



## Proteomika az élelmiszer-előállításában

Czeglédi Levente – Gulyás Gabriella – Csósz Éva

2014., korrig 2015.



## TARTALOMJEGYZÉK

Biológiai alapismeretek .....	4
Proteom, proteomika .....	5
A proteomika vizsgálati módszerei .....	6
Gél-alapú proteomikai vizsgálatok .....	6
Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D-PAGE) .....	7
Egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) .....	8
Blue Native poliakrilamid gélelektroforézis (BN-PAGE) .....	9
Benzyldimethyl- <i>n</i> -hexadecylammonium chloride / egydimenziós poliakrilamid gél- elektroforézis (16 BAC/SDS-PAGE) .....	9
Kétdimenziós differenciáló gélelektroforézis (2D-DIGE) .....	10
Fehérjék detektálása .....	10
Gélelemző szoftverek .....	11
Felhasznált irodalom .....	12
Tömegspektrometriás alapok .....	13
Tömegspektrometriás alapfogalmak .....	13
Tömeg definíciók .....	13
Izotóp eloszlás .....	14
A tömegspektrométer felépítése .....	15
A tömegspektrometria adta lehetőségek a fehérjék vizsgálatában, különös tekintettel az élelmiszerek ellenőrzésére .....	18
Tömegspektrometriás fehérje vizsgálatok az élelmiszerek ellenőrzése során .....	19
Tömegspektrometriás fehérje azonosítás .....	19
Fehérjék mennyiségének meghatározása tömegspektrométer segítségével .....	22
Baktériumok gyors azonosítása tömegspektrométer segítségével .....	25
Kromatográfia, immunológiai módszerek és aminosav analízis alkalmazása az élelmiszerek vizsgálata során .....	26
Kromatográfia .....	26
Immunológiai módszereken alapuló technikák .....	29
A fehérjék aminosav összetételének meghatározása .....	33
Felhasznált irodalom .....	35
Hús és hústermékek proteomikája .....	36
Húsminőség .....	38
Hústermékek .....	41
Felhasznált irodalom .....	44
A tojás proteomikája .....	45
Tojásfehérje .....	45
Tojássárgája .....	46
Kombinatorikus peptid ligand könyvtárak .....	47
Tojásbél .....	48
Tárolás .....	48
Allergia .....	49
Felhasznált irodalom .....	50
Tej és tejtermékek proteomikája .....	51
A tej összetevői .....	51
A tej frakciói .....	52
Tejzsírcsepp membrán .....	52
MFGM fehérjék és a betegség megelőzés .....	53

Tejsavó .....	54
Kazeinek .....	54
A poszttranszlációs módosulatok (PTM) vizsgálata .....	55
Hamisítások .....	56
Sajtok .....	56
Baktériumok a tejtermékek készítése során .....	57
Felhasznált irodalom .....	58
A sör proteomikája .....	59
A sör fehérjei .....	59
Allergének .....	61
Kombinatorikus peptid ligand könyvtárak .....	61
Felhasznált irodalom .....	63
A bor proteomikája .....	64
Borfehérjék .....	64
Opálosság .....	65
Habképződés .....	66
Nyomonkövethetőség .....	66
Nem bor eredetű fehérjék .....	67
Fermentáció .....	67
Felhasznált irodalom .....	68
A gabonafélék és proteomjuk .....	69
Búza .....	69
Árpa .....	70
Liszt .....	71
Gabona-proteomikai vizsgálatok gyakorlati jelentősége .....	72
Abiotikus stressz .....	72
Felhasznált irodalom .....	74
Gyümölcsök és expresszált fehérjék .....	75
Érés során bekövetkező változások .....	75
Tárolás során bekövetkező változások .....	77
Allergének .....	80
Felhasznált irodalom .....	81
Zöldségek fehérjei élelmiszeripari szempontból .....	82
Zöldségek termésének érése .....	82
Tárolás során alkalmazott kezelések .....	84
Hagyományos és biotermelés .....	85
Egyéb proteomikai vizsgálatok .....	85
Felhasznált irodalom .....	87
A hal, mint élelmiszer proteomikája .....	88
Hamisítások .....	88
Allergének .....	90
Tenyésztett és vadvízi állományok összehasonlítása .....	90
Post-mortem változások .....	92
Mikrobiális leromlás, veszteség .....	93
Felhasznált irodalom .....	94

## **Biológiai alapismeretek**

Földünkön az életnek olyan formája alakult ki, mely a nukleinsavakhoz és a fehérjékhez kötődik. A nukleinsavak jelentősége kettős, hiszen örökítőanyagként is funkcionálnak, emellett a fehérjeszintetizáló rendszer működéséhez is nélkülözhetetlenek. Két fajtáját különböztetjük meg a nukleinsavaknak, az egyik a dezoxiribonukleinsav (DNS), a másik pedig a ribonukleinsav (RNS). A DNS molekulák szerkezetükből adódóan, lehetővé teszik a genetikai információ tárolását, megkettőződését és átadását. Ezzel szemben az RNS-ek elsősorban a gének kifejeződésében játszanak szerepet (bizonyos vírusoknál az RNS a genetikai információ hordozója). Három fő csoportjukat különböztethetjük meg: hírvivő RNS (messenger, mRNS), mely a DNS információtartalmának szállítását végzi a fehérjeszintézis helyére, szállító RNS (transfer, tRNS), mely az aminosavak szállítását végzi a fehérjeszintézis helyére, riboszomális RNS (rRNS), mely a riboszómák felépítésében vesz részt.

A nukleinsavak információtartalma alapján a fehérjeszintetizáló rendszerben létrejövő fehérjék azok a molekulák, melyek közvetlenül részt vesznek az életfolyamatokban. A fehérjék aminosavakból felépülő szerves makromolekulák, az aminosav sorrendet a DNS nukleotid szekvenciája kódolja a kódszótárnak megfelelően. A fehérjékben megkülönböztethetünk elsődleges, másodlagos, harmadlagos és negyedleges szerkezetet. Az elsődleges szerkezet az aminosav sorrendet jelenti, a másodlagos szerkezet a polipeptidlánc konformációját, a harmadlagos szerkezet a fehérje háromdimenziós szerkezetét, a negyedleges szerkezet pedig a több polipeptidlánc aggregációjából létrejövő összetett fehérjék szerkezetét jelenti.

A DNS molekulákban tárolt információ átadásának első lépése az információ átíródása hírvivő (mRNS) molekulákra, ez a folyamat a transzkripció. Első lépésként az RNS polimeráz kötődik a DNS-en található transzkripciós kezdőponthoz (promoter), majd a DNS szál széttekeredik. A lánchosszabbítás 5'-3' irányban halad, mely során egy hibrid (DNS+RNS) hélix képződik. Amikor a polimeráz a terminációs szignálhoz ér, befejeződik az RNS szintézis. Ezt követően az átíródott mRNS nukleotid sorrendjének megfelelő aminosav sorrendű polipeptid képződik, ez a transzláció. A transzláció kezdő lépéseként a riboszóma kis és nagy alegysége az átíródott mRNS-hez kapcsolódik. A riboszómán az A (aminosav), a P (peptid) kötőhely és az E (empty, üres) hely alakul ki. Ezt követően az mRNS kodonja és t-RNS antikodonja párosodik, az első aminosav eukariótákban mindig a metionin, ezért az

ennek megfelelő t-RNS kapcsolódik a P kötőhelyre. Ezután az mRNS bázissorrendjének megfelelő újabb t-RNS az A kötőhelyre kerül és a két aminosav között kialakul a peptidkötés. A metionint szállító tRNS az E helyre kerül, leválik és a riboszóma egy bázishármassal elmozdul az mRNS-hez képest. Így a második tRNS a P kötőhelyre kerül, az A kötőhely újra felszabadul. A folyamat annyiszor ismétlődik ahány peptidkötés van a fehérjében. Amikor az A helyen megjelenik valamelyik stop-kodon, akkor leáll a fehérje növekedése.

A fehérjék szintetizálódását követően megváltozhatnak bizonyos kémiai tulajdonságaik, ezek az ún. poszt-transzlációs módosítások. Két csoportjuk ismert, az egyik csoportba az enzimek által katalizált kovalens módosítások tartoznak, ebben az esetben aminosav oldalláncok kémiai tulajdonságai megváltoznak pl.: glikoziláció, aciláció, metiláció, foszforiláció. A második csoportba a fehérjék peptidkötéseinek irreverzibilis hidrolitikus hasítása, vagyis a proteolízis tartozik.

## **Proteom, proteomika**

A proteom, egy adott sejt, szövet, szerv vagy szervezet teljes fehérjekészletét jelenti egy adott időpontban. A proteomot, mint fogalmat először Marc Wilkins használta 1994-ben, Olaszországban. A proteom működésének megértéséhez szükséges az azt alkotó fehérjék azonosítása és más molekulákkal való interakciójának megismerése, mely funkciók és kölcsönhatások feltárásával foglalkozik a proteomika, mint tudományterület. A proteomika igen összetett molekuláris biológiai tudományág, mely többek között vizsgálja a fehérjék szerkezetét, biológiai funkcióját és ezek térbeli és időbeli változását. Nemcsak úgy tekinti a fehérjét, mint izolált molekulát, hanem figyelembe veszi a fehérje és környezete közötti kölcsönhatásokat is. Sem a genomiális DNS, sem az expresszáldott mRNS nem ad olyan pontos képet a sejtek állapotáról, mint a fehérjék, mivel a gének jelen lehetnek, de nem biztos, hogy átíródnak, és az mRNS kópiák száma sem mindig tükrözi a funkcionális fehérjék mennyiségi jelenlétét. A proteomika célja, hogy a kísérleti kezelések során azonosítsa az új, illetve nem várt változásokat a fehérjék expressziós szintjében, meghatározza a kölcsönhatásokat és módosulásokat, valamint teljes képet mutasson a sejtben lejátszódó folyamatokról. Más módszerekkel ellentétben, melyek egy időben mindössze néhány fehérje meghatározását végzik, a proteomikai vizsgálatokkal lehetőség nyílik egy vizsgálaton belül

akár több ezer fehérje meghatározására, így így módon nyomon követhetjük a változó környezetre adott dinamikus sejtválaszt.

A proteomikai vizsgálatok gyakorlati célokra történő felhasználása egyre inkább terjedőben van. Elsősorban a humán gyógyászatban használják, de az állattenyésztésben és növénytermesztésben is növekvő igény mutatkozik az ilyen jellegű vizsgálatokra.

Az élelmiszeriparban is több területen alkalmazzák a proteomika vizsgálati módszereit, melynek segítségével az élelmiszerminőség és biztonság is monitorozható. Egyre több olyan proteomikai tanulmány jelenik meg, melyek azt vizsgálják, hogy milyen hatással van az élelmiszer a fogyasztók egészségére és életfolyamataira, illetve hogy a feldolgozási folyamatok során hogyan változik az élelmiszerek fehérje-összetétele és ezzel összefüggésben annak bizonyos fizikai, kémiai, organoleptikus és egyéb tulajdonságai.

## **A proteomika vizsgálati módszerei**

### **Gél-alapú proteomikai vizsgálatok**

A proteomikai vizsgálatok számos bonyolult módszert kombinálnak a fehérjék azonosítására és mennyiségi meghatározására.

A gél alapú vizsgálatok sikerességét nagymértékben befolyásolja a minta előkészítés. Figyelembe kell vennünk a vizsgált fehérjék oldhatóságát, méretét, töltését, izoelektromos pontját. A hatékony minta előkészítés megakadályozza a fehérjék aggregációját, az enzimatis és kémiai módosításokat a fehérjék szerkezetében, eltávolítja a nukleinsavakat és más interferáló molekulákat.

A proteomikai vizsgálatoknál mindig komoly problémát jelent a minták komplexitása, hiszen egy-egy szövettípus akár több ezer különböző fehérjét is tartalmazhat. Ezért is okoz nehézséget, hogy megtaláljuk azokat a fehérjéket, melyek ténylegesen reagálnak az általunk elvégzett kezelésre. A minták előkészítése során ezt az összetettséget prefrakcionációval csökkenthetjük, ezáltal növekedhet a detektálható fehérjék száma. Számos frakcionálási módszer közül választhatunk, melyek alapjául a fehérje molekulák különböző fizikai és kémiai tulajdonságai szolgálnak.

## **Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D-PAGE)**

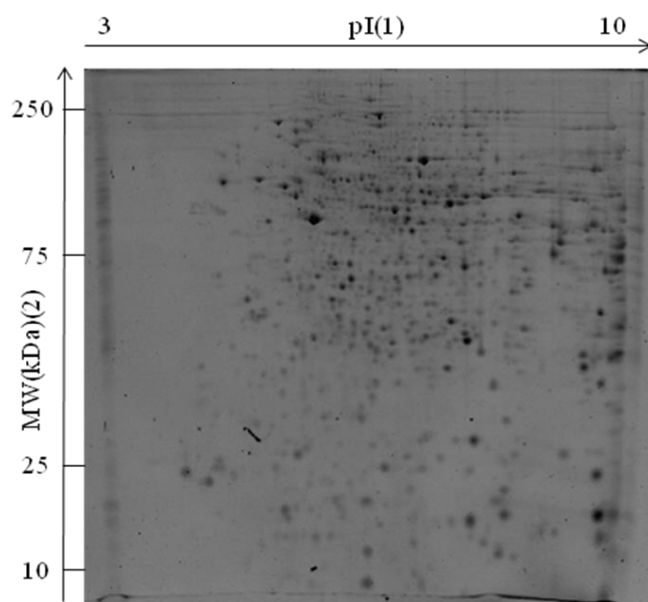
A gél alapú proteomikai vizsgálatok során leggyakrabban használt módszer a kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D-PAGE). Habár a proteomika kifejezés csak 1995-től terjedt el, a kétdimenziós gélelektroforézist már 1975 óta használják a fehérjék expressziós szintjének monitorozására.

A fehérjék első dimenzióban történő elválasztása során az izoelektromos pontjuk alapján fókuszáljuk őket. Az izoelektromos pont (pI) az a pH érték, amelynél a pozitív és a negatív töltések kiegyenlítik egymást, azaz az aminosav neutrális viselkedést mutat elektromos térben. A legtöbb fehérje izoelektromos pontja pH 3-12 tartományba esik.

Amikor a fehérjéket olyan közegbe helyezzük, ahol előzőleg már kialakítottunk egy pH grádienset, akkor elektromos áram hatására a fehérjék vándorolni kezdenek ebben a grádiensben és eközben vagy protonokat vesznek fel vagy protonokat adnak le. Végül elérnek egy olyan pontot a pH grádiensben, mely megegyezik az izoelektromos pontjukkal és ezen a ponton semleges ösztöltés alakul ki, emiatt a fehérjék az izoelektromos pontból nem tudnak elmozdulni.

A második dimenzióban az elválasztás egy sodium-dodecyl szulfát (SDS) alapú poliakrilamid gélen történik. A már előzőleg a pI alapján elkülönített fehérjéket tovább szeparáljuk a molekulásúlyuk (MW) alapján. Az SDS egy anionikus detergens, mely elmaszkírozza az egyes fehérjék valódi töltését és egységes negatív töltést ad nekik, így azok csak a molekulásúlyuk alapján különböznek egymástól, a poliakrilamid gél pórusainak szűrő hatására méret szerint elkülöníthetők a fehérjék.

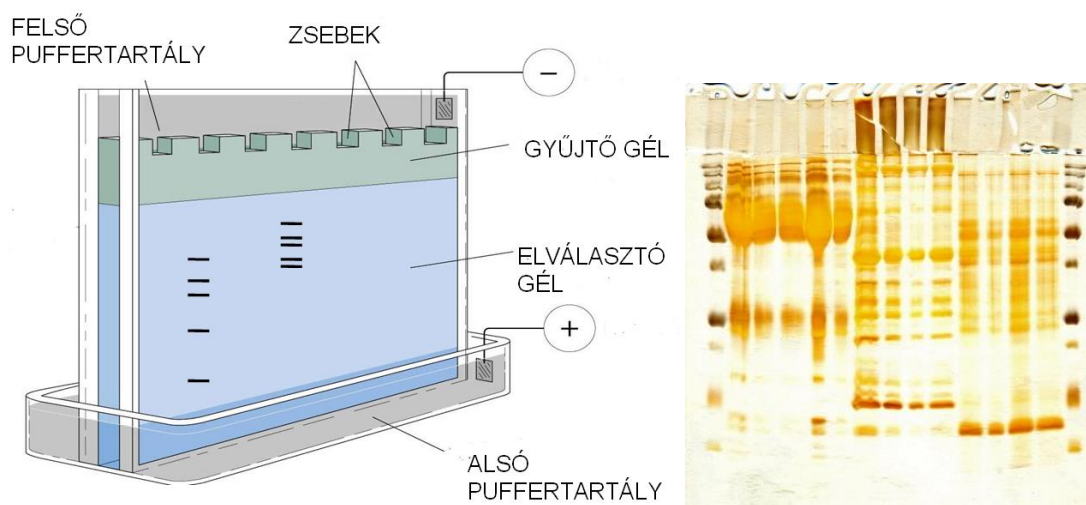
A kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis egy speciális esete, amikor második dimenzióban egy grádiens gél használunk a fehérjék molekulásúly szerinti elválasztására. A poliakrilamid koncentráció a gél tetejétől az alja felé nő, a pórusméret viszont csökken. Ennek hatására a kis molekulásúlyú fehérjék az elektroforézis során tovább maradnak a gélben, így ugyanabban a gélben lehetséges a kis és nagy molekulásúlyú molekulák elválasztása, ezáltal a komplex, molekulásúly alapján széles tartományt átölelő proteom szeparálása is megoldhatóvá válik.



1. ábra: Kétdimenziós poliakrilamid gélkép (Saját forrás)

### Egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

Az egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézis során csak molekulásúly szerint választják el a fehérjéket. Az elektroforézis előtt a fehérje mintákat SDS-sel kell forralni, ezáltal egységes negatív töltést kapnak a fehérjék, így már csak a molekulásúlyukban különböznek egymástól. Gyakran használnak az ilyen elválasztáshoz nem folytonos géleket, ami azt jelenti, hogy van egy felső ún. gyűjtő gél (stacking), mely alacsonyabb poliakrilamid koncentrációjú, ez alatt helyezkedik el a magasabb poliakrilamid koncentrációjú elválasztó gél (resolving).



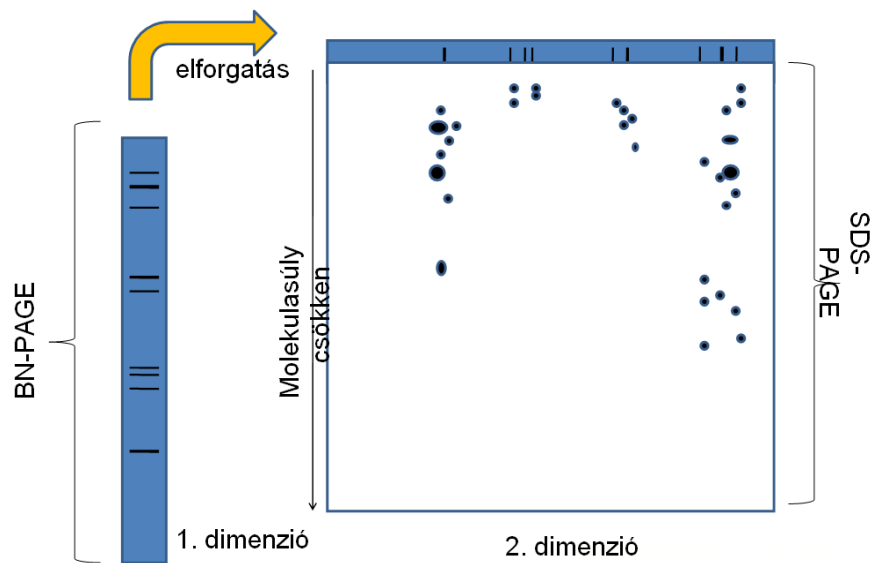
2. ábra: Egydimenziós poliakrilamid gél (Saját forrás)



### Blue Native poliakrilamid gélelektroforézis (BN-PAGE)

A blue native gélelektroforézist megelőzően a fehérjék szolubilizálása nem-denaturáló reagenssel történik, így maradnak a fehérjék natív (biológiailag aktív) állapotban. A minta előkészítés során még Coomassie brilliant blue-t is adnak a mintákhoz, ez az anyag ad a fehérjéknek negatív töltést.

Első dimenzióban egy natív gélelektroforézist (nem-denaturáló) kell elvégezni, így alapvetően a fehérjekomplexek molekulásúlya befolyásolja a futási sebességet. Az elektroforézist követően a gélcsávot ki kell vágni, és SDS-es oldattal denaturálni. Második dimenzióban ezt a denaturált gélcsávot kell 90°-kal elforgatni és egy gradiens SDS-es gél tetejére helyezni, majd elvégezni a méret szerinti elválasztást. A módszert leggyakrabban mitokondriális fehérjék vizsgálatára használják.

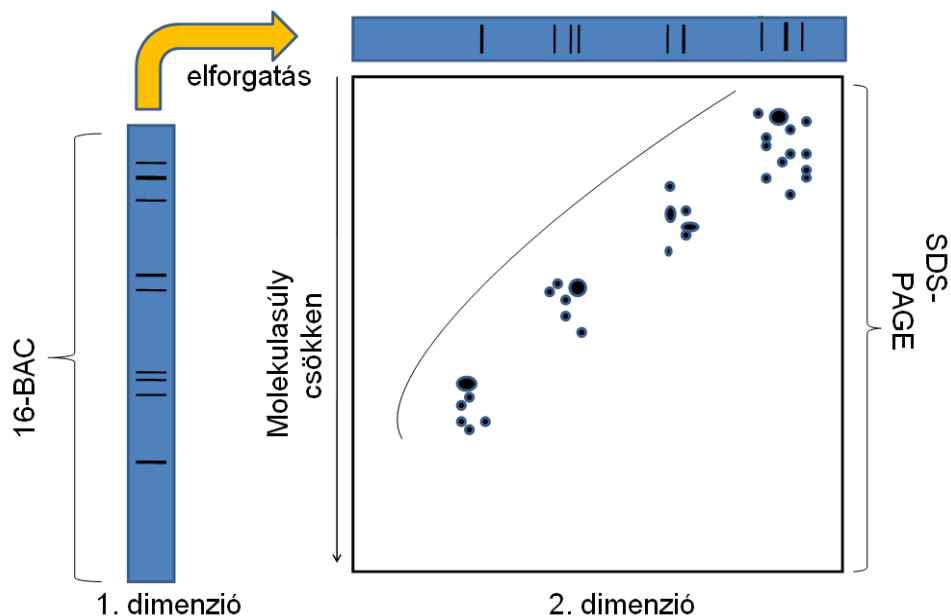


3. ábra: Blue Native poliakrilamid gélelektroforézis

### Benzyldimethyl-*n*-hexadecylammonium chloride / egydimenziós poliakrilamid gél-elektroforézis (16 BAC/SDS-PAGE)

Az első dimenzióban egy kationos detergenst használnak, ez a 16-BAC (benzyldimethyl-*n*-hexadecylammonium chloride), egy savas, nem folytonos gélét hozva létre (stacking gél pH 4,1; resolving gél pH 2,1). A futtatást követően a gélcsávot ki kell vágni és 90°-kal elforgatni. Második dimenzióban ezt az elforgatott gélcsávot egy SDS gél tetejére helyezzük és

elvégezzük a molekulásúly szerinti elválasztást. Ezt a módszert hidrofób membrán fehérjék vizsgálatára használják.



4. ábra: 16 BAC/SDS-PAGE

### Kétdimenziós differenciáló gélelektroforézis (2D-DIGE)

A 2D-DIGE módszernél a mintában lévő fehérjéket már a kétdimenziós elválasztás előtt megjelöljük fluoreszcens festékekkel (Cy2, Cy3, Cy5). Külön jelölést kap a kontroll és a kezelt csoport, valamint a belső standard, melyet a kísérletben szereplő összes minta elegyéből hozunk létre. Egy gélben fut a kontroll és a kezelt csoport egy-egy mintája, valamint a belső standard is. Ezzel a módszerrel csökkenthetőek a különböző futtatásokból eredő különbségek, valamint a belső standard használatával a gélelemzés is megbízhatóbb.

### Fehérjék detektálása

A fehérjék detektálásának hagyományos módja valamilyen festési eljárás.

A leggyakrabban az ún. Coomassie blue (érzékenység: 10 ng/fehérjefolt) festést alkalmazzák, ennek az az oka, hogy egyszerű, olcsó, ugyanakkor tömegspektrométerrel kompatibilis festék. Az R-250 formáját ún. regresszív festési módszerrel alkalmazzák. Az eljárás első lépésében magát a poliakrilamid gélét telítik a festékekkel, majd többszöri mosási lépéssel halványítják a sötét háttérrel. A festék ugyanis erősebben kötődik a fehérjékhez, mint a gél mátrixhoz. A G-

250 esetében ún. progresszív festési eljárást végeznek. Az általában tömény savat (TCA, foszforsav), ammónium-szulfátot és metanolt/etanolt tartalmazó koloid festékoldatban a koloid, illetve a diszperz formában jelen lévő festékrészecskék egyensúlyban vannak. A festés során a diszperz részecskék áthatolnak a mátrixon és a fehérjékhez kötődnek, a koloid részecskék viszont nem képesek a gélbe jutni, ennek eredményeként a háttér nem festődik.

Ennél érzékenyebb az ezüst-nitráttal vagy a fluoreszcens festékekkel történő festés (érzékenység: 1 ng/fehérjefolt). Az ezüst-nitrátos festés hátránya, hogy nem „végpontos” festés, tehát korlátozottan alkalmas mennyiségi analízisre. Az ezüstfestés során a poliakrilamid gélt először ezüsttel telítik, majd eltávolítják a gélmátrixhoz kötött fémionokat és redukálják a fehérjéhez kötött ezüstöt. A fluoreszcens festékek közül leggyakrabban a SyproRuby festéket használják, mely tömegspektrométerrel kompatibilis festék.

Immunológiai módszerrel is detektálhatóak a fehérjék, ez az eljárás a Western-blot. A fehérjéket gélről membránra visszük át (blottolás), a membránra átvitt fehérjét leggyakrabban a fehérjére specifikus antitesttel antigén-antitest reakciót hozunk létre és ezt detektáljuk. A fehérjék a membránra történő transzferálást követően részben visszanyerik natív konformációjukat, így alkalmasak fehérje-fehérje és fehérje-ligand kölcsönhatások kimutatására is.

## **Gélelemző szoftverek**

Ugyanaz a spot (fehérjefolt a gélen) ugyanolyan futtatási paraméterek mellett sem mindig ugyanott helyezkedik el a gélen. Ennek több oka is lehetséges: inhomogén poliakrilamid, különbségek a hőmérsékletben, különbségek az áramerősségben. Ezáltal nehézkesé válik a gélek összehasonlítása, expressziós különbségek detektálása. A gélelemző szoftverek segítségével csökkenthető a festésből adódó háttérzaj, elvégezhető a spotok párosítása (matching), a gélek egymásra illesztése (warping), fúziós gélek létrehozása, spotok detektálása és kvantifikálása, statisztikai próbák alkalmazása. A leggyakrabban alkalmazott szoftverek a Delta2D (Decodon, Germany), PDQuest, ProteomWeaver (Bio-Rad, USA), SameSpots, Progenesis (Nonlinear Dynamics, UK), Decyder 2D (GE Healthcare).

## Felhasznált irodalom

- Han J. Z. and Wang Y. B. (2008): Proteomics: present and future in food science and technology. *Trends in Food Science & Technology* 19. 26-30.
- Lilley K. S., Friedman D. B. (2006): Difference gel electrophoresis DIGE. *Drug Discovery Today: Technologies* 3. 3. 347-353.
- Nijtmans L. G. J., Henderson N. S., Holtc I. J. (2002): Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods* 26. 327–334.
- Patton W. F. (2002): Detection technologies in proteome analysis. *Journal of Chromatography B* 771. 3-31.
- Posch A. szerk. (2008): 2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation. Volume 1, 2. Humana Press.
- Rabilloud T., Lelong C. (2011): Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *Journal of Proteomics* 74. 10. 1829 – 1841.

## Tömegspektrometriás alapok

A tömegspektrometria olyan nagyműszeres analitikai technika, mely igen kis mennyiségű minta vizsgálatára alkalmas. Segítségével azonosíthatjuk a vizsgálandó anyagot, valamint információkat nyerhetünk a vizsgálandó anyagok jelenlétéről, módosulásairól, mennyiségéről. A vizsgálat eredményeként minden esetben tömegspektrumot kapunk, amely a függőleges tengelyen az intenzitást, a vízszintes tengelyen pedig a tömeg/töltés arányt ábrázolja. Ebben az anyag részben áttekintjük a legfontosabb tömegspektrometriás alapfogalmakat és megismerkedünk a tömegspektrométerek általános felépítésével.

## Tömegspektrometriás alapfogalmak

### Tömeg definíciók

A tömegspektrometriában is a kémiában használt tömeg definíciókat használjuk. Ezek szerint a molekula tömegeket Da-ban vagy atomi tömegegységben (amu) fejezzük ki (amu:  $^{12}\text{C}$  atom 1/12-ed része, Da:  $^{16}\text{O}$  atom 1/16-od része), de léteznek speciális, tömegspektrometriában használatos tömeg definíciók is.

A **monoizotópos tömeg** a legkönnyebb izotóp tömegével számolt tömeg ( $^1\text{H}= 1.007825$ ,  $^{12}\text{C}=12.000000$ ,  $^{16}\text{O}=15.994915$ ). Ez a legpontosabb tömeg és amennyiben a készüléknek elég jó a felbontása, akkor ezt használják. Ezzel szemben az **átlagos tömeg** a molekulát felépítő atomok átlagos tömegéből számolható. Ez az érték a természetes izotóp eloszlást tükrözi, a  $\text{H}=1.0080$ ,  $\text{C}=12.011$ ,  $\text{O}=15.994$  stb. tömegeket használja, ezért az így számolt tömeg nem lehet olyan pontos, mint a monoizotópos tömeg.

A tömegspektrometriában tulajdonképpen nem a tömeget, hanem a **tömeg/töltés arányt (m/z)**, vagy  $T_h$  (Thomson)-t mérjük és a töltés ismeretében meg tudjuk állapítani a tömeget a következő képlet szerint:

$$\text{ionok } m/z \text{ értéke} = (M_w + n)/n,$$

ahol  $M_w$  a móltömeg és  $n$  a töltések száma.

Pl. 1000 m/z érték +1-es töltés esetén 999 Da, míg +2-es töltés esetén 1998 Da.

A tömegspektrométerek egyik legfontosabb paramétere a **tömegtartomány**, vagyis a mérhető tömeg alsó és felső határa. Ugyanakkor a tömegspektrometriás analíziseknél a tömeg alapján történő azonosítás miatt igen fontos kérdés a tömegspektrométer által elérhető **tömegpontosság**, azaz a mért tömeg eltérése az igazi tömegtől. Ez minden tömegspektrométerre jellemző érték, amely megfelelő beállításokkal és kalibrálásokkal tovább finomítható. Az **abszolút tömegpontosság** a kísérleti és az elméleti tömeg közötti eltérést mutatja Da vagy amu-ban kifejezve (pl.:  $\pm 0.2$  Da), míg a **relatív tömegpontosság** egy relatív eltérés, amely a különböző tömegtartományokban eltérő lehet és az alábbi képlet szerint lehet kiszámítani:

$$\text{relatív tömegpontosság} = \text{abszolút tömegpontosság/elméleti tömeg} \times 10^6 \text{ ppm.}$$

A képlet alapján például 200 ppm relatív eltérés 100 Da tömegnél  $\pm 0,02$  Da, míg 10000 Da tömegnél  $\pm 2$  Da. Ezek az értékek tömegspektrometriás szempontból azt jelentik, hogy az alacsonyabb tömegtartományokban a tömegspektrométer pontosabban működik.

Egy másik fontos kérdés a tömegspektrométerek felbontó képessége. A **felbontóképesség** azt jelenti, hogy milyen tömegkülönbségű ionokat, egymástól milyen távolságra levő csúcsokat tud egymástól megkülönböztetni a tömegspektrométer. Minél nagyobb felbontás, annál jobb tömegpontosságot tud biztosítani a készülék.

## Izotóp eloszlás

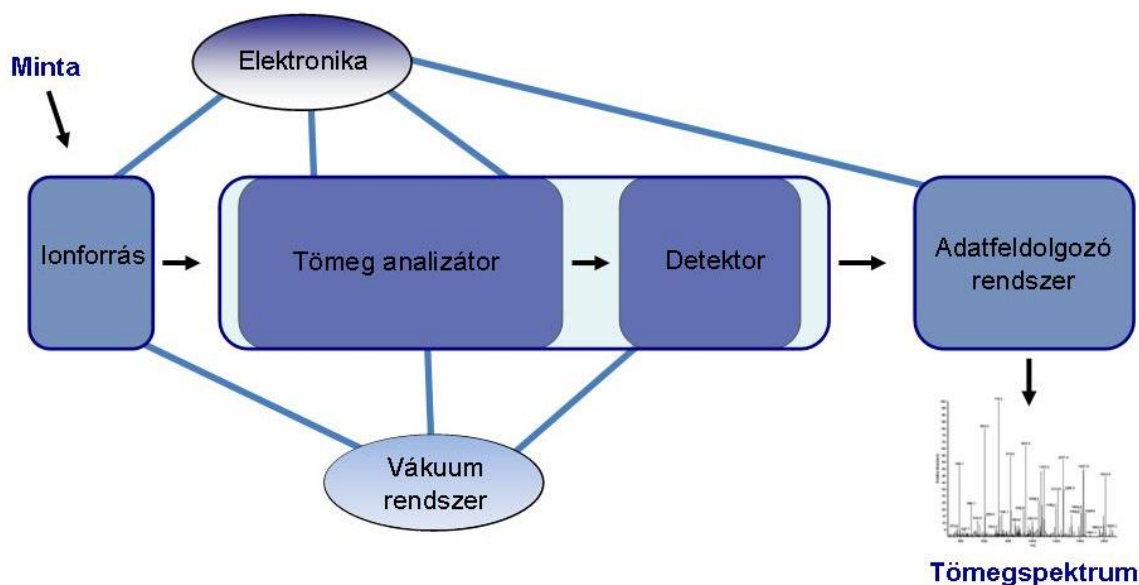
A legtöbb elemnek több mint egy stabil izotópja van, pl. a C atomok 98,9%-nak tömege 12 Da és 1,1%-nak 13 Da. Ez azért fontos, mert a jó felbontással rendelkező tömegspektrométerek az izotópokat is képesek detektálni. Az atomok számának növekedésével nő annak a valószínűsége, hogy izotóp atomok legyenek jelen a molekulában. Ez a spektrumban úgy mutatkozik meg, hogy a C-atomszám növekedésével nő a nagyobb izotóp tömegű csúcsok relatív intenzitása is. A tömegspektrométerek által regisztrált izotóp klaszter tulajdonképpen az elemek állandóan jelenlevő izotópjaiból származó eltérő tömeg sorozat, amely abban az esetben, ha elég jó a felbontás, akkor felhasználható a mintaionok töltésének meghatározására, valamint az izotópok segítségével jobb tömegpontosság is meghatározható.

Az **érzékenység** (a mérendő anyag legalacsonyabb még detektálható mennyisége), a **dinamikus tartomány** (az a koncentráció tartomány, amelyben az analit ion intenzitása lineárisan változik a koncentrációval) és a **mérési sebesség** (adott idő alatt lemérhető minták száma) olyan paraméterek, amelyek nemcsak a tömegspektrometriában, de minden más analitikai módszer esetében is fontosak.

## A tömegspektrométer felépítése

A tömegspektrométer gázfázisú ionok analizására alkalmazható nagyműszeres analitikai módszer, amely kiválóan alkalmazható szerves és szervetlen kismolekulák, fehérjék, lipidek, szénhidrátok, nukleotidok stb. kimutatására, azonosítására és egyes esetekben mennyiségük meghatározására.

A tömegspektrométernek három fő része van: az **ionforrás**, a **tömeg analizátor** és a **detektor**.



16. ábra: A tömegspektrométer felépítése

A minta ionok a tömegspektrométer belsejében vákuumban vándorolnak, ezért a tömegspektrométer belsejében a megfelelő vákuum fenntartását folyamatosan biztosítani kell. A detektorba jutott minta ionok a detektor típusától függően áramot vagy töltést generálnak, amelyeket az adatfeldolgozó rendszer spektrum formájában jelenít meg. A

tömegspektrométerekben alkalmazott detektoroknak több típusuk van (elektron-sokszorozó, ion-foton detektor stb.) ezekre a jelen tananyag keretein belül nem térünk ki.

A tömegspektrométerbe a mintát többféle formában juttathatjuk be. Gáz, folyadék vagy szilárd halmazállapotú mintát egyaránt vizsgálhatunk, de a minta típusától függetlenül minden esetben a mintát gázfázisba kell hozni.

Az **ionforrás** a mintát alakítja át gáz fázisú ionokká. Többféle ionizációs technika létezik:

- Elektron-ütközéses ionizáció (Electron Impact Ionization - EI)
- Kémiai ionizáció (Chemical Ionization - CI)
- Gyors atom-bombázásos ionizáció (Fast Atom Bombardment - FAB)
- Atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (Atmospheric Pressure Chemical Ionization - APCI)
- Termospray ionizáció (Thermospray Ionization - TS)
- Elektrospray ionizáció (Electrospray Ionization - ESI)
- Mátrix segített lézer deszorpciós ionizáció (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - MALDI)
- Deszorpciós elektrospray ionizáció (Desorption Electrospray Ionization - DESI)

Ezek közül az ESI és a MALDI technikákat szokták elsősorban a fehérjék vizsgálatánál alkalmazni. Mindkettő ún. lágy ionizációs technika, amely lehetővé teszi a nagymolekulák (pl. fehérjék) ionizációját anélkül, hogy a molekulák jelentős fragmentációt szenvednének. A lágy ionizációs technikák kidolgozásáért J.B. Fenn és K. Tanaka 2002-ben kémiai Nobel-díjat kapott. Az ionizációs technikák kiválasztásánál mindig a szükséges információ és a minta jellege határozza meg az alkalmazott módszert.

**Az elektrospray ionizáció (ESI)** során a kapillárisból áramló folyadék a kapillárisra kapcsolt nagyfeszültség (2000 V-5000 V) miatt töltött cseppek formájában hagyja el a kapillárist. A mintacseppekkel szemben áramló szárítógáz (nitrogén) az oldószer gyors párolgását idézi elő, cseppeket zsugorítja, miközben azok töltése nem változik. Egy adott térfogat alatt a töltött részecskék Coulomb-féle robbanást okoznak, ezáltal a csepp kisebb cseppekre esik szét. A szárítás, zsugorodás, robbanás folyamatsor többször ismétlődik, így mire a mintacseppek a tömegspektrométer bemeneti nyílásához érnek, már nagy valószínűséggel nem tartalmazzak oldószert. Az oldószer teljes eltávolítását a bemeneti nyílás körüli fűtött lemez is elősegíti. Az ESI esetén a minta folyékony halmazállapotú, az ionizáció többszörösen töltött ionokat eredményez és nagy térfogat-tartományban (nl-ml) használható.



**A mátrix által segített lézer deszorpciós ionizáció (MALDI)** esetén a mintát egy ún. mátrixszal együtt kristályosítják egy mintatartó lemez felületén. A szilárd halmazállapotú minta-mátrix keverékkel lézer segítségével energiát közölnek, ennek eredményeként a szilárd anyag gáz halmazállapotúvá válik, és a mátrix ionizálódik. A továbbiakban a minta ionizációját a mátrixionok segítik elő, de az iontranszfer kis hatásfoka miatt csak egyszeres vagy kétszeres töltésű mintaionok keletkeznek.

**A tömeg analizátorok** az ionokat  $m/z$  szerint elválasztják egymástól. Többféle típusuk ismeretes attól függően, hogy milyen elven alapul az ionok elválasztása pl. mágneses és elektrosztatikus, vagy a gyakran alkalmazott repülési idő analizátor (TOF), kvadrupól, ioncsapda, Orbitrap, Fourier-transzformációs ion ciklotron rezonancia stb. A megfelelő analizátor kiválasztása mindig függ az alkalmazástól, a kívánt teljesítménytől és természetesen a költségektől.

**A repülési idő (time of flight – TOF) analizátorban** az ionok a kinetikus energiájuk és nagyságuk alapján vándorolnak oly módon, hogy a kisebb  $m/z$ -vel rendelkező ionok gyorsabban, a nagyobb  $m/z$ -vel rendelkező ionok lassabban mozognak az analizátorban így eltérő időben jutnak el a detektorba. Minél hosszabb az ionok útja az analizátorban, annál szebb elválást eredményez, ezért a TOF analizátorok gyakran nagyméretűek. A TOF analizátor felbontása jó.

**A kvadrupól analizátor** négy elektródából áll, amelyekre feszültség kapcsolható. A  $V_{RF}$  (rádiofrekvenciás feszültség) és  $V_{DC}$  (egyenáramú feszültség) feszültségek hatására az ionok egy spirál mentén mozognak az analizátorban. A megfelelő feszültség értékek kombinációja révén megadható, hogy a kvadrupól milyen ionokat enged át, így szelektíven stabilizálja a bejuttatott ionokat. Az **ioncsapda** hasonló felépítésű lehet, mint a kvadrupól, de minden bejuttatott ion pályáját stabilizálja és a megfelelő feszültségek alkalmazásával csak bizonyos ionok pályáját destabilizálja. A destabilizált ionok elhagyják a kvadrupólt és a detektorba jutnak. A kvadrupól és ioncsapda felbontása nem olyan jó, mint a repülési idő analizátoré. Az **Orbitrap analizátorban** az ionok többé-kevésbé körpályán mozognak és az ionok mozgása által keltett áramokat a külső elektród érzékeli (detektor). A regisztrált frekvenciákat Fourier

transzformáció segítségével alakítják át spektrummá. Az Orbitrap analizátorral nagyon jó felbontást lehet elérni.

Az **egyszerű tömegspektrométerek** egy ionforrást, egy tömeg analizátort és egy detektort tartalmaznak (pl. MALDI-TOF, ESI-FTICR stb.). Ezzel szemben a **tandem tömegspektrométerek** két vagy több analizátort tartalmaznak (pl. MALDI-TOF-TOF, ESI-hármas kvadrupól, ESI-QTRAP, MALDI-QTOF stb.). Mindkét tömegspektrométer típusnak megvan a maga előnye és hátránya. Az alkalmazástól függően mindkét típus jól használható az élelmiszerek vizsgálatára.

## **A tömegspektrometria adta lehetőségek a fehérjék vizsgálatában, különös tekintettel az élelmiszerek ellenőrzésére**

Az élelmiszerek gyártása során az egyik fő cél az élelmiszerbiztonság. Az élelmiszerbiztonság az a tudományág, amely az ételmérgezések elkerülése érdekében az élelmiszerek biztonságos tárolásával, előállításával és kezelésével foglalkozik. Ételmérgezés alatt olyan élelmiszer eredetű megbetegedést értünk, amely az élelmiszerek rendeltetészerű használata esetén következik be. Ezt okozhatják fizikai, kémiai és biológiai ágensek egyaránt. A gyártási folyamatokat meghatározott minőségbiztosítási rendszerek pl. ISO, HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points – veszélyelemzés és kritikus ellenőrzőpontok) alkalmazásával lehet biztonságossá tenni, azonban a megfelelő minőség és biztonság szavatolásához folyamatos laboratóriumi ellenőrzés szükséges a teljes gyártási folyamat során illetve a gyártási folyamat végén. Ugyanakkor a fogyasztók megfelelő tájékoztatása érdekében a gyártók által jelzett összetétel és minőség ellenőrzéséhez is szükség van a laboratóriumi analízisekre. Olyan esetekben pedig, ahol ismeretlen vagy kétes az élelmiszer eredete (pl. a közelmúltban kirobbant lóhúsbotrány) elengedhetetlen a megfelelő vizsgálatok elvégzése.

## Tömegspektrometriás fehérje vizsgálatok az élelmiszerek ellenőrzése során

A tömegspektrometriás fehérje vizsgálatok tulajdonképpen két kérdéskör köré csoportosulnak. Az egyik a fehérjék azonosítása, a másik a fehérje módosulások vizsgálata. A fehérjék azonosítása segíthet allergének, toxinok, különböző patogénekre jellemző fehérjék kimutatásában és azonosításában, ugyanakkor ezzel a módszerrel lehetőség van a faj meghatározására is, amelyből a fehérje származik. Ennek elsősorban a különböző húskészítmények összetételének vizsgálata során van jelentősége, amikor el kell dönteni, hogy a húskészítmény sertés, marha, baromfi vagy más állatból származó fehérjét vagy esetleg szójafehérjét tartalmaz. A fehérjék fiziológiás körülmények között és az élelmiszerek feldolgozása, tárolása során jelentősen módosulhatnak. Ezen módosulások vizsgálata felhasználható bizonyos élelmiszerek érésének nyomon követésére pl. a sonka, kolbász, sajtok stb. érése során illetve a különböző feldolgozási és tárolási folyamatok során bekövetkező esetleges minőségromlás kimutatására.

### Tömegspektrometriás fehérje azonosítás

Az egyszerű tömegspektrométerekkel nagyon gyorsan meghatározható a fehérjék móltömege, de ez alapján nem igazán lehet a fehérjéket azonosítani, ugyanis több különböző fehérje is rendelkezhet ugyanolyan móltömeggel. További, pontosabb információ nyerhető akkor, ha a fehérjét valamilyen enzimmel – az esetek igen jelentős részében tripszinnel – megemésztjük és az így keletkezett peptideket analizáljuk a tömegspektrométerrel. A peptid keverékre jellemző tömegeloszlást, ha összehasonlítjuk adatbázisokban levő fehérjék elméleti, adott enzimmel generált peptidok tömeg eloszlásával, akkor azonosíthatjuk a fehérjéket. A módszer, a **peptid tömeg térképezés** (Peptide Mass Fingerprint – **PMF**) alkalmazható bizonyos egyszerűbb esetekben, de komplex minták elemzésénél nem ad megfelelő eredményt és ez a fehérje azonosítási mód általában publikációkhoz sem elfogadott.

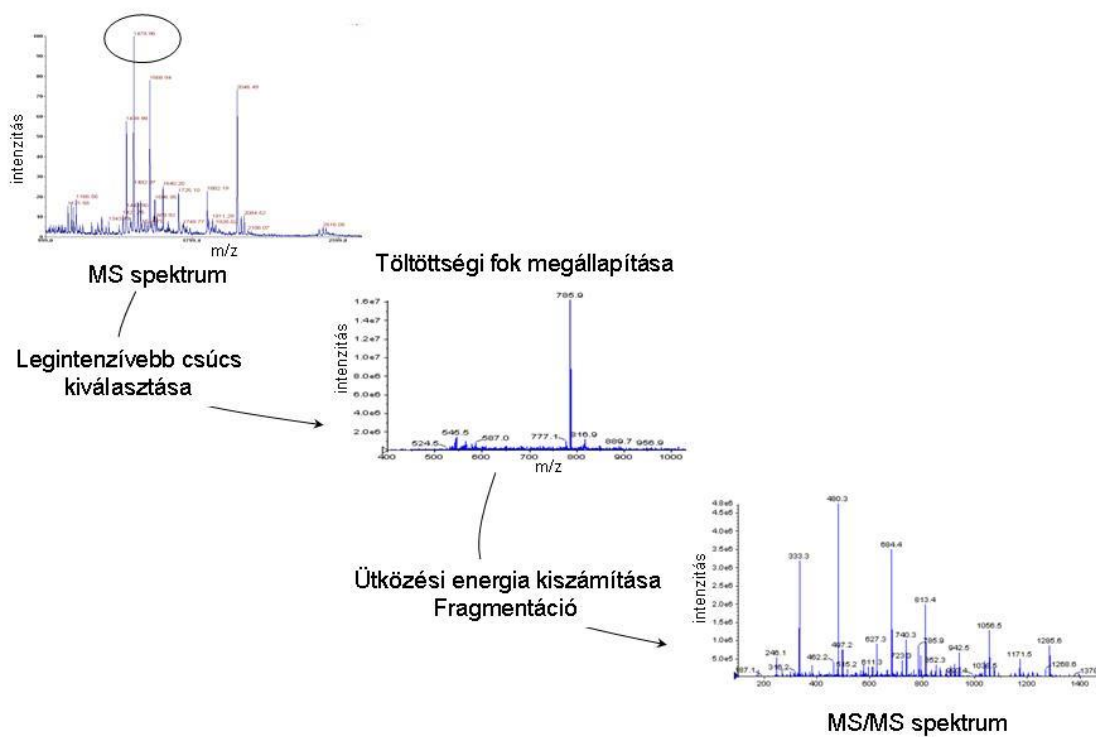
A tandem tömegspektrométerek megbízhatóan alkalmazhatók fehérjék szekvencia alapján történő azonosításához. A folyamat során a fehérjéket tripszinnel emésztik, a keletkezett peptideket ionizálják és pontos tömegüket meghatározzák, majd bizonyos ionokat – ún. **anya**

**ion vagy prekursor ionokat** – választanak ki és fragmentálják őket. Az így keletkezett egyszeres töltésű **leányionokat** analizálják és MS/MS spektrumot vesznek fel. Az MS/MS spektrumban levő ionsorozatok alapján meghatározzák a szekvenciát és azonosítják a peptidet, majd a peptidok segítségével a fehérjéket. Ez a módszer már pontos információt biztosít, amely közléshez is elfogadott.

Ahhoz, hogy a megfelelő leányionokat elő lehessen állítani elengedhetetlen az anyaionok fragmentálása. A **fragmentáció** az ütközési cellában történik, általában ütközés hatására. Több típusa létezik, leggyakrabban a CID (Collision Induced Dissociation) ütközés indukálta disszociációt alkalmazzák. Amikor a peptidok belépnek az ütközési cellába, akkor a CID révén főként a peptid kötés mentén fragmentálódnak és ún. „b” és „y” típusú leány ionok keletkeznek. Az ütközési energiát minden egyes peptidre optimalizálni kell. Attól függően beszélünk „b” vagy „y” ionsorozatokról, hogy az ütközés következtében létrejövő fragmensek közül melyik viszi magával a töltést. Amennyiben az N-terminálist tartalmazó fragmens tartalmaz töltést „b” ionról beszélünk, ha pedig a C-terminálist tartalmazó fragmens marad a töltés, akkor „y” ionról. A rögzített MS/MS spektrum tulajdonképpen a „b” és „y” ionsorozatokot tartalmazza. Amennyiben sikerül megtalálni az egyes sorozathoz tartozó csúcsokat, ismerve az egyes aminosavak monoizotópos tömegét, meghatározható a fragmentált peptid aminosav sorrendje, így felírható a szekvenciája.

Ahhoz, hogy MS/MS spektrumot tudjunk felvenni, szükség van egy tandem tömegspektrométerre. A vizsgálandó mintát a tömegspektrométer ionforrásában ionizáljuk és a minta ionokat bejuttatjuk a tömegspektrométerbe. Az esetek nagy részében információfüggő adatgyűjtést alkalmazunk, melynek során először az első analizátorral egy felderítő pásztázást végzünk, felveszünk egy tömegspektrumot (**MS spektrum**), majd ezt követően a három legintenzívebb csúcs töltöttségi fokát határozzuk meg. A meghatározott töltöttségi fokok alapján kiszámoljuk az ütközési energiát, majd egy másik tömeg analizátorban, általában ún. ütközési cellában, megtörténik a csúcsokhoz tartozó peptidok fragmentálása és a keletkezett fragmensek analízise (**MS/MS spektrum**). A tömegspektrométer felépítésétől függően a fragmensek analízise egy harmadik analizátorban is történhet (pl. tripla kvadrupól vagy QTRAP esetén). A folyamat automatizálható és egyetlen mintából több száz MS/MS spektrum gyűjtésére van lehetőség.

## Információ függő adatgyűjtés



17. ábra: Az információ-függő adatgyűjtés folyamata

A felvett MS/MS spektrumok analízise történhet keresőprogramok segítségével (ProteinPilot, MASCOT, SEQUEST stb.) az adatbázisokban tárolt információk felhasználásával (Uniprot, NCBI, IPI stb.) vagy, ha nem áll rendelkezésre az adott fajról sem fehérje, sem nukleotid szekvencia adat, akkor manuálisan vagy az ún. *de novo* szekvenálást segítő szoftverek alkalmazásával (DeNovoX, Lutfisk, DeNoS, PEAKS stb.).

Az MS/MS spektrumok alapján megállapított szekvencia felhasználható fehérjék pontos és megbízható azonosítására. A fehérjék azonosításához általában minimum két, legalább 95% konfidenciával meghatározott peptid szekvencia szükséges.

Az **MS/MS alapú fehérje azonosítás** elengedhetetlen része a proteomikai munkafolyamatoknak. Hiányában a kétdimenziós elektroforézissel megállapított fehérje mintázat nem értelmezhető a fehérjék szintjén. Az egyes minták között elektroforézissel megállapított különbségekhez célszerű fehérjét hozzárendelni, ezért a gélből kivájják az expressziós különbséget mutató foltokat, azokat tripszinnel emésztik és MS/MS alapú fehérje analízisnek vetik alá. A teljes folyamatot jól szemlélteti Di Luca és munkatársai tanulmánya,

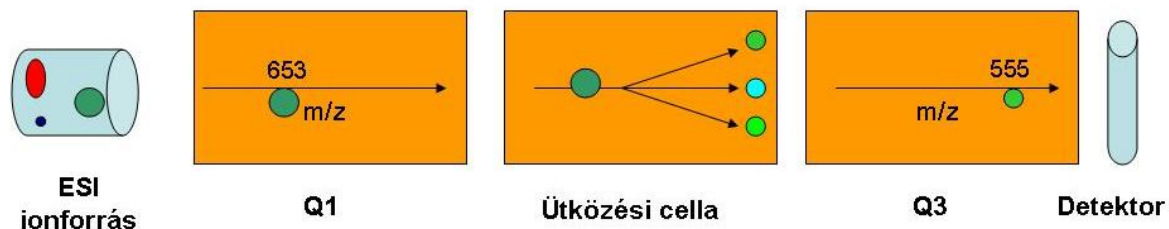
akik a sertéshús állása során bekövetkező változásokat vizsgálták. A különböző időpillanatokban vett mintákat kétdimenziós elektroforézis segítségével analizálták, megkeresték azokat a foltokat, amelyek szignifikáns különbséget mutattak a különböző mintákban, majd a foltok kivágása után MS/MS alapú fehérje vizsgálatával beazonosították a foltokban levő fehérjéket.

### **Fehérjék mennyiségének meghatározása tömegspektrométer segítségével**

A tömegspektrométer nem csak a fehérjék azonosítására, hanem mennyiségük megállapítására is alkalmas.

A többszörös reakció-monitorzáson (Multiple Reaction Monitoring – **MRM**) alapuló célzott tömegspektrometriás módszerek specifikusan képesek detektálni meghatározott molekulákat és az így kapott – csak az adott molekulára jellemző – jelek görbe alatti területéből információt nyerhetünk az illető anyag mennyiségére vonatkozóan is. A módszer elsősorban hármas kvadupól analizátorokat tartalmazó tömegspektrométerek specifikus mérési módja és azon alapul, hogy az első kvadupólt (Q1) úgy állítjuk be, hogy csak a meghatározott molekulára jellemző tömeg/töltés ( $m/z$ ) aránnyal rendelkező ionokat engedje át. Ezek fragmentálódnak az ütközési cellaként szolgáló második kvadupólban (Q2) és a harmadik kvadupól (Q3) beállításait úgy módosítjuk, hogy csak a meghatározott molekula előre meghatározott fragmensét engedje át. Tehát csak akkor kapunk jelet, ha két, az adott molekulára jellemző feltétel is teljesül egyidejűleg. Az ilyen Q1  $m/z$ -Q3  $m/z$  párok vagy más néven MRM átmenetek alkalmazása egyrészt biztosítja a specificitást, másrészt a görbe alatti terület arányos a tömegspektrométerbe juttatott molekula mennyiségével. Az MRM alapú módszerek nagyon érzékenyek és szelektívek, így alkalmasak kis mennyiségű ismert fehérjék kimutatására, poszt-transzlációs módosulásainak (foszforiláció, ubikvitináció, metiláció stb.) vizsgálatára, valamint jól használhatók mennyiség meghatározására. A módszer hátránya lehet, hogy ismerni kell a vizsgálandó molekulát ahhoz, hogy a megfelelő Q1 és a Q3  $m/z$  adatokat meg tudjuk adni.

## Az MRM működési elve

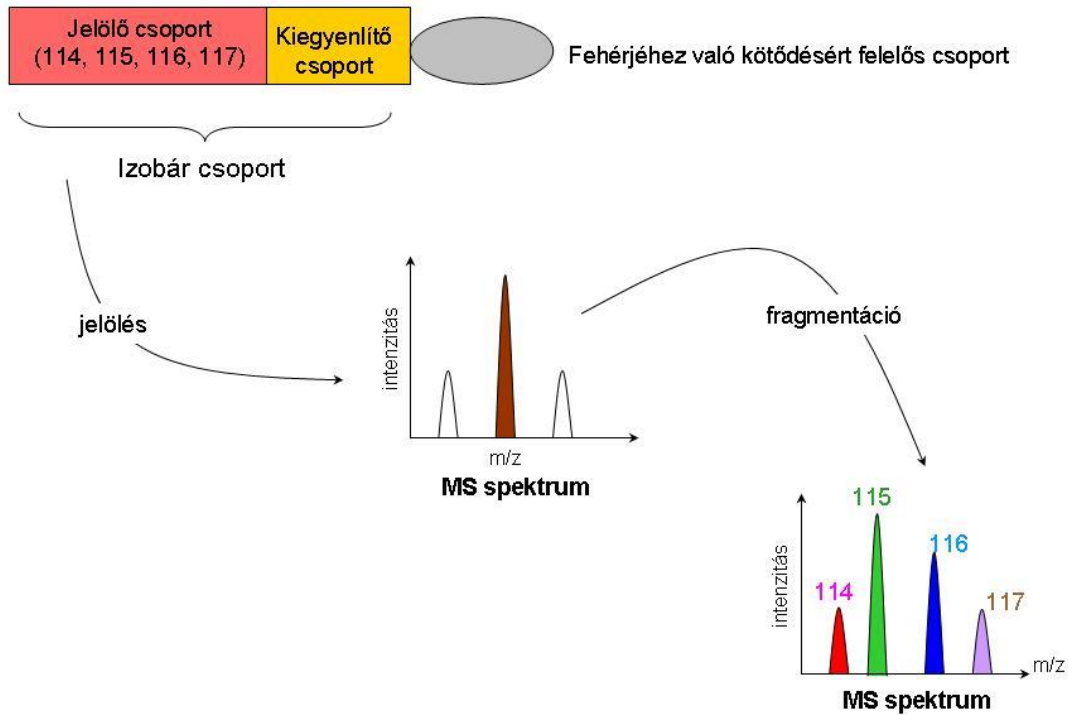


18. ábra: Az MRM mérési mód működési elve

Az élelmiszerek vizsgálata során gyakran alkalmaznak MRM alapú detektálási és kvantitálási módszereket a különböző toxinok, szennyező anyagok stb. célzott kimutatására és mennyiségének meghatározására.

A fehérjék és peptidek mennyiségének meghatározása nemcsak célzott tömegspektrometriás módszerrel történhet, hanem lehetőség van a minták kémiai jelölésére, majd a jelölt minták tömegspektrometriás analízisére. A kémiai jelölés során a fehérjék meghatározott funkciós csoportjaihoz kémiai jelölő ágenseket kapcsolnak. A módszer előnye, hogy bármilyen mintán alkalmazható, hátránya, hogy a jelölő reakció sosem 100%-os. Ezek a jelölő ágensek többfélék lehetnek; az egyik legelterjedtebb az ún. izobár jelölés, amikor a különböző mintákból származó, különböző jelölő ágenssel jelölt fehérjék tömege azonos, de az MS/MS során olyan ionok keletkeznek, amelyek csak az illető jelölő anyagra jellemzők. Izobár jelölést alkalmazó módszerek pl. iTRAQ – izobár jelölés abszolút és relatív kvantitáláshoz (isobaric tag for relative and absolute quantitation) és TMT – tandem tömeg jelölés (tandem mass tag), amelyek egyszerre 2-8 különböző minta jelölésére és multiplex analízisére alkalmasak.

## iTRAQ – izobár jelölés abszolút és relatív kvantitáláshoz



19. ábra: iTRAQ – izobár jelölés abszolút és relatív kvantitáláshoz

Az **iTRAQ** és a **TMT** jelölő ágensek a fehérjék Lys oldalláncaihoz és az N-terminális amin csoportjaihoz kapcsolódnak. A jelölő molekula három részből áll, egy amin-reaktív csoportból, amely a fehérjék amin csoportjához való kapcsolódásért felelős, valamint egy jelölő- és egy kiegyenlítő csoportból. A jelölő és kiegyenlítő csoportok tömege úgy van beállítva, hogy a kettő együttes tömege azonos a különböző jelölő csoportok esetében (4. ábra). Mindkét módszer előnye, hogy bármilyen mintát lehet jelölni és egyszerre akár 8 minta analízise is elvégezhető, azonban hátránya, hogy drága és a kapcsolódás hatékonysága sosem 100%-os.

Qin és munkatársai különböző szója variánsok fehérjéit vizsgálták. Ehhez a keresztezéshez felhasznált variánsok, valamint a keresztezésből származó variáns fehérjéit különböző iTRAQ reagensekkel jelölték, a fehérjéket összekeverték, majd ezt a keveréket MS/MS alapú fehérje azonosításnak és kvantitálásnak vetették alá.

A kémiai jelölésnek egy másik fajtája, az enzimatis  $^{18}\text{O}$  jelölés, amely két minta összehasonlítására szolgál. Az egyik mintát olyan oldatba helyezik, amelyhez  $^{16}\text{O}$ -t tartalmazó



vizet, a másikat pedig olyanba, amelyhez  $^{18}\text{O}$ -t tartalmazó vizet használtak. Mindkét mintát tripszinnel emésztik és a hasítás során a normál ( $^{16}\text{O}$ ) illetve a nehéz ( $^{18}\text{O}$ ) izotóp épül be a mintába. Ezután összekeverik a két mintát és a keveréket LC-MS/MS segítségével vizsgálják. A kivitelezéshez szükséges a proteáz gyors inaktiválása. A módszer előnye a kedvezőbb ára, viszont csak két proteóm hasonlítható össze és a kis tömegkülömbőség (2Da) a természetben előforduló izotópokkal interferálhat.

Ezzel szemben a **jelölés nélküli kvantitálás** (label-free quantification) egy teljes mértékben tömegspektrometriás módszer, amely nem alkalmaz jelölő anyagot, hanem a vizsgálat során bekövetkező MS/MS események számát használja a kvantitáláshoz. Minél több MS/MS készül egy fehérjéről, annál nagyobb koncentrációban van jelen. Megfelelő optimalizálással jól használható módszer, viszont csak a nagyon érzékeny készülékek esetében alkalmazható (Orbitrap, FTICR-MS). A módszer költséghatékonysága és a szolgáltatott adatok megbízhatósága miatt egyre szélesebb körben elterjedt fehérjék mennyiségének meghatározására.

### **Baktériumok gyors azonosítása tömegspektrométer segítségével**

Az élelmiszerekben jelen levő patogén baktériumok komoly élelmiszerbiztonsági kockázatot jelentenek, ezért elengedhetetlen az élelmiszerek elkészítésekor a megfelelő higiéniai szabályok betartása és a kész élelmiszerek folyamatos mikrobiológiai monitorizálása. Ugyanakkor a különböző élőflórát tartalmazó termékek esetében is fontos lehet a megfelelő baktériumok jelenlétének vizsgálata. A klasszikus mikrobiológiai módszerekkel a különböző baktériumok azonosítása hosszabb időt (egy vagy néhány nap) is igénybe vehet, ezzel szemben a tömegspektrometriás azonosítás gyors, néhány órán belül eredményhez vezethet.

Az módszer azon alapul, hogy a tömegspektrométerbe bejuttatott baktériumok rájuk jellemző módon adnak jelet, minden baktérium egy csak rá jellemző ún. spektrum lábnyommal rendelkezik. A baktériumokat a tömegspektrométerbe juttatva felvesszük a spektrumokat, amelyek tulajdonképpen egyedi spektrum-lábnyom keverékek, majd egy adatbázisban tárolt, az egyes baktérium fajokra és alfajokra jellemző spektrumokat felhasználva egy szoftver megállapítja a mintában jelen levő baktériumokat. A validált tömegspektrometriás módszerrel azonos vagy jobb eredményt lehet elérni, mint a klasszikus bakteriológiai módszerekkel, viszont sokkal kevesebb idő szükséges az analízis kivitelezéséhez. A módszer hátránya a műszeres háttér szükségessége és az, hogy csak olyan baktérium azonosítható, amit az

adatbázis tartalmaz. Ugyan az adatbázist folyamatosan frissítik és bővítik, érdemes ezt mindenképp figyelembe venni az eredmények értékelésénél.

## **Kromatográfia, immunológiai módszerek és aminosav analízis alkalmazása az élelmiszerek vizsgálata során**

Az élelmiszerek fehérjéinek vizsgálatára az előző fejezetben bemutatott tömegspektrometriás analízisek mellett számos más technikán alapuló módszer is alkalmas. Ezek közül a kromatográfia, bizonyos antitest alapú módszerek és az aminosav analízis elméleti hátterét, valamint alkalmazhatóságát vizsgáljuk meg az élelmiszerek laboratóriumi analízise szempontjából.

### **Kromatográfia**

A kromatográfia elnevezés a *kroma* – szín és *grafein* – írás görög szavakból származik. A módszer általános jellemzője, hogy az oldószerben, ún. mozgó fázisban feloldott elválasztandó anyagok áthaladnak az ún. álló fázison (papír, oszloptöltet stb.) és eközben elválnak egymástól. A kromatográfia felfedezése Mihail Szemjonovics Cvet orosz botanikus nevéhez fűződik, aki növényi pigmentek elválasztásán dolgozott a XIX. században. A mai modern kromatográfia alapjait Archer John Porter Martin és Richard Laurence Millington Synge fektették le, akiket munkásságuk elismeréseként, Nobel-díjjal tüntettek ki 1952-ben.

### **Osztályozás**

A kromatográfia osztályozása többféleképpen is lehetséges. A kromatográfias elválasztás céljait tekintve beszélhetünk **preparatív** vagy **analitikai** kromatográfiáról. A preparatív elválasztás során a cél az elválasztandó anyagok tisztítása, dúsítása a további felhasználás, analízis céljából. Az analitikai kromatográfia esetében a cél az elválasztandó anyagok azonosítása vagy relatív mennyiségének vizsgálata. Ezen elválasztás fő jellemzője, hogy lényegesen kisebb anyagmennyiségekkel dolgozik, mint a preparatív kromatográfia.

A kromatográfias technikákat osztályozhatjuk az állófázis, a mozgófázis vagy az elválasztás alapján. Az **állófázis milyenségétől függően** beszélhetünk **oszlopkromatográfiáról**, ahol az állófázis egy oszlop töltetét képezi és **síkkromatográfiáról**, ahol az elválasztás síkban

történik pl. a papír kromatográfia vagy a szilárd hordozóra felvitt vékonyréteg kromatográfia esetében. A **mozgófázis alapján** beszélhetünk **gázkromatográfiáról**, amikor a mozgó fázis gáz halmazállapotú, valamint **folyadékkromatográfiáról**, ahol a mozgó fázis folyadék. Az **elválasztás módja szerint** beszélhetünk **ioncserés kromatográfiáról**, **affinitáskromatográfiáról** vagy **méretkizárásos kromatográfiáról**. Természetesen más osztályozási kritériumokat is alkalmazhatunk, pl. a detektálás módja szerint beszélhetünk hagyományos vagy műszeres detektálásról, vagy az állófázissal kialakított kapcsolat alapján beszélhetünk abszorpciós, adszorpciós vagy ioncserés kromatográfiáról stb.

## HPLC

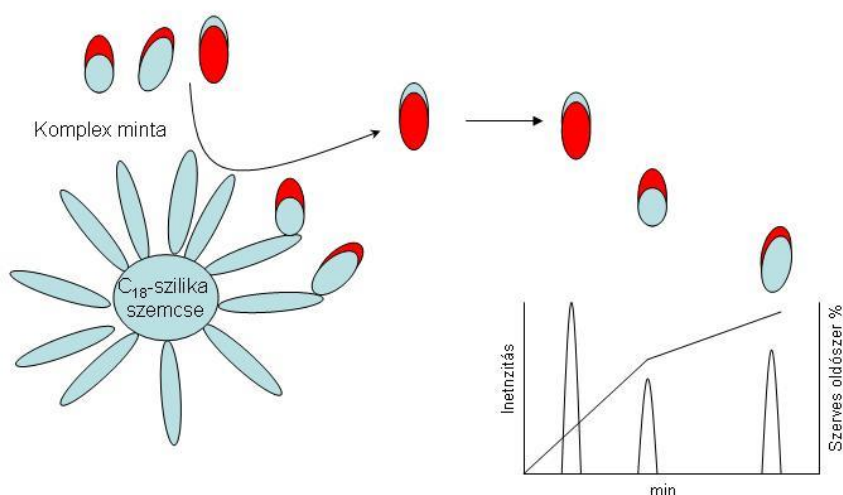
A nagynyomású folyadékkromatográfia (**H**igh **P**ressure **L**iquid **C**hromatography – HPLC) a biológiai analízisek során gyakran alkalmazott elválasztási módszer, amelynek alapjait Prof. Horváth Csaba magyar származású vegyészmérnök dolgozta ki az USA-ban, a Yale Medical School laboratóriumában. Később, együtt dolgozva a szintén magyar származású Molnár Imrével és Wayne Melanderrel leírták a reverz fázisú HPLC alapjául szolgáló mechanizmusokat.

Az első HPLC készüléket 1967-ben a Waters cég hozta kereskedelmi forgalomba. **HPLC részei** az oszlop vagy kolonna, amely a kromatográfiás töltetet (állófázist) tartalmazza, a pumpa/pumpák és kapillárisok, amelyek fő feladata, hogy a mozgó fázist vagy eluent átjuttassák az oszlopon, valamint a detektor, amely az oszlopot elhagyó molekulákat detektálja ezáltal generálva az eredményt, az ún. kromatogramot. A **kromatogramm** tulajdonképpen a molekulák retenciós idejét és a hozzá tartozó intenzitás értékeket tartalmazza. A **retenciós idő** pedig az adott anyagnak, adott körülmények között a rendszeren való áthaladásához szükséges időtartam, amely az álló fázis, a vizsgált molekula és a mozgó fázis közötti kölcsönhatásoktól függ.

A **reverz fázisú kromatográfia** során az egyes komponensek a hidrofobicitásuk alapján elválaszthatók egymástól. Állófázisként általában C4 vagy C18 szilika töltet, mozgófázisként pedig víz/acetonitril vagy metanol gradienst alkalmaznak. A módszer lényege, hogy a hidrofób részecskék jobban kötődnek a hidrofób felületeket tartalmazó állófázishoz, mint a hidrofil molekulák és csak magasabb szerves oldószer koncentráció mellett távolíthatók el. A módszer során a hidrofil eluensben (általában vízben) oldott mintát felviszik az oszlopra, az elválasztandó anyag részecskéi hozzákötődnek az állófázis szilika szemcséihez. A szerves oldószer mennyiségét fokozatosan emelve, az alkalmazott gradiens függvényében, az

oszlopról először a hidrofil, aztán a kevésbé hidrofil, majd a hidrofób és magas szerves oldószer % mellett pedig a nagyon hidrofób molekulák eluálódnak, azaz válnak le és jutnak a detektorba. Az élelmiszer- és biológiai kutatásokban gyakran alkalmazzák ezt az elválasztási módszert. Bonfatti és munkatársai a bivalytej összetevőit analizálták és azt vizsgálták, hogy a kazein tartalom függvényében hogyan változnak az egyes alvadási paraméterek. Munkájuk során azt találták, hogy az alfa S1 kazein késleltette az alvadást, míg a béta kazein szint emelkedése csökkentette az alvadási időt. A kapa kazein szint, valamint a glikozilált forma szintén befolyásolta a tej megszilárdulását.

### Reverz fázisú HPLC



20. ábra: Reverz fázisú HPLC működési elve. A pirosz szín a hidrofil, a kék szín a hidrofób anyagokat jelöli.

A **méretkizárásos kromatográfia** során az egyes komponensek a méretük alapján elválaszthatók egymástól. A töltetet porózus anyag alkotja és a szemcsék pórusméreténél kisebb méretű részecskék a porózus anyag szemcséibe jutnak, ott vándorolnak és ezáltal hosszabb utat tesznek meg, később eluálódnak az oszlopról. A pórusméreténél nagyobb méretű részecskék a szemcsék között, rövidebb utat megtéve, hamarabb hagyják el az oszlopot.

Az **affinitás kromatográfia** esetében a specifikus kölcsönhatásokat kihasználva lehet elválasztani az anyagokat egymástól. Pl. egy antitestet az oszlopon immobilizálnak és az antitesthez az oszlopra felvitt molekula-elegyből csak az antitest által felismert antigén fog hozzákötődni, a többi komponens lemosható az oszlopról. Specifikus elúcióval pedig az antigén is eluálható. A módszer nagyfokú specificitást biztosít és az antigén-antitest kölcsönhatás mellett a receptor-ligand vagy bármilyen specifikus kölcsönhatás felhasználható affinitás kromatográfias célra. A laboratóriumokban egyik legelterjedtebb technika az ún. Ni-kelát oszlop/töltet alkalmazása olyan rekombináns fehérjék tisztítására, amelyek 6-8 His-t tartalmazó véggel, ún. His-tag-el rendelkeznek.

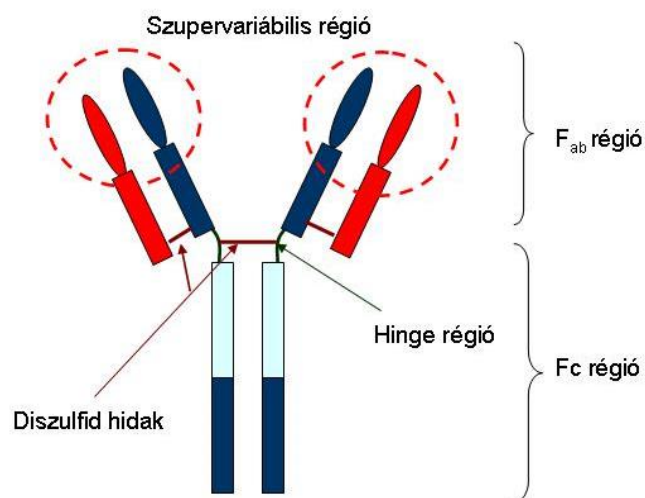
Az élelmiszerek előállítása és ellenőrzése során a HPLC felhasználása nagyon sokrétű, megfelelő standardok felhasználásával kiválóan alkalmazható különböző anyagok tisztaságának meghatározására, anyagok azonosítására, a gyártási/feldolgozási folyamatok során bekövetkező változások vizsgálatára.

## **Immunológiai módszereken alapuló technikák**

### **Az antitestek szerkezete**

Az antitestek könnyű és nehéz láncból felépülő molekulák, amelyek termelése az erre specializálódott B sejtekben és plazma sejtekben történik. Mind a könnyű, mind a nehéz lánc variábilis és konstans régiókat egyaránt tartalmaz. A láncok variábilis régiói együttesen alakítják ki az antigént felismerő szupervariábilis régiót. A könnyű láncot és a nehéz lánc variábilis régióit magába foglaló Fab régió elsődleges szerepe az antigén felismerése és megkötése, míg a nehéz lánc konstans régióját tartalmazó Fc régió szerepe az opszonizáció és az effektor funkciók (pl. Fc receptorhoz való kötődés) esetében mutatkozik meg.

## Az antitestek szerkezete



21. ábra: Az antitestek szerkezete

Az antitest és az antigén között specifikus kapcsolat alakul ki, az antitest felismeri és hozzákötődik az antigén megfelelő epitópjához. Az epitóp, vagy antigén determináns, az antigén azon része, amelyet az immunrendszer felismer, míg az antigén olyan molekula, amely az immunválasz aktiválását eredményezi. Az analitikai célra felhasznált antitestek lehetnek ún. poliklonális vagy monoklonális antitestek. A poliklonális antitest több B sejtől származó immunoglobulinok kombinációja, tulajdonképpen egy antigén „kocktél”, amely az antigén több epitópját ismeri fel. Ezzel szemben a monoklonális antitest egyetlen B sejtől származó immunoglobulinok összessége, amelyek az antigén egyetlen epitópját ismerik fel, emiatt sokkal specifikusabb jelet adnak.

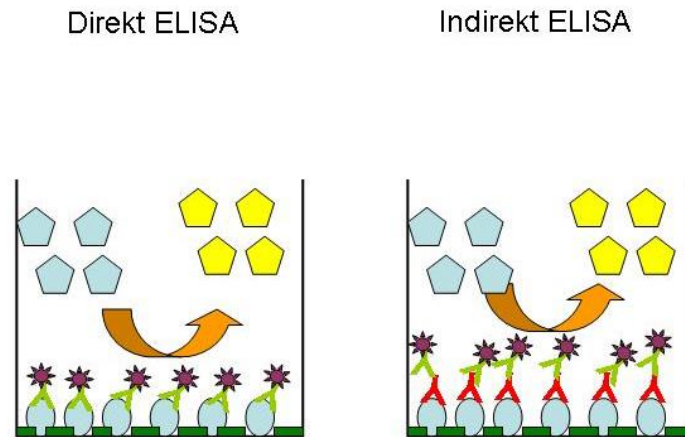
### Antigén-antitest kölcsönhatáson alapuló technikák

Az élelmiszerek vizsgálata során számos olyan módszer ismert, amely a specifikus antigén-antitest kölcsönhatáson alapul. Ezek közül az ELISA, a Western blot és az immunkromatográfiai módszereket fogjuk részletesebben megvizsgálni.

Az **ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)** meghatározott fehérjék vagy antigének kimutatására és mennyiségének meghatározására szolgáló módszer. A reakció oldatban megy végbe és a kivitelezéshez specifikus antitestek szükségesek. Első lépésként a

vizsgálendő anyagot/antigént immobilizálják egy mikrotiter lemez felszínén, majd ezt követi azon felületek blokkolása tejpor vagy marha szérum albumin (BSA) oldattal, amelyekhez nem kötődött anyag. A megfelelő mosási lépések után hozzáadjuk az antitestet, amely felismeri az immobilizált vizsgálendő anyag molekulái közül az antigént és hozzákötődik. A nem kötődött antitestek lemosása után következik a detektálás. Erre több lehetőség kínálkozik. Ha az antitest fluorofór csoporttal vagy enzimmel van kapcsolva, akkor a fluoreszcenciát vagy a megfelelő szubsztrát adta színváltozást tudjuk detektálni. Ez az ún. **direkt ELISA**. Azonban az esetek nagy részében az antitest kötődése után egy másik, ún. másodlagos antitestet adunk. Ez a másodlagos antitest felismeri az elsődleges antitest Fc régióját és ugyanakkor fluorofórral vagy enzimmel pl. alkalikus foszfatázzal (AP) vagy torma peroxidázzal (HRP) konjugált. A nem kötődött másodlagos antitestek lemosása után a megfelelő szubsztrát hozzáadása következik és a képződött szín intenzitását lehet mérni. Ez az ún. **indirekt ELISA**, melynek az az előnye a direkt ELISA-val szemben, hogy a másodlagos antitest alkalmazása révén egy jelerősítés is történik. Mindkét esetben a kapott szín/fluoreszcencia intenzitása egyenesen arányos a mikrotiter lemezhez kötődött antigén mennyiségével, ezért a módszer mennyiség meghatározására is alkalmas. Megfelelő standardok alkalmazásával a módszer kvantitatív, az antigén koncentrációjának meghatározására alkalmas, de standardok alkalmazása nélkül is szolgáltat relatív mennyiségi adatot. Ilyen esetekben az egyes mintákban a vizsgált anyag egymáshoz viszonyított, relatív arányát tudjuk meghatározni.

## ELISA – enzyme linked immunosorbent assay



22. ábra: ELISA – enzyme linked immunosorbent assay

Gyorsaságuk és egyszerű kivitelezhetőségük miatt az ELISA módszer különböző változatait elterjedten alkalmazzák az élelmiszerek vizsgálata során. Pl. tengeri élelmiszerek hisztamin tartalmának vizsgálata során, különböző élelmiszerek allergén (tojás, mogyoró, mustár, tej, gliadin stb.), vagy mikotoxin tartalmának meghatározásakor, vagy a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab fehérje ellenes antitest felhasználásával könnyen bizonyítható, ha az adott élelmiszer összetevői genetikailag módosított organizmusból származnak.

A **Western blot** meghatározott fehérjék kimutatására szolgál. Elviekben nagyon hasonló az ELISA módszerhez, azzal a különbséggel, hogy itt a reakció nem oldatban, hanem egy membrán felületén történik és a detektálás nem a keletkező szín intenzitás mérésével, hanem autoradiográfiás módszerrel történik. Ebben az esetben az előzőleg elektroforézissel elválasztott fehérjéket visszük át egy nitrocellulóz vagy polivinilidén-difluorid (PVDF) membránra a blottolás során. A membrán szabad kötőhelyeit itt is tejpor vagy BSA oldattal blokkoljuk, majd következik az elsődleges antitest hozzáadása. A nem kötődött antitestek lemosása után hozzáadjuk a másodlagos antitesteket, amelyek általában alkalikus foszfatázzal vagy torma peroxidázzal vannak konjugálva. A nem kötődött másodlagos antitestek lemosása után egy kemilumineszcens szubsztrát oldattal kezeljük a membránt, ekkor a másodlagos antitesteken levő enzim a szubsztrátot hasítja, miközben fény keletkezik. A keletkezett fényt fotografiai filmen rögzítjük, majd előhívás után az egyes foltok/sávok intenzitását értékeljük.



Az **immunkromatográfia** tulajdonképpen az antigén-antitest kölcsönhatás és a kromatográfia ötvözése. Egyszerű kivitelezni, laboratóriumi háttér nélkül, terepen is használható. Széleskörű alkalmazhatósága miatt napjainkban gyakorlatilag kiszorította a Western blot-ot az élelmiszerek vizsgálata során. A módszer lényege abban áll, hogy egy szilárd lapkára olyan anyagot visznek fel, amely lehetővé teszi az oldott anyagok vándorlását és a felületen, az anyagfelvitel helyétől távolabb megfelelő antitestet immobilizálnak. A szilárd lapka egyik végére felviszik a vizsgálandó anyagot, amely a megfelelő közegben a lapka másik oldala felé kezd el vándorolni. Amikor az oldat eléri az antitestet tartalmazó részt, létrejön az antigén-antitest kölcsönhatás és általában színreakció következik be, pozitív eredmény esetén színes sávot láthatunk. A lengyel Nuscana cég számos GMO és allergén tesztet forgalmaz ilyen formában. A módszer hátránya, hogy nem ad információt a vizsgált anyag mennyiségéről, de olyan kérdésekben, hogy az élelmiszerben az illető allergén/toxin jelen van-e vagy nincs, nagyon gyors választ kaphatunk.

### **A fehérjék aminosav összetételének meghatározása**

Az élővilágban előforduló fehérjék húsz ún. fehérjealkotó aminosav egymáshoz kapcsolódásával épülnek fel, de az egyes fehérjék eltérő arányban tartalmazzák az aminosavakat. Bizonyos aminosavakat az emberi szervezet nem képes előállítani, ezek az ún. **esszenciális aminosavak** (fenilalanin, valin, treonin, triptofán, izoleucin, metionin, leucin és lizin), amelyeket a táplálékból kell felvenni. Más aminosavakat ugyan elő tudunk állítani, de bizonyos életszakaszokban, bizonyos körülmények között szervezetünk nem tud eleget szintetizálni, ezért ezeket is a táplálék fehérjék lebontásából kell fedezni. Ezek az ún. **szemieszenciális vagy kondicionálisan esszenciális aminosavak** (hisztidin, arginin, tirozin, cisztein). Az egyes fehérjék esszenciális és szemieszenciális aminosav tartalma nagyon változó lehet, ezért táplálkozási szempontból nagy jelentőségű a táplálék fehérjék aminosav összetételének az ismerete. Minden fehérjének más-más az ún. **biológiai értéke**, vagyis az aminosav összetétel függvényében más-más mértékben tudjuk hasznosítani. Egy fehérje számunkra annál magasabb biológiai értékű, minél kevesebb kell belőle a nitrogén egyensúly fenntartásához, abban az esetben, ha csak az adott fehérjével táplálkozunk. Minél közelebb áll az adott fehérje esszenciális aminosav összetétele az emberi szükséglethez, és minél jobban emészthető, annál magasabb a biológiai értéke.

Az **aminosav analízis** a fehérjék összetételének és biológiai értékének megállapítása céljából szükséges. A módszer során a fehérjéket aminosavakra kell bontani; ez gyakran savas hidrolízis segítségével történik. Mivel az aminosavak nem detektálhatók HPLC segítségével, a második lépésben derivatizáció szükséges, vagyis megfelelő kémiai reagensekhez (pl. fenil-izotiocianát, dabszil-klorid) kell kötni az aminosavakat a detektálás érdekében. Ezt követi a derivatizált aminosavak elválasztása HPLC segítségével, majd a derivatizáláshoz használt csoport függvényében a megfelelő hullámhosszon az egyes aminosavak detektálása és a kromatogramm felvétele következik. A kromatogramm alapján, a megfelelő standardok felhasználásával lehetőség van a mintában található egyes aminosavak koncentrációjának kiszámítására.

A módszer számos előnnyel rendelkezik, viszonylag egyszerűen kivitelezhető, elérhető és kvantitatív adatokat nyerhetünk, hátránya viszont az, hogy nem ad információt a szekenciáról és korlátozottan használható fehérje azonosításra. Jól használható egyes takarmányok összetételének vizsgálatára, gyártási folyamatok során a kiindulási anyagok minőségi analízisére és a gyártási folyamat nyomon követésére, valamint a gyártás során megjelenő anyagok változásának meghatározására.

Az aminosav analízis egy másik formája az ún. „intelligens” anyagok és tömegspektrométer együttes használata. Ebben az esetben is szükség van a fehérjék hidrolízisére, ezt követően az aminosavakat megjelöljük az egyik „intelligens” reagenssel és összekeverjük a másik intelligens reagenssel már jelölt standardokkal. A keveréket tömegspektrométer segítségével analizáljuk és a két különböző „intelligens” reagensre kapott jel intenzitás-különbségéből kiszámoljuk az aminosav koncentrációkat. A módszer fő előnye a gyorsaság és a pontos koncentráció adatok biztosítása, viszont magas ára miatt nem igazán terjedt el széles körben.

## Felhasznált irodalom

- Bonfatti V., Gervaso M., Rostellato R., Coletta A., Carnier P. (2013): Protein composition affects variation in coagulation properties of buffalo milk. *Journal of Dairy Science* 96. 4182-4190.
- Cutillas P.R., Timms J.F. (2010): *LC-MS/MS in Proteomics: Methods and Applications*. Humana press. 1-330.
- Dass C. (2000): *Principles and Practice of Biological Mass Spectrometry*. Wiley-Interscience. 1-448.
- Di Luca A., Elia G., Mullen A.M., Hamill R.M. (2013): Monitoring post mortem changes in porcine muscle through 2-D DIGE proteome analysis of Longissimus muscle exudate. *Proteome Science* 11. 9.
- Hettiarachchy N.S., Sato K., Marshall M.R., Kannan A. (2012): *Food Proteins and Peptides: Chemistry, Functionality, Interactions and Commercialization*. CRC Press. 1-470.
- Kinter M., Sherman N.E. (2000): *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*. Wiley-Interscience. New York. 1-320.
- Nielsen S.S. (2010): *Food Analysis, Fourth Edition*. Springer US. 1-602.
- Nollet L.M.L., Toldra F. (2012): *Food Analysis by HPLC, Third Edition*. CRC Press. 1-1078.
- Qin J., Gu F., Liu D., Yin C., Zhao S., Chen H., Zhang J., Yang C., Zhan X., Zhang M. (2013): Proteomic analysis of elite soybean Jidou17 and its parents using iTRAQ-based quantitative approaches. *Proteome Science* 11. 12.
- Sechi S. (2007): *Quantitative Proteomics by Mass Spectrometry*. Humana Press. 1-218.

## Hús és hústermékek proteomikája

A hús és hústermékek fogyasztása a kiegyensúlyozott táplálkozás fontos részét képezi. Teljes értékű fehérjeforrásnak tekinthetők, mivel a húsokban az esszenciális aminosavak aránya ideális. Vitamintartalom szempontjából legfontosabbak a B1-, B2-, B6-, B12-, A- és D-vitaminok. A húsok az életműködéshez fontos ásványi anyagokat is tartalmaznak, ilyenek a vas, cink, mangán és szelén. A húsban lévő vas nagyobb arányban hasznosul a felszívódás során, mint a növényi forrásból származó vas. A mértéktelen húsfogyasztásnak káros következményei is lehetnek, ilyen a köszvény, a reuma és az érlemeszesedés. Magyarország évi húsfogyasztása átlagosan 63 kg/fő, ennek százalékos megoszlása: marha és borjúhús 4,4%, sertéshús 44,6%, baromfihús 43,4%, egyéb hús 2,8%, belsőség: 4,8%. Ez számottevően meghaladja a világot, mely 2012-ben 42,5 kg/fő volt.

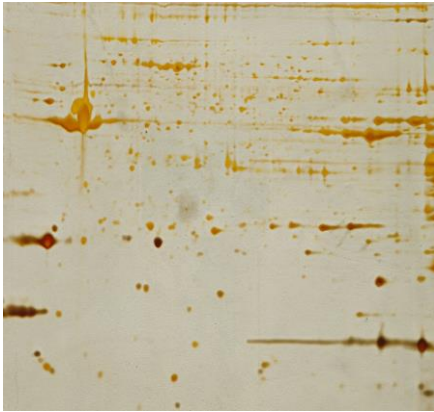
A hús átlagos táplálóanyag-tartalma a következőképpen alakul: 56-72% víz, 15-22% fehérje, 5-34% intramuszkuláris zsír, 3,5% szénhidrátok, sók, ásványi anyagok és vitaminok. Az összetevők arányát több tényező befolyásolja, melyek közül alapvető a takarmányozás és úgyszintén meghatározó a faj, fajta, ivar, életkor és az állatok tartástechnológiája is.

Az izomban található fehérjék három nagyobb csoportba sorolhatók: miofibrilláris fehérjék, szarkoplazma fehérjék és kötőszöveti fehérjék. A miofibrilláris fehérjék a magasabb sókoncentrációjú oldatokban oldhatóak, ide tartoznak az aktin, miozin, tropomiozin, troponin és a-, b-aktinin, melyeknek elsősorban az izommozgásban van szerepük. A szarkoplazma fehérjék vízben és gyengébb sóoldatokban oldhatók, ide tartoznak az albuminok, mioglobin, globuláris fehérjék, miogén, mitokondriális fehérjék, lizoszómák, liposzómák és a szarkoplazmás retikulum hálózat fehérjéi. A kötőszöveti fehérjék vízben és sóoldatokban oldhatatlan frakciót képeznek, ilyenek a kollagén, elasztin és a retikulin.

Az izomszövet post mortem hússá alakulása előtt jellegzetes proteom-mintázattal rendelkezik, melyben megtalálhatóak fajspecifikus elemek is.



5. ábra: Juhhús 2D-PAGE gélképe (Saját forrás)



6. ábra: Marhahús 2D-PAGE gélképe (Saját forrás)



7. ábra: Sertéshús 2D-PAGE gélképe (Saját forrás)

A hússal és hústermékekkel végzett proteomikai vizsgálatok célja a következőkben foglalhatóak össze:

- a húsminőség háttérben álló jelenségek feltérképezése,
- a húsminőség javítása biomarker fehérjék azonosításával,
- izomnövekedés és fejlődés vizsgálata,
- feldolgozási folyamatok hatása a proteom összetételére,
- hamisítások kiszűrése,
- élelmiszerbiztonsági vizsgálatok.

## Húsminőség

A húsminőségben mutatkozó nagy variancia gyakran jelent problémát a húsiparban. A proteomikai vizsgálatok segítséget nyújthatnak e komplex tulajdonság tanulmányozásában, melyet nem csak az állat genotípusa és a termelési környezet, hanem a post mortem folyamatok is befolyásolnak. A leggyakrabban vizsgált húsminőségi paraméterek közé többek között a porhanyósság, a víztartó képesség, a márványozottság, a szín és más organoleptikus tulajdonságok tartoznak.

A fehérjék kémiai módosításai hatással vannak az élelmiszerek különböző tulajdonságaira, mint például az emészthetőség, a tápérték és a szavatosság. Mint az előzőekben leírtuk, a fehérjemódosításoknak két csoportját különböztethetjük meg, az egyik a kovalens módosítások (oxidáció, foszforiláció, acetiláció, glikoziláció, aciláció), a másik a fehérje molekulák hasítása (proteolízis). A módosítások megváltoztathatják a fehérjék molekulasúlyát és/vagy az izoelektromos pontját, ezért használható az egydimenziós és a kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis vagy az LC-MS/MS módszer ezen módosítások kimutatására. Az oxidációt külön ki kell emelni a módosítások közül, mert minőségromlást okoz, azáltal, hogy csökkenti a hús víztartóképességét, a porhanyósságát és lédúságát valamint az emészthetőséget és tápértéket is.

A húsminőségi tulajdonságok közül a vásárlók számára talán a porhanyósság a legfontosabb. Az izomfehérjék post mortem degradációja fontos faktora a hús puhaságának. Rövid idővel az állat levágása után elkezdődik ez a folyamat, mely során a miofibrilláris fehérjék degradálódnak. Ezek a fehérjék biztosítják a miofibrillumok szerkezeti integritását, proteolitikus degradációjuk a miofibrillumok gyengüléséhez, végső soron a hús puhaságához vezet. A kutatók sok fehérjét azonosítottak, melyek lehetséges markerként használhatók a húsok porhanyósságának monitorozásakor. A troponin T, nebulin, titin, vinculin, desmin és dystrophin fehérjék esetén SDS-PAGE és immunoblot segítségével is bizonyították ezek post-mortem degradálódását. A titin és nebulin gyorsabban degradálódik a porhanyósabb húsban, így ezek, mint potenciális biomarkerek funkcionálhatnak. A glikolitikus útvonal enzimeinek expressziós szintje növekszik a porhanyós húsokban, ilyenek a triózfoszfát izomeráz, az enoláz 3, a gliceraldehid 3-foszfát és a piruvát-kináz.

Az oxidatív energia metabolizmus enzimeinek overexpressziója szintén a hús porhanyósságát jelzi, ilyen fehérjék a 3-hidroxiizobutirát dehidrogenáz, a citokróm-c, a hidroxiacil-KoA

dehidrogenáz, az izocitrát dehidrogenáz, a szukcinát dehidrogenáz és a szukcinil-KoA dehidrogenáz. A hősokk fehérjék expressziós változása is összefüggésbe hozható a húsok porhanyósságával. A hősokk fehérjék védik a fehérjéket a denaturálástól és a funkcióvesztéstől. Marker fehérjékként azonosították a HSP60, HSP70, HSP40, HSP27 hősokk fehérjéket, megnövekedett expressziójuk mérsékli a hús porhanyósságát, így a húsminőség kedvezőtlen irányba változik.

A porhanyósság javítása post-mortem is lehetséges, ennek eszköze az elektromos stimuláció. Az izmok hidegrövidülése (az izomban lévő ATP és a nem megfelelő Ca-pumpa váltja ki) ellen hatásos. Izomösszehúzódást indukál, mely az izomban lévő maradék ATP-t felhasználja. A kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézissel összehasonlított nem kezelt és az elektromosan stimulált hús proteomja azt mutatta, hogy a stimuláció hatására a metabolikus enzimek degradálódnak és ez a folyamat az ATP kiürülést segíti. A kreatin kináz degradációja a nagyobb energia felhasználást teszi lehetővé. Az elektromos stimuláció hatására a troponin-T, a dezmin és az aktin mennyisége csökken. Ebből arra következtethetünk, hogy a stimuláció hatására a proteolízis sebessége nő. A miofibrilláris fehérjékre is hatással van ez a stimuláció, ugyanis csökkenti a fehérjék stabilitását.

A porhanyósság mellett a márványozottság mértéke is befolyásolja a húsminőséget. A márványozottság az intramuszkuláris zsírtartalom mennyiségét és eloszlását jelenti. A hús ízének kialakításában nagyon fontos. Proteomikai módszerekkel több biomarker proteint is azonosítottak, melyek negatív korrelációt mutatnak a márványozottsággal, ilyenek például a triózfoszfát izomeráz és a szukcinát dehidrogenáz fehérjék.

A húsok színét a mioglobinnal és a szarmazékai határozzák meg, ezektől függ a szín telítettsége és az árnyalata is. A mioglobinnal oxidáltságától függően megkülönböztetünk dezoximioglobint (bíborvörös), oximioglobint (cseresznyepiros) és metmioglobint (szürkés barna), ezek a tárolás során változnak. Az  $L^*$  érték (világossági tényező), a hús fényvisszaverési képességével függ össze. Sertéshús esetén  $L^*$  értékhez sikerült néhány fehérje biomarkert kapcsolni. A sötétebb húsokban overexpressziót mutattak a mitokondriális fehérjék, ez magyarázza az erősebb oxidatív metabolizmust. A hemoglobin is overexpresszálódik ezekben a húsokban, ez azzal magyarázható, hogy a sötétebb húsok jobban erezettek. A világosabb húsban a glikolízis néhány enzime (enolázok) és a proteolízis indikátorai mutattak overexpressziót. Az  $a^*$  érték a húsok vörösségét határozza meg.

Marhahús esetén pozitív korrelációt áll fent az a\* érték és az aldóz reduktáz, a keratin kináz, a  $\beta$ - enoláz és a piruvát dehidrogenáz fehérjék mennyisége között. Negatív a korreláció az a\* érték és a mitokondriális akonitáz között. A színstabilitást is vizsgálták a húsok esetén. Pozitív korrelációt találtak a Hsp27, piruvát dehidrogenáz, peroxiredoxin-2 és a stressz-indukált foszfoprotein-1 között.

A húsok víztartóképesége, azt a tulajdonságot jelzi, hogy a vágás, hő vagy nyomás hatására is képes-e a hús megtartani a vizet. A post-mortem pH csökkenés és a fehérje denaturáció például csökkenti a vízkötő képességet. A húsok víztartó képességét csepegési veszteség formájában lehet mérni. A nagy csepegési veszteség súlycsökkenést okoz a nyers és a feldolgozott húsokban egyaránt. A víztartó képesség a lédúság fontos tényezője. A nagyobb csepegési veszteség marker fehérjéje a kreatin kináz enzim. Az enzim megnövekedett expressziós szintje a keratin foszfát gyorsabb degradációját okozza. Ez gyorsabb pH csökkenést és gyorsabb izom összehúzódást eredményez, ezáltal alakul ki a nagyobb csepegési veszteség. Ezzel szemben a Hsp70 (hősokk fehérje) overexpressziója a jó víztartó képességű húsok esetén detektálható.

A húsminőség kapcsán két szélsőséges esetet különböztethetünk meg. Az egyik az ún. PSE (Pale Soft Exudative) hús, mely minőség szempontjából halvány, puha, vizenyős. Ennek hátterében a gyors glikogén lebomlás áll, mely hatására magas tejsav szint alakul ki az izomban, ami savas kémhatást (pH 5,7 alatt) eredményez. Ennek a minőség romlásnak az oka az állatot ért stresszben keresendő. A proteolízis mértéke csökken ezekben a PSE húsokban, mely jelenségnek marker proteinje a troponin T, MLC1,  $\alpha$ -krisztallin fehérjék. Ezek mennyisége magasabb a csökkent intenzitású proteolízis miatt.

A másik szélsőséges húsminőség az ún. DFD (Dark, Firm, Dry), mely esetén a húsok színe sötét, konzisztencia szempontjából tömöttek és szárazak. Akkor alakul ki, ha tartós stressz után vágják le az állatokat, ilyen esetben a glikogén már korábban lebomlik, így nem jön létre tejsav, a húsok kémhatása pH 6,4 feletti. Ezek a húsok könnyen romlanak, és kevés sót vesznek fel. A DFD markerek közül a HSP70-et lehet megemlíteni, mely az alacsony csepegési veszteségű húsokban szintén markerfehérjeként használható.



## Hústermékek

A hústermékek esetén a proteomikai vizsgálatok többsége a szárazon pácolt sonkákkal („dry-cured”) foglalkozik, emellett néhány tanulmány a virslik, szalámik és kolbászok proteomját vizsgálja. Ezeknél a mintáknál a proteolízis tanulmányozása mellett a füstölés, sózás, pH változás, hő és szárítás hatását vizsgálják.

A szárazon pácolt sonkákra (Prosciutto, Bayonne) kiemelkedő minőség, hosszú érlelési idő, tipikus íz és állag jellemző. Több biokémiai reakció (proteolízis, lipolízis, glikolízis) is lejátszódik az érlelési során, míg kialakul a végleges íz. A proteolízis (fehérjék enzimátikus hasítása, autolízise) a leginkább tanulmányozott folyamat a sonkák érlelése során. Az enzimátikus autolízis folyamatában a nagyméretű miofibrilláris fehérjék (miozin, aktin, titin) a proteázok enzimátikus aktivitásának hatására kisméretű peptidekre hasadnak. Ez a folyamat nagymértékben meghatározza a sonka ízét, textúráját és illatát.

A proteolitikus enzimek 2 fő csoportba sorolhatók, ezek az endopeptidázok és az exopeptidázok. Az endopeptidázok pl.: kalpainok, katepszinek, közvetlenül felelősek a post-mortem változásokért, az intakt fehérjéket hasítják nagyobb polipeptidekre. A kalpainok az érlelés első 2 hetében aktívak, míg a katepszinek akár a 15 hónapig is.

Az exopeptidázok az endopeptidázok által létrehozott nagyobb polipeptideket hasítják kis peptidekre ill. aminosavakra. Ilyen exopeptidáz a dipeptidil-peptidáz, melynek sózás alatt csökken az aktivitása, mert a pH változás kedvezőtlenül hat a folyamatra. Az aminopeptidázok is exopeptidázok, N-terminális végen lévő aminosavak lehasítását végzik, a fehérje degradáció késői fázisában fontosak, míg a karboxipeptidázok a fehérjék C-terminálisán hasítanak.

A hústermékek proteomikai vizsgálata során gél alapú és nem gél alapú módszereket egyaránt használnak. Az egyik legegyszerűbb vizsgálati módszer a fehérjék méret szerinti elválasztására a szodium dodecil szulfát alapú egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE). A miofibrilláris fehérjék vizsgálatára is ezt használva, az aktin, miozin, tropomiozin, troponin T fehérjék proteolíziséről megállapításra került, hogy az érlelés 12. hónapját követően teljesen hidrolizálódnak. A troponin T proteolízise és a marhahús íze között pozitív korreláció áll fent, míg a lipofil aminosavak és a dipeptidek a kellemetlen keserű íz markereiként használhatóak.

A szarkoplazmatikus fehérjék vizsgálatát SDS-PAGE segítségével elvégezve, megállapítható, hogy a mioglobin az érlelés kezdetétől 17,5 hónapig kimutatható az ibériai sonkában, majd a proteolízis hatására eltűnik a gélképről, hasonlóan az ibériai sonkához a bayonne-i sonkában is megfigyelhető a mioglobin folyamatosan csökkenése az érlelés alatt.

A kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D-PAGE) segítségével már nagyobb felbontás érhető el a fehérjék vizsgálata során. Sikerült megállapítani, hogy a foszfoglicerát kináz, kreatin kináz, glikogén foszforiláz és mioglobin mennyisége csökken az érlelés során. Az enoláz, foszfoglicerát mutáz végig kimutatható az érlelés során, de ezek mennyisége is csökken. Ezzel szemben a piruvát kináz, az érlelés 11. hónapja után is konstans mennyiségben kimutatható. A 2D-PAGE módszer segítségével vizsgálták azt is, hogy az érlelés során használt só mennyiség hatással van-e a fehérje összetételre. Ez a módszer arra is alkalmas, hogy a különböző genotípusú állatok sonkájának proteom vizsgálatát (PRKAG3 és CAST gének) elvégezzék, valamint tanulmányozzák a pH hatását a proteolízisre.

A tömegspektrometria (MS) alapú módszerekkel a gél alapú módszerekhez hasonlóan, a miofibrilláris és szarkoplazmatikus fehérjék proteolízisének vizsgálata történik. A nyers hús fehérje markereiből meg lehet jósolni a sonka minőségét, ez segítséget nyújthat az élelmiszeriparban a megfelelő sonkaalapanyag kiválasztásához. SELDI-TOF MS (surface-enhanced laser desorption/ionisation time-of-flight MS) módszer segítségével megállapítható, hogy a nyers hús színe és állaga és a későbbi sonka minőségi paraméterei között korreláció áll fent, mely összefüggést közvetetten a tulajdonságokhoz kötődő biomarkerek igazolnak.

Proteomikai módszerekkel lehetőség van vizsgálni a hő hatását a húsfehérjékre. A húsfeldolgozási folyamatok közül a hő károsítja leginkább a fehérjéket. Ez a leromlás a nagy molekulású fehérjéket jobban érinti. Ilyen esetekben az izoelektromos pont és a molekulásúly nem változik, ezért a 2D-PAGE képeken a fehérje pozíciója sem változik meg.

Léteznek olyan faj-specifikus fehérjék, melyek alapján azonosítani lehet, hogy a termék milyen fajból származik. Proteomikai módszerekkel vizsgálva megállapítható, hogy ezek a faj-specifikus fehérjék, miként változnak meg a feldolgozási folyamatok során. Ennek megállapításához különböző fajokból (sertés, marha, csirke, pulyka) származó kolbászkok, virslik, szalámik fehérjéiről vannak adataink, olyan körülmények között, amikor a feldolgozási folyamatok eltérőek voltak: sós pácolás, füstölés, sütés, főzés, szárítás. A vizsgálatok eredményeként kiderült, hogy a feltételezésekkel ellentétben a legtöbb faj-

specifikus fehérje rezisztens a feldolgozási folyamatokkal szemben. A denaturálás ellenére nem degradálódtak szignifikánsan. Ennek valószínűleg az az oka, hogy a húsiparban a hőkezelés hatására (a termék belsejében legalább 72°C) a legtöbb proteáz inaktiválódik, illetve olyan folyamatok, mint a sózás (nátrium-klorid, nátrium-nitrát) és a lejátszódó pH változás is csökkenti a proteázok aktivitását.

Napjainkban az élelmiszerek hamisítása, ezen belül is a húsok és hústermékek hamisítása egyre nagyobb problémákat okoz. Szükség van olyan módszerekre melyek segítségével gyorsan és megbízhatóan azonosíthatóvá válnak az egyes összetevők. A proteomikai vizsgálatok közül számos módszer alkalmas ilyen jellegű analízisre.

Gyakori hamisítási módszer a drágább húsok olcsóbb hússal történő helyettesítése. A vásárlók félrevezetése mellett, ez azért is okoz komoly gondot, mert bizonyos vallások követői tartózkodnak egyes állatfajok húsának fogyasztásától (a hinduk nem esznek marhahúst, míg az iszlám és zsidó vallásúak sertéshúst).

A fehérjék vizsgálata alkalmazásával a kutatóknak lehetőségük van olyan, a gyakorlat számára érdeklődést kiváltó metodikát alkalmazni, mellyel a friss és a már egyszer felolvasztott húsok között különbséget tenni. Így kiszűrhetővé válnak a nem hús eredetű anyagok pl: színezékek, egyéb vegyszerek használata, melyektől frissebbnek tűnik a hús.

A metodikák oldaláról megközelítve a húsok és hústermékek előállítása során felhasznált fajok fehérje-alapú azonosításához leggyakrabban használt módszerek a kromatográfiás és elektroforetikus elválasztások, valamint az immunoassay.

## Felhasznált irodalom

- Di Luccia A., Picariello G., Cacace G., Scaloni A., Faccia M., Liuzzi V., Alviti G., Musso S. S. (2005): Proteomic analysis of water soluble and myofibrillar protein changes occurring in dry-cured hams. *Meat Science* 69. 479–491.
- Fadda S. , López C., Vignolo G. (2010): Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: Peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. *Meat science* 86. 66-79.
- Fidel T., Nollet L. M. L. (szerk.) (2013): *Proteomics in Foods: Principles and Applications. Food Microbiology and Food Safety 2.* Springer. New York, USA. 1-590.
- Joseph P., Suman S. P., Rentfrow G., Li S., Beach C. M. (2012): Proteomics of Muscle-Specific Beef Color Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60. 3196–3203.
- Mora L., Fraser P.D., Toldra, F. (2012): Proteolysis follow-up in dry-cured meat products through proteomic approaches. *Food Research International* 54. 1. 1292-1297.
- Paredia G., Raboni S., Bendixen E., de Almeida A., Mozzarelli A. (2012): “Muscle to meat” molecular events and technological transformations: The proteomics insight. *Journal of Proteomics* 75. 4275- 4289
- Sayd T., Morzel M., Chambon C., Franck M., Figwer P., Larzul C., Leroy P., Monin G., Chearel P., Laville E. (2006) :Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig semimembranosus muscle: implications on meat color development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54. 7. 2732–2737.

## A tojás proteomikája

A tojás táplálkozás-élettani szempontból kiemelkedő jelentőségű, emellett az élelmiszeriparban is gyakran használják gélképző, habképző és emulzifikáló tulajdonságai miatt. Amellett, hogy gazdag vitaminforrás (A, B1, B2, D, E, K), a benne lévő karotinoidok (zeaxantin, lutein) időskorban az érzékszervi működések fenntartásában fontos szerepet játszhatnak. Zsírsvösszetételére általában a 0,6-os telített/telítetlen zsírsavarány jellemző, mely egybevág az egészséges élelmiszereknél elvárható tartományba. Telítetlen zsírsavak közül az olajsavat, míg a telítettek közül a palmitinsavat tartalmazza a legnagyobb mennyiségben.

A tojásban található legfontosabb ásványi anyagok közé tartozik a kálium, nátrium, kén, foszfor, kalcium és nyomokban vasat is tartalmaz.

Értékes fehérjéiben megtalálható több esszenciális aminosav is, melyek nélkülözhetetlenek építőegységek, hiszen az emberi szervezet nem vagy csak kis mennyiségben képes ezen aminosavak előállítására. Így a tojás fehérjéi az ember számára teljes-biológiai értékű fehérjéknek tekinthetők.

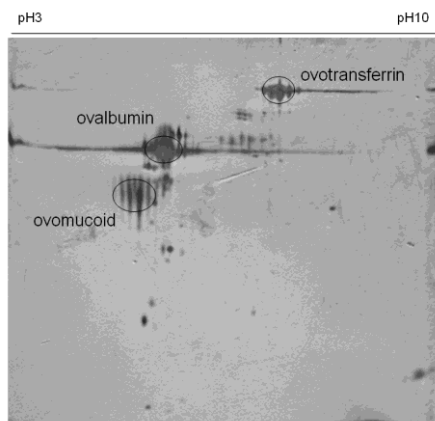
Magyarországon az egy évre eső tojásfogyasztás 2002 és 2009 között csökkenő tendenciát mutatott. Míg 2002-ben 301db volt az egy főre eső fogyasztás, addig 2009-ben ez 247db/fő-re csökkent. Mindezek ellenére a magyarországi tojásfogyasztás még így is jóval az Európai Unió átlag érték (220 db/fő/év) fölött van.

## Tojásfehérje

A tojásfehérje az élelmiszeriparban olcsó és jó minőségű fehérje forrásnak számít, a gyógyszeripari és orvosbiológiai felhasználása is jelentős.

A tojásfehérje feladata az embrió táplálása és stabilizálása valamint a mikrobák elleni védekezés. A protein frakció a tojásfehérje 11%-át teszi ki, emellett 80-88%-ban vizet, 0,9%-ban szénhidrátot és 0,7%-ban hamut tartalmaz. A tojás esetében is, mint a legtöbb állati szövetnél, néhány nagy gyakoriságú fehérje jelenti a teljes fehérjetartalom nagy részét, tojásnál a 77%-át. Ezt három tojásfehérje jelenti, 54%-ban ovalbumin, mellette 12% ovotranszferrin és 11% ovomucoid. Ezek a fehérjék jelentős mértékben megnehezítik a

proteomikai vizsgálatokat, mivel a nagy számban előforduló fehérjék a géleképeken elfedhetik a számunkra nagyobb jelentőséggel bíró kisebb gyakoriságú proteineket. A kis gyakoriságú fehérjék közé tartoznak: ovoglobulin G2 (4%), ovoglobulin G3 (4%), ovomucin (3,5%), lizozim (3,4%), ovoinhibitor (1,5%), ovoglikoprotein (1%), flavoprotein (0,8%), ovomacroglobulin (0,5%), avidin (0,5%), cystatin (0,05%). A tojásfehérje proteinjei széles molekulásúly (7 kDa - 8000 kDa) és pI (pH 3,9 – pH 10,7) tartományban mozognak.

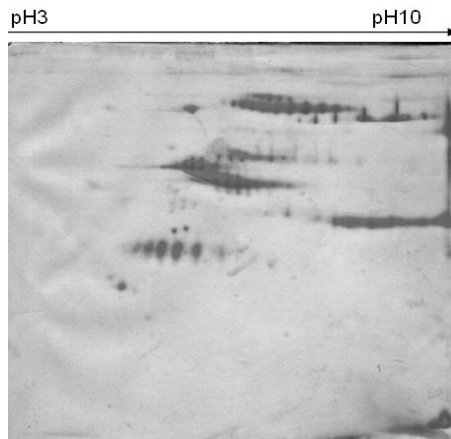


8. ábra: Tojásfehérje kétdimenziós poliakrilamid gélképe (Saját forrás)

## Tojássárgája

Az élelmiszer- és kozmetikai iparban is elterjedt a használata (kötőanyagként, antioxidánsként, emulgeálószerként).

A tojássárgája legfontosabb feladata az embrió táplálása, emellett immunológiai funkcióval is rendelkezik, mivel anyai antitesteket tartalmaz, melyek az embrió védelmére szolgálnak. A tojássárgája fehérjetartalma jellemzően 13-17% közötti. A vitellogenin nevű fehérje a foszfo- és lipoproteinek prekursora (a tojássárgája fehérjéinek döntő többségét adják) a tojássárgájában. A fehérjék megoszlása azkövetkező: 68% low-density lipoprotein (LDL), 16% high-low density lipoprotein (HDL), 4% foszvitin, melyek a globuláris fehérje frakció részét képezik, míg a livetin (10%) a vízdékony frakcióba tartozik. A fehérjék mellett nagy arányban tartalmaz vizet (48%) és lipideket (33%) is.



9. ábra: Tojássárgája kétdimenziós poliakrilamid gélképe (Saját forrás)

## Kombinatorikus peptid ligand könyvtárak

Tojásminták esetén legnagyobb kihívás a nagy gyakoriságú fehérjék (ovalbumin, ovotranszferin) csökkentése, ill. a kis számban előforduló fehérjék feldúsítása. Erre alkalmas lehet a kombinatorikus peptid ligand könyvtárak használata. A kombinatorikus könyvtárakat nagyszámú, kismolekulájú vegyületekből állítják elő. A proteomikában általában hexapeptid könyvtárakat alkalmaznak. Ezek hat aminosavból álló oligopeptid ligandok különböző aminosav szekvenciákkal (nagy diverzitás), melyeket attól függően generálnak, hogy a kis vagy a nagy gyakoriságú fehérjék megkötését tűzik ki célul. 2005-ben az ún. gyöngy technológia forradalmasította a proteomikában a kombinatorikus peptid ligand könyvtárak használatát. Gyöngyök felszínéhez rögzítették a hexapeptid ligandokat, melyekhez a mintában lévő fehérjék specifikusan tudnak kötődni (adszorpcióval). Háromféle kombinatorikus peptid ligand könyvtárat használnak a gyakorlatban: hexapeptidek primer aminnal terminálva (kereskedelmi forgalomban: ProteoMiner), hexapeptidek karboxil csoporttal, hexapeptidek harmadlagos amin csoporttal.

Mind a tojásfehérje, mind a tojássárgája minták esetén szép eredmények érhetőek el a peptid ligand könyvtárak használatával. Tojásfehérje minták esetén ezzel a módszerrel megduplázható az azonosított fehérjék száma. Tojássárgája esetében 70%-kal emelhető a fehérje találatok száma.

## Tojáshéj

A tojáshéj fő funkciója az embrió védelme a mikrobiális és a fizikai környezeti hatásokkal szemben. Emellett ásványi anyagokat (elsősorban kalciumot) biztosít a növekvő embrió számára, valamint szabályozza a víz és gázcserét. A tojáshéj legkülső rétege a kutikula, ez egy vékony filmréteg, mely lezárja a pórusokat, ezáltal véd a mikrobák ellen. A kutikulától befelé haladva a következő réteg a kalcit tartalmú mészhéj, majd ezt követi a dupla membránrétegből álló héjhártya. A kutikulának 85%-a fehérje, melyből eddig 47 különböző fehérjét sikerült azonosítani (nLC-ESI-MS/MS módszerrel), melyek közül több antibakteriális és antifungális aktivitással is rendelkezik. A mészhéjban sok tojásfehérje protein megtalálható, de vannak csak mészhéj specifikus fehérjék is, melyek az elmeszesedést szabályozzák. A héjhártya kettős membránrétege megakadályozza, hogy az elmeszesedés befelé is terjedjen, az itt található fehérjék nagyrészt kollagének, proteoglikánok, ill. lizozim és ovotranszferin, az utóbbi kettő a tojás fehérjében fordul elő nagy mennyiségben.

## Tárolás

Hosszabb tárolás során a tojásfehérje viszkozitása csökken (elvékonyodik), ezáltal kevésbé lesz ellenálló a mikrobiális fertőzésekkel szemben. 2D PAGE segítségével megállapították, hogy az ovalbumin, ovotranszferrin, clusterin, ovoinhibitor és prosztaglandin D2 szintáz fehérjék expressziója változik tárolás során. A clusterin volt az a fehérje, melynek mennyisége folyamatosan változik a tárolás során. A clusterin és ovalbumin degradációja nagy valószínűséggel a tojásban történő proteolízis és pH növekedés következménye, mely végső soron a fehérje elvékonyodásához vezet. A pH növekedés a tárolás során a fehérjék feltekeredését akadályozza. A clusterin megnövekedett expressziója is ehhez a folyamathoz köthető, mivel ez a fehérje hozzákapcsolódik a nem teljesen feltekeredett fehérjékhez, így stabilizálja azokat.



## Allergia

Magyarországon a lakosság közel 1%-a allergiás a tojás valamely összetevőjére. Leggyakoribb allergének a tojásfehérjében található az ovomucoid és az ovalbumin, de a tojássárgájában is előfordulnak allergén fehérjék ( $\alpha$ -livetin). Általában csecsemő- vagy kisgyermekkorban jelentkeznek a tünetek, majd az immunrendszer megerősödésével gyakran el is tűnnek. Ritkábban ugyan, de az is előfordul, hogy felnőtt korban alakul ki az allergia. A leghatékonyabb kezelés a tojás teljesmértékű elhagyása az étrendből. Ez gyakran nehézséget okoz, hiszen nagyon sok élelmiszerben megtalálható valamilyen tojás-származék. Ezért nagyon szigorú jelölésszabályozás szükséges az élelmiszereken, melyek egyértelműen tudatják a vásárlókkal, hogy mit tartalmaz az adott termék.

Tömegspektrometrián alapuló módszerekkel már nagyon alacsony koncentrációban is kimutathatóak a tojás fehérjéi különböző élelmiszerekből (majonéz, keksz, kenyér, bor).

## Felhasznált irodalom

- Boschetti E., Righetti P. G. (2008): The ProteoMiner in the proteomic arena: A non-depleting tool for discovering low-abundance species. *Journal of Proteomics* 71. 255-264.
- Farinazzo A., Restuccia A., Bachi A., Guerrier L., Fortis F., Boschetti E., Fasoli E., Citterio A., Righetti P. G. (2009): Chicken egg yolk cytoplasmic proteome, mined via combinatorial peptide ligand libraries. *Journal of Chromatography A* 1216. 1241–1252.
- Fidel T., Nollet L. M. L. (szerk.) (2013): *Proteomics in Foods: Principles and Applications. Food Microbiology and Food Safety 2*. Springer. New York, USA. 1-590.
- Omana D. A., Liang Y., Kav N.N., Wu J. (2010): Proteomic analysis of egg white proteins during storage. *Proteomics* 11. 144–153.
- Qiu N., Ma M., Cai Z., Jin Y., Huang X., Huang Q., Sun S. (2012): Proteomic analysis of egg white proteins during the early phase of embryonic development. *Journal of Proteomics* 75. 1895-1905.
- Raikos V, Hansen R., Campbell L., Euston S. R.(2006): Separation and identification of hen egg protein isoforms using SDS–PAGE and 2D gel electrophoresis with MALDI-TOF mass spectrometry. *Food Chemistry* 99. 702–710.

## Tej és tejtermékek proteomikája

A tej természetes táplálék minden újszülött számára. Felnőtteknek is kiváló, tápanyagokban gazdag, könnyen emészthető élelemforrás. Kedvező élettani hatásai miatt napi fogyasztása javasolt. Immunerősítőként, betegségmegelőzésben (csonttritkulás, fogszuvasodás, magas vérnyomás) bizonyítottan hatásos. Sokoldalúan használható élelmiszerként: tej, író, vaj, joghurt, tejföl, kefir, sajt.

Magyarország évi tejfogyasztása 67 liter/fő, ez az Európai Unió átlaghoz (60,7 liter/fő) és a világszámhoz (32,7 liter/fő) képest magasabb, de meg sem közelíti az egyes dietetikusok által javasolt 180 liter/fő évi fogyasztást. Magyarország éves tej és tejtermék fogyasztása összesen 156 kg/fő.

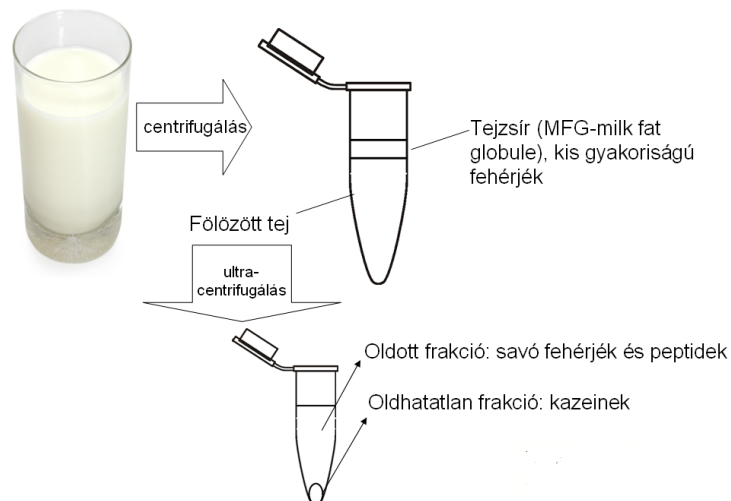
### A tej összetevői

A tej összetételét tekintve 88% vízből és 12% szárazanyagból áll, mely utóbbi néhány százalékkal magasabb ún. koncentrált tejet termelő fajták esetében. A benne található tejcukor (laktóz) az ásványi anyagok felszívódását segíti. A tejben lévő zsír többnyire trigliceridekből áll, a tejszír könnyen emészthető lipid, az n-6 és n-3 zsírsav aránya tág intervallumban mozog, melyet főként a takarmányozás befolyásol, legeltetett állományok esetében az omega-6 és omega-3 zsírsavaránya az ideális, szűk érték felé tolódik el (2,5:1). Az ásványi anyagok közül főleg káliumot, kalciumot, nátriumot, foszfort és szelént tartalmaz. Vitaminok közül az A, D, B2, a B6 és a B12 fordul elő nagyobb mennyiségben a tejben. A legfontosabb tejfehérjék:  $\alpha$ 1-kazein,  $\alpha$ 2-kazein,  $\beta$ -kazein, k-kazein,  $\beta$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin és immunoglobulinok. A sokféle poszttranszlációs módosítás teszi a tejproteomot különösen összetetté.

## A tej frakciói

A kombinatórikus peptid ligand könyvtárak alkalmazása a tej protomjának vizsgálatához is számos esetben indokolt lehet, mivel a tejfehérjék között legnagyobb részarányban jelenlévő kazein gyakoriságának lecsökkentése a mintában segíti az alacsony expressziós szintű fehérjék mennyiségi meghatározását.

A tej centrifugáláson alapuló frakcionálása a legegyszerűbb laboratóriumi megoldás. Az alacsony g-n végzett centrifugálással a tejsír, benne a tejsírcsepp membránfehérjék, és a fölözött tej alkot külön fázist. A további, nagy fordulatszámú ultracentrifugálás az oldott és az oldhatatlan frakciókat választja el, mely lépés a leghatékonyabb alacsony költségű eljárás a kezeinek eliminálására.



10. ábra: a tej frakcionálása centrifugálással

## Tejsírcsepp membrán

A tejsírcsepek membránja (MFGM - milk fat globule membrane) valójában a tőgy epithelsejt membránját jelenti, melyhez a sejt citoplazmájából is kapcsolódnak fehérjék. Ezen membránok vizsgálatával invazív beavatkozás nélkül kaphatunk információt a tőgy patofiziológiás állapotáról a laktáció ideje alatt. Általában kis gyakoriságú fehérjéket találunk itt, melyek vizsgálatához prefrakcionáció szükséges, abból a célból, hogy feldúsuljanak a

közegben. Fehérjei nehezen vihetők oldatba, a sok lipid és a fehérjék hidrofobitása miatt. Centrifugálást követően a legfelső zsírrétegből izolálhatóak zsírtalanítást követően, melyet metanol és kloroform segítségével végezhetünk el. SDS-PAGE segítségével hozzávetőlegesen mintegy 50 fehérjét választottak el tehéntejből származó MFGM mintákból. Fontosabb fehérjék: butirofilin, lactadherin, adipofilin, xanthin, annexin, acil-KoA szintáz, lanoszterol szintáz. Szerepük a lipid transzport, szintézis és szekréció.



11. ábra: MFG frakció kétdimenziós poliakrilamid gélképe (Saját forrás)

## MFGM fehérjék és a betegség megelőzés

Az elmúlt években számos tanulmány látott napvilágot, mely az MFGM fehérjék egészségügyi szempontból jótékony hatásával foglalkozik. Mellrák esetén sikerült megállapítani, hogy az ún. fatty acid binding (FAB) fehérje (mely az MFGM-ben megtalálható) gátolja a ráksejtek növekedését.

A BRCA1 és BRCA2 fehérjék, melyek a humán és a tehéntej MFGM-ből is izolálhatóak, a DNS javító folyamatokban játszanak szerepet. Az egyik doménjükben bekövetkező mutáció a nőknél hajlamosító tényezőt jelent a mell- és petefészek rákra. Bizonyos tanulmányok lehetséges prevencióként említik az MFGM táplálék-kiegészítőként történő alkalmazását.

Az MFGM fehérjék koleszterinszint csökkentő hatása is ismert. Humán és patkány kísérletekben is bizonyították, hogy a vérérum koleszterin szintje csökken MFGM bevitel hatására, mely a bélben bekövetkező koleszterin megkötődéssel magyarázható.

A *Helicobacter pylori* fertőzés gátlása is lehetséges az MFGM glikoproteinek által. A *H. pylori* fertőzés több gyomorfertőzéssel és a gyomorrákkal is összefüggésbe hozható gyomorfertőzések csökkentése.

A fentiekén kívül még megemlíthetjük az MFGM fehérjék más pozitív hatásait is: szív koszorúér megbetegedés esélyének csökkentése, baktericidhatás, szklerózis multiplex tünetek enyhítése, autoimmun encephalomyelitisz gátlása.

## **Tejsavó**

A tejsavó mind humán táplálkozás, mind állati takarmányozás esetén kivételes tápértékkel rendelkezik, számos esszenciális aminosav forrása. Funkcionális élelmiszerként is megállja a helyét, hiszen számos biológiai folyamat résztvevője. A proteomikai módszerek lehetőséget nyújtanak arra, hogy megismerjük a tejsavó fehérje összetételét és ezáltal megértsük a fiziológiai folyamatokat, melyekbe bekapcsolódnak. Két nagy gyakoriságú fehérjét azonosítottak a tejsavóban:  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, melyek a fajok között nagy változatosságot mutatnak. A savóban lévő fehérjék közül számos lát el antimikrobiális feladatot. Ezek a proteinek egyrészt a laktáló emlő védelmét szolgálják, másrészt az újszülöttet védik, míg teljesen ki nem alakul az immunrendszer által biztosított védeltsége. Ebbe a csoportba tartoznak az immunglobulinok (IgA, IgM, IgG), melyek a tejsavó legtöbb tanulmányozott fehérjéi. Az IgA és az IgM mennyisége a laktáció korai fázisában magasabb, míg az IgG a laktáció későbbi szakaszában termelődik nagyobb mértékben. Ez azzal magyarázható, hogy a tejtermelés kezdeti szakaszában a patogének elölése (melyért az IgA felelős), míg a későbbi szakaszban az újszülött saját immunitásának kialakítása a cél (anyai IgG molekulák segítségével).

A savóban nagyobb mennyiségben található még laktoferrin, laktoperoxidáz, melyek szintén antimikrobiális fehérjék.

## **Kazeinek**

A tehéntejben található fehérjék legnagyobb részét, hozzávetőlegesen 80%-át a kazeinek teszik ki. Foszfoproteinek, melyek a sokféle poszt-transzlációs módosulásnak köszönhetően,

nagyon különböző foszforilációs mintázatokkal rendelkeznek. A legnagyobb hasonlóság a kérődzők kazein aminosav szekvenciájában figyelhető meg. A kétdimenziós gélelektroforézis alkalmas metodika a különböző kazein típusok elkülönítésére, így tehéntejből 10 különböző kappa-kazeint szeparáltak, melyek az izoelektromos pontjukban különböztek egymástól.

A kazeinek a sajtkészítésben fontos szerepet játszanak, mivel a sajtkészítés során kalcium-foszfáttal micellákat képeznek.

## **A posztranszlációs módosulatok (PTM) vizsgálata**

A tejben található fehérjék termelődése, vagyis a transzlációs fázis után bekövetkező módosulások miatt olyan komplex a tej proteomja. A posztranszlációs módosulások során a fehérjéket felépítő aminosav oldalláncok kémiai tulajdonságai megváltoznak. Többféle ilyen módosítás ismert: foszforiláció, hidroxiláció, glikoziláció, szulfonáció, proteolízis, stb. Proteomikai módszerekkel a tejfehérjék a foszforilációjának, glikozilációjának és proteolízisének tanulmányozása folyik. Elsődlegesen, de nem kizárólagosan a kazeinek vizsgálata során tanulmányozták részletesebben a posztranszlációs módosításokat.

A foszforilációs folyamatot a protein kinázok végzik és foszfátcsoport képesek kapcsolni a fehérjék szerin, treonin vagy tirozin oldalláncjaihoz.

A glikoziláció során szacharidok kapcsolódnak az aszparagin, szerin, treonin és triptofán aminosavakhoz. Laktozilációnak nevezzük a glikoziláció speciális esetét amikor lizinhez laktóz kapcsolódik hő hatására. A tejtermékek esetén ennek a módosulásnak nagy jelentősége van. A kappa-kazeinek kapcsán fentebb említett 10 különböző izoforma is a glikozilációnak köszönhető, melyeket 2D-PAGE+MALDI módszerrel azonosítottak.

A proteolízis irreverzibilis posztranszlációs módosulás, proteázok végzik, peptidkötésnél hasítanak. A legfontosabb proteázok közé a plasmin és cathepsin tartoznak. Aktivitásuk nő a szomatikus sejtszám növekedéssel, így kapcsolatba hozhatók a masztitisszel (tőgygyulladás). A proteolízis a fontos meghatározója a tejtermékek textúrájának és ízének. Ebből következik, hogy például a különböző keménységű és érlelési idejű sajtok különböző 2D mintázatot mutatnak.

## Hamisítások

A tej és tejtermékekkel kapcsolatos hamisítások is komoly problémát jelentenek az élelmiszeriparban. Ennek hátterében az az ökonómiai ok áll, hogy a magas minőséget és pénzben kifejezett értéket képviselő termékekhez olcsó alapanyagokat kevernek. Ilyen hamisítás lehet, amikor bivalytejhez, kecsketejhez, illetve juhtejhez tehéntejet kevernek és az ebből készült sajtot úgy értékesítik, hogy a tehéntej jelenlétét nem közlik. Ezeket a keverékeket nehéz beazonosítani. Manapság jellemzően a DNS alapú eredetvizsgálat, úgy mint fajazonosítás az elterjedt, ennek ellenére a proteomikai módszerek (elsősorban tömegspektrometria alapú) is alkalmasak a tejből és tejtermékekből a felhasznált fajok azonosítására. Bizonyos fehérjék markerként szolgálnak, ezek a markerek jellemzőek egy adott fajra, így jelenlétük bizonyíthatja a faj jelenlétét a vizsgált termékben.

Korábbi vizsgálatok során a HPLC/ESI-MS (High Performance Liquid Chromatography – electrospray mass spectrometry) módszerrel tehéntejet mutattak ki kecsketejben, úgy, hogy a beta-laktoglobulin fehérjét használták markerként. A kimutatási határ 5%-os volt, ami azt jelenti, hogy 5%-nyi tehéntej bekeverés már kimutatható. MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry) módszerrel bivaly mozzarellaiban tehén-, illetve juhtej jelenlétét is sikerült kimutatni. Ezen módszernél is megfelelő marker a beta-laktoglobulin, amely mellett az alfa-laktalbumin is alkalmazható.

Kromatográfiai módszerekkel a különböző fajok termékeinek azonosítása mellett a tejpor hozzáadást is ki lehet mutatni.

## Sajtok

A sajtok a legkedveltebb tejtermékek, melyeknek számos változata ismert, a tej eredetétől, a zsírtartalomtól, a feldolgozás módjától, az érlelés idejétől és számos más tényezőtől függően.

A proteomikai módszerek segítségével vizsgálhatjuk a proteolízis mértékét (proteolitikus enzimek expressziója) és fajtáját, meghatározhatjuk a sajtok eredetét (hamisítások), a tejfehérje polimorfizmusok és a sajtok minősége közti összefüggéseket.

A proteolízis a legfontosabb folyamat mely a sajtok készítése és érlelése során lejátszódik. Végül soron a proteolízis során képződő peptidek, szabad aminosavak és ezek bomlástermékei alakítják ki a sajtok ízét és illatát. Ezekből a polipeptid és peptid



fragmensekből megállapítható a sajtok érlelési ideje és eredete. A proteolízist végző proteázok (fehérje bontó enzimek) származhatnak magából a tejből (endogén enzimek), az oltóanyagból és lehetnek mikrobiális enzimek is, melyek a fermentációért felelős baktériumokból kerülnek a sajtba. Az elsődleges proteolízisért az endogén enzimek és az oltóanyag enzimek felelősek, e folyamat során nagy oldhatatlan peptidek jönnek létre. SDS-PAGE segítségével megállapították, hogy ezek mérete 6-200 kDa között változhat. A másodlagos proteolízisben az endogén és az oltóanyagból származó enzimek mellett a mikrobiális enzimek is részt vesznek. Ennek a folyamatnak a termékei a kisméretű víz-oldékony peptidek. Ezeket a peptideket általában HPLC-MS módszerrel azonosítják.

A sajtok készítése során használt oltóanyagot, fiatal állatok (borjú, bárány) gyomrából nyerik. Ez az anyag a tej alvadásáért felelős. Két fontos enzimet tartalmaz, ezek a kimozin és a pepszin, melyek proteázok. A kimozin a kappa-kazeint bontja a 105-ös pozícióban lévő fenilalanin és 106-os pozícióban lévő methionin között vág. Para-kappa-kazein és makropeptidek képződnek, a para-kappa-kazein nem képes stabilizálni a micellákat és kicsapódik. A kimozin helyettesíthető: mikroorganizmusokban termeltetett kimozinnal vagy gombákban lévő proteinázokkal.

## **Baktériumok a tejtermékek készítése során**

A fermentált (erjesztett) élelmiszerekben lévő baktérium törzsek enzimaktivