilabb rizstésztát kaptunk.

Az LMW glutenin fehérjék szerkezetére jellemző, hogy egy viszonylag rövid ismétlődő szekvenciákat tartalmazó repetitív régió mellett rendelkezik egy sokkal hosszabb, sok ciszteint tartalmazó C-terminális régióval. A cisztein aminosavak nagy része (hét) ebben a szerkezeti egységben található, melyekből hat molekulán belüli diszulfid hidakat hoz létre, míg a hetedik intermolekuláris diszulfid híd képzésében vehet részt az N-terminális régióban található egyetlen ciszteinnel együtt, ahogyan azt korábbi kísérletek eredményeiből tudjuk. A "szabad" cisztein molekulák SH csoportjain keresztül a molekula képes részt venni az óriási méretű

polimer képzésében a HMW alegységekkel kombinálódva. Feltételezzük tehát, hogy az LMW glutenin alegységek beépültek a rizs polimer fehérjék szerkezetébe, növelve ezzel a polimer molekula méretét. Az LMW alegységek beépítése azonban kisebb hatással volt itt is a dagasztási paraméterekre, mint a glutenin analóg fehérjék inkorporációja (18-ábra).



18. ábra. Rizslisztbe inkorporált bakteriálisan expresszált és tisztított CH1N fehérje molekulák.

A bakteriálisan expresszált fehérjék inkorporációja mellett azt is megvizsgáltuk, hogy a különböző egyéni HMW illetve LMW glutenin alegységek kombinált beépítése a rizs polimer mátrixba milyen hatással van a rizs funkcionális tulajdonságaira, illetve a dagasztási paraméterekre.

Ezekhez a kísérletekhez a korábban is használt, a nemesített Galahad fajtából izolált HMW Bx6, Bx7 és By8-as alegységeket használtuk fel. A By8 alegységet a Bx6 és a Bx7 alegységekkel kombinálva építettük be a rizs polimer fehérjékbe. A By8 glutenin alegységet a teljes fehérjetartalomnak 5, illetve 10%-ában kevertük a dagasztás előtt a rizslisztbe, 5 illetve 10% Bx6 vagy Bx7 alegységfehérjével együtt. Így az együttesen 10 illetve 20%-ban adtuk búza tartalékfehérjét az alap rizslisztbe. Az inkorporáció hatását a rizstészta dagasztási paramétereire a 12. táblázat foglalja össze.

12. táblázat. Dagasztási paraméterek az egyéni HMW, illetve LMW alegység fehérjék kombinált beépítése után.

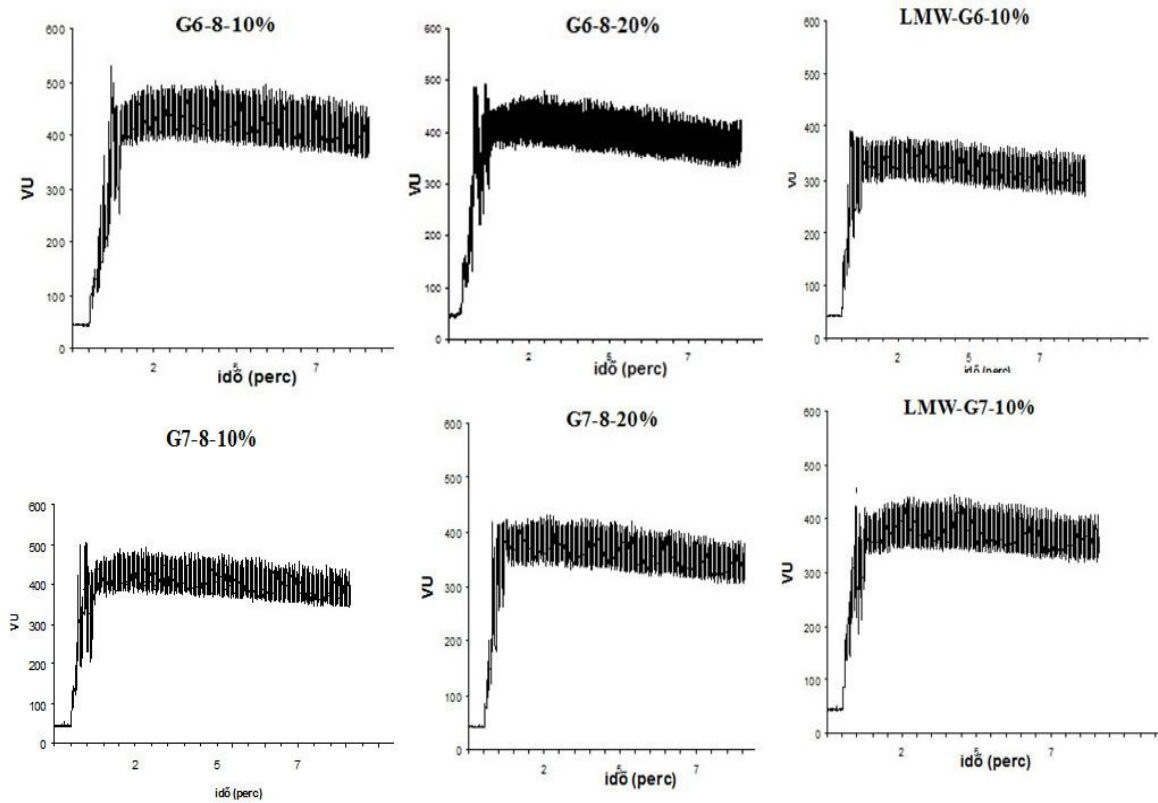
MINTA	PR	DDT	BD	ST
G6-8-10%	503	2,18	146	1,12
G6-8-10%	529	2,74	145	1,18
G6-8-20%	545	2,75	184	1,02
G6-8-20%	545	2,75	184	0,16
G7-8-10%	502	2,66	141	1,02
G7-8-10%	462	2,78	121	1,09
G7-8-20%	687	2,77	368	0,94
G7-8-20%	506	2,19	222	0,89
LMW-G6-10%	480	2,22	185	1,13
LMW-G6-10%	594	2,53	272	1,21
LMW-G7-10%	464	2,76	96	1,34
LMW-G7-10%	579	2,77	225	1,29

G6-8 (Bx6+By8); G7-8 (Bx7+By8); LMW-G6 (LMW+Bx6); LMW-G7 (LMW+Bx7)

A táblázatban látható, hogy ha a HMW Bx alegységeket együttesen inkorporáljuk a By alegységgel, akkor valamennyi esetben az inkorporáció hatása kisebb mértékű volt a rizstészta dagasztási paramétereire, mint amikor egyénileg inkorporáltuk a rizsfehérjék polimerjébe. Az egyéni HMW glutenin alegységek beépítése után a rizstészták hosszabb dagasztási időt, nagyobb maximális konzisztenciát, kisebb ellágyulást és nagyobb stabilitást mutattak. Az együtt beépített x- és y típusú fehérjék hatására a dagasztási paraméterek csak kis mértékben változtak meg a re-oxidált tésztához viszonyítva. A Bx7 és a By8 együttes beépítése erősebb hatással volt a rizstészta z-arm mixerrel mért dagasztási görbéjére, mint a B6 és By8 HMW glutenin alegységek inkorporációja. Ugyanez volt megfigyelhető arra az estre is, amikor a bakteriálisan expresszált LMW glutenin alegységeket az x-típusú glutenin fehérjékkel együtt dagasztottuk a rizstésztát. A 10%-ban beépített LMW és Bx7 alegységek együttesen a stabilabb tésztát eredményeztek.

A kísérletekből az is kiderül, hogy a különböző típusú HMW glutenin alegységek inkorporációja során inkább a beépített fehérjék mennyiségének van nagyobb szerepe, mint az adott alegységek típusának. A búza alapliszten végzett korábbi kísérletek szerint az olyan egyéni HMW glutenin alegységek, mint a Dx5, Dy10, Dx2 vagy Dy12 beépítése kisebb hatással volt a búzatészta dagasztási paramétereire, mint a páronként (Dx5+Dy10, vagy 2+12) inkorporációja, ahol az alegységek 1:1 arányú jelenléte szinergikusan növelte a dagasztási paramétereket. A Bx6, x7 és y8 alegységek 1:1 arányú inkorporációja a búzához viszonyítva

kisebbs mértékű változást hozott. Ennek oka feltehetően a rizs polimerek és a búza gluteninek között létrejött egyéni kölcsönhatásnak az eredménye.



19. ábra. A nemesített Galahad fajtából izolált Bx6, Bx7 és By8 alegységek, valamint a bakteriálisan expresszált LMW fehérjék hatása a rizs dagasztási tulajdonságaira.

A különböző búza glutenin alegységekkel elvégzett kísérletek azt bizonyítják, hogy az inkorporált polimer molekula mérete az egyik legfontosabb faktor a dagasztási tulajdonságok kialakításában. A legnagyobb átlagos molekulatömeggel rendelkező fehérjemolekulák beépítése eredményezte a leghosszabb tészta kialakulási időt, illetve a legstabilabb rizstésztát. Azt is bizonyítottuk, hogy az LMW glutenin alegységek hatása a rizstészta dagasztási tulajdonságaira kisebb mértékű, mint a HMW glutenin alegységeké.

Néhány LMW glutenin alegység molekula lehet lánchosszabbító, más típusú LMW-GS pedig láncterminátor képességgel bírhat. Kísérleteinkben az LMW-GS molekulák pozitív irányba változtatták a dagasztási tulajdonságokat, szabad SH csoportjaikkal kötéseket alakítottak ki a rizs polimer illetve az együtt inkorporált HMW glutenin alegységekkel együtt.

Transzgenikus rizsvonalak z-arm mixerres vizsgálata

A HMW Dx5 glutenin alegységet expresszáló transzgenikus rizs mintákra z-arm mixerrel dagasztási vizsgálatot végeztünk. A bizonyítottan transzgenikus rizsnövényeket növényházban neveltük, majd a magok beérése után az összegyűjtött magokat meghántoltuk, laboratóriumi malmom megőrültük (METEFÉM, Budapest), majd 250 μ m átmérőjű szitán szitáltuk. Az így kapott liszteket használtuk fel a méréshez. Minden mintából két párhuzamos mérést végeztünk. A transzgenikus rizslisztek dagasztása során kapott paramétereiket a 13. táblázat tartalmazza.

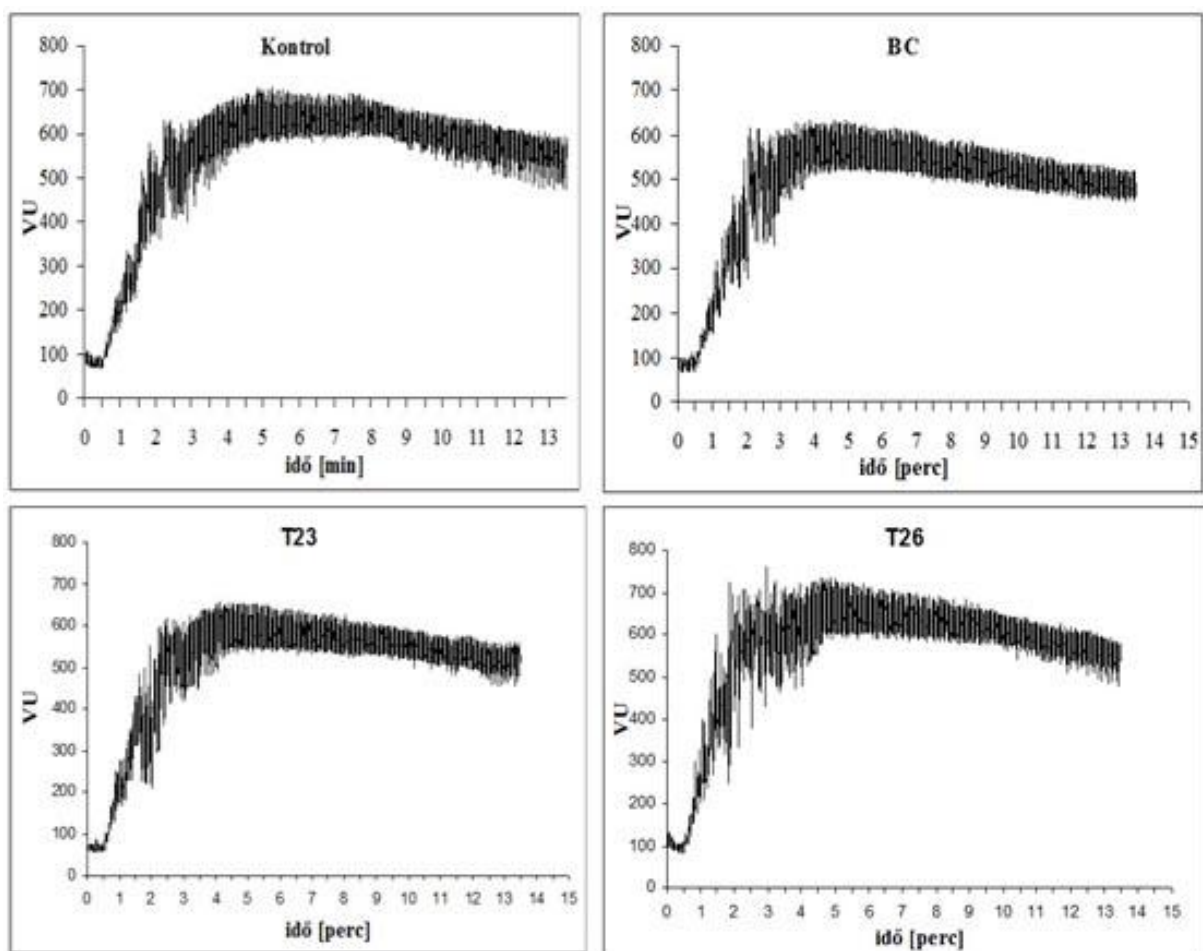
13. táblázat. A HMW Dx5 glutenin alegységet expresszáló transzgenikus rizsvonalak dagasztási paramétereit

Minta	PR [VU]	DDT [min]	BD	ST [min]
control	706	8,73	160	1,92
control	694	10,24	125	1,63
BC	577	7,10	136	1,07
BC	632	6,46	162	1,17
T23	761	4,94	190	1,21
T23	643	7,89	149	1,38
T26	618	7,07	125	1,08
T26	658	6,88	150	1,51

Control: nem transzformált minta, BC: tanformációs procedúrán átment, de nem transzgenikus rizsvonal, T26 és T23 transzgenikus rizsvonalak.

A mérés során kétfajta kontrollt használtunk. A nem transzformált, un. Vad típus mellett a transzformációs procedúrán átesett, de nem transzgenikus növényeket (BC) is felneveltünk és vizsgáltunk. A vad típusú mintához képest a transzformáción átesett, nem transzgenikus és a transzgenikus vonalak tézta kialakulási ideje is csökkent. A legnagyobb változást a rizstészta ellágyulásának mértékben tapasztaltunk a kontroll mintához viszonyítva. Az ellágyulás értéke (BD) jelentősen csökkent a transzgenikus rizslisztek dagasztási görbéjén. A Dx5 glutenin alegységet bizonyítottan expresszáló rizsvonalak stabilitása is szignifikánsan változott a kontroll liszthez képest.

A transzgenikus rizslisztek z-arm mixerrel kapott dagasztási görbéi a 20. ábrán láthatók. A mérési eredmények azt mutatják, hogy a kontrollhoz képest a transzgenikus rizslisztekből készült tézta dagasztási görbéi megváltoztak.



20. ábra. A HMW Dx5 gluenin alegységet expresszáló transzgenikus rizsvonalak z-arm mixerrel kapott görbéi

A korábbi kísérletekből ismert, hogy a HMW glutenin alegység molekuláknak hasonló a szerkezetük, amennyiben mindegyik tartalmaz egy hosszú, ismétlődő aminosav szekvenciából álló központi domént. Ez a szerkezeti elem méretében igen változó, s ez magyarázhatja egyrészt az egyes molekulák minőségre gyakorolt hatásában való eltérést. A központi szerkezeti elem különleges, egyedi másodlagos szerkezettel bír, amit béta-spirálnak neveznek. A szerkezet a molekulának egy hosszú pálcikaformát és elasztikusságot (molekuláris rugó) kölcsönöz. A központi elemet közrefogó N- és C-terminális régió tartalmazza többnyire a cisztein aminosavakat, melyeknek elsődleges szerepe van a sikérben található óriás molekulatömegű polimerek kialakításában, diszulfid hidakon keresztül. Feltételezhetjük, hogy a cisztein aminosavak száma és eloszlása a molekulán belül nagy hatással van a polimer biofizikai tulajdonságaira. A legjobb tulajdonságot hordozó 1Dx5 alegység négy ciszteint tartalmaz az N- és 1-et a C-terminálisban. A négy SH csoport az N-terminális régióban

teljesen egyedi -a többi x-típusú fehérje csak 3-at tartalmaz- és feltehetően erős hatással van az 1Dx5 alegység kiemelkedően jó tulajdonságára.

Ezért feltételezzük, hogy a transzgenikus rizsvonalainkban expresszált HMW Dx5 fehérjék szabad SH csoportjaikkal kölcsönhatásba lépnek a rizs glutelinek férjék szabad SH csoportjaival lépnek kölcsönhatásba kialakítva ezzel egy hosszabb polimer láncot, mely befolyásolja a tészta funkcionális tulajdonságait.

Az általunk létrehozott transzgenikus rizsvonalak mellett, hogy jobb funkcionális tulajdonságokkal rendelkeznek, mint a HMW glutenin alegységet nem expresszáló fajták, lehetőséget nyújtanak további vizsgálatokra, melyben arra is választ kaphatunk, hogy a rizsfehérjék milyen további kölcsönhatások kialakítására képesek.

Összefoglaló

A rizs fehérje-összetétele és funkcionális tulajdonságai közötti viszony tanulmányozására 11 fajtaazonos liszt tartalékfehérje összetétel és a rizslisztból készített tészta reológiai tulajdonságát vizsgáltuk. A kísérleti munka során mind a fehérjék analitikai jellemzése mind a reológiai tulajdonságok elemzése során számos új, a rizs vizsgálata kapcsán eddig nem használt paramétert adaptáltunk illetve dolgoztunk ki, többnyire a búzafutatórutinszerűen alkalmazott módszerekre alapozva.

A rizs alapvető tartalékfehérjéje, a globulin- alegységekből felépülő glutelin, illetve az egyéb monomer fehérjék mennyiségében nagy variabilitást tapasztaltunk. A rizs polimer illetve polimerizációra képes glutelin fehérjék a teljes tartalékfehérjéknek mintegy 70-80%-át teszik ki. A fehérjék oldhatósága illetve SE-HPLC-vel elkülöníthető frakcióinak mennyiségi viszonyai alapján két új, a funkcionális tulajdonságokkal szoros összefüggést mutató paramétert, az oldhatósági%-ot, illetve a polimer-fehérjék méreteloszlásának jellemzésére alkalmas UPP%-ot vezettük be.

A rizslisztból készített tészta dagasztási tulajdonságait a búzánál sikerrel alkalmazott mikro z-arm mixer technikával jellemeztük. Munkánk során a rizslisztek dagasztási tulajdonságainak jellemzésére bevezetünk egy ún. hidratációs paramétert, mely a tészta kialakulás előtt a hidratációs időt jelzi. A rizstészta dagasztási paraméterei és a fehérjefrakciók mennyisége közötti viszony tanulmányozása során megállapítottuk, hogy – a búzátészta tulajdonságaival analóg módon – szoros összefüggés mutatható ki a lisztben található nagyméretű polimerek UPP%-ban kifejezett mennyisége és a rizstészta dagasztási tulajdonságai között.

A búza tartalékfehérjék rizs modellben történő vizsgálatához kidolgoztunk egy, a vizsgálni kívánt izolált fehérjefrakcióknak a rizs polimerbe történő *in vitro* beépítésén alapuló módszert.

A rizsliszt polimerjeinek részleges redukcióját követően, a fehérjék az oxidációs lépése során a rizsfehérje polimer integráns részévé válnak, módosítva a rizstészta dagasztási tulajdonságait. A módszert addíciós kísérletekkel kiegészítve, ahol a fehérjéket egyszerűen hozzáadagoltuk az alapliszthez, mód van a fehérjék egyedi, illetve polimer-alegység formában megjelenő funkcionális tulajdonságainak összevetésére. HMW és LMW glutenin alegységek beépítése a polimer szerkezetbe ellentétes irányban változtatta a dagasztási paramétereket. Az

alapszt fehérjetartalmának már 5%-ában adagolt illetve beépített fehérjék szignifikáns változást mutattak a rizstészta technológiai paramétereiben. Egyedi HMW glutenin alegységek (HMW-Bx6, Bx7 és By8) inkorporációja során mód nyílt a fehérje méretének és szerkezeti tulajdonságainak hatását összevetni a dagasztási paraméterek változásának mértékével. A vizsgált alegységfehérjék közül a By8-as HMW-GS fehérje beépítése eredményezte a legnagyobb változást a dagasztási paraméterek értékében. Az egyes fehérje alegységek együttes inkorporációja kisebb mértékű változást eredményezett, mint amikor egyénileg inkorporáltuk a molekulákat a rizs polimer mátrixba. Az adagolás, illetve beépítés dagasztásra gyakorolt hatásával párhuzamosan a fehérjék polimer-kémiai tulajdonságait is követtük, megállapítva, hogy az UPP% és a dagasztási jellemzők közötti kapcsolat fontos szerepet.

A különböző búza tartalékfehérje frakciók beépítésére alkalmas rekonstrukciós technika új alternatívát jelent a lazított szerkezetű rizskenyér előállítására, másrészt hasznos *in vitro* kísérleti bizonyíték arra, hogy az *in vivo* módszerekkel, genetikusan módosított, búza fehérje géneket tartalmazó rizs-minták alkalmasak lehetnek új típusú élelmiszerek előállítására.

Az eredmények összefoglalásaként elmondható, hogy a rizs tartalékfehérjék mennyisége, polimer/monomer aránya, az oldhatatlan polimer fehérje frakció mennyisége szerepet játszik tészta dagasztási tulajdonságainak kialakításban. A rizs, mint modell rendszer alkalmas a búza tartalékfehérjéknek a technológiai paraméterek kialakításában betöltött szerepének a vizsgálatára. A kísérletek rendelkezésünkre álló hiánymutáns búzavonalakból izolált egyes HMW glutenin alegységek 5-10%-os beépülése a rizsfehérje mátrixba megváltoztatta annak funkcionális tulajdonságait. Ebből az következik, hogy az *in vivo* transzgenikus rizsben expresszált HMW glutenin alegységfehérje ilyen mértékű termelődése hatással lehet a rizs dagasztási tulajdonságaira. A dagasztási paraméterekben bekövetkező változás az általunk kidolgozott módszerrel kimutatható.

A búza tartalékfehérjék a rizstészta dagasztási paramétereire gyakorolt hatásának tanulmányozására *in vivo* transzgenikus rizs vonalakat hoztunk létre. A HMW-GS fehérjék közül, a minőségben betöltött meghatározó szerepe miatt, a Glu-1Dx5 HMW glutenin gént transzformáltuk sikeresen rizsbe. A transzgen stabil öröklődését és expresszióját több generációban is kimutattuk. Az első generációs transzgenikus vonalakban expresszált HMW 1Dx5 fehérje mennyiségét az alkohol-oldható fehérjék 3-4%-ára becsültük. A jövőben a HMW-Dx5 alegység fehérjét termelő transzgenikus növények magjaiból öröklött liszt

tulajdonságait mikro z-arm mixeres kísérletekben vizsgáljuk. Ezekkel a kísérletekkel választ kaphatunk olyan kérdésre, mint az *in vivo* expresszált búzafehérje mennyisége megfelelő-e a rizs dagasztási tulajdonságainak megváltoztatásához, vagy a transzgen milyen kópiaszáma biztosítja a megfelelő fehérje expressziót.

Az általunk létrehozott HMW Dx5 fehérjét termelő rizs csak egy előnemesítési folyamat eredménye, amiből nemesítési folyamatokban elit fajtákkal összekeresztelve megfelelő terméshozamú és rezisztenciájú fajta hozható létre.

Az ilyen fehérjéket termelő rizsfajta olyan fogyasztói kör számára teremthet lehetőséget sütőipari termékek fogyasztására, akik panaszaik miatt eddig nem élvezhették.

A jövőben a HMW glutenin alegységben dúsított rizs lehetséges alkalmazási területeit, illetve a célkitűzésben megfogalmazott gluten intoleranciával rendelkező betegek számára az új rizsfajta fogyasztásának lehetőségét esetleges toxikológiai vizsgálatok is igazolhatják.

A pályázat eredményeként létrejött egy olyan rizs liszt alapú modell rendszer, melyben vizsgálni lehet a búza tartalékfehérjék technofunkcionális tulajdonságait, olyan mélységben és olyan részletekben, mely a korábban használatos vizsgáló módszerrel nem lehetséges.

A rendszer kialakítása során olyan paramétereket vizsgáltunk, melyeket eddig még senki nem vizsgált- Az OTKA által támogatott projektnek köszönhetően olyan adatok birtokába juthattunk és tehetünk közzé a tudományos világ számára, melyek alapvető elméleti és gyakorlati újdonságnak számítanak.

Ilyen többek között a rizskeményítő hidratációs sajátosságainak megváltoztatására irányuló kísérletek eredménye, valamint a rizsliszt vízfelvevő képessége és a fehérjekémiai összetétele közötti viszony leírása, valamint az optimális vízadagolás módszerének kidolgozása.

Az új modell rendszerben véleményünk szerint finomabb részletekben vizsgálhatjuk a tartalékfehérjék különböző szerkezeti tulajdonságainak, például (a) a repetitív régió hosszának, (b) hidrofóbicitásának, (c) az SH csoportok számának és (d) molekulán belüli elhelyezkedésének, (e) az SH csoportokat körülvevő aminosavak tulajdonságainak, (f) a HMW glutenin fehérje alegységek N terminális régiója szerkezetének hatását a siker szerkezetének és tulajdonságainak kialakulására.

Közelebb jutottunk a siker fehérje szerkezetének pontosabb megismeréséhez, például az x- és y-típusú HMW glutenin fehérje alegységek kapcsolódásának eddig nem ismert, ill. nem bizonyított részleteit írhattuk le.

Az új modell rendszerrel nyert molekula szerkezet funkció összefüggések segítségével olyan új rekombináns tartalékfehérjék tervezhetők, melyek búza transzformálásban célzottan használhatók az egyes végfelhasználói igények kielégítésére.

A pályázatban leírt, sikeres munka eredményeire alapozva a későbbiekben kidolgozható egy újabb kutatási projekt, melynek célja új típusú élelmiszer (funkcionális élelmiszer) előállítása.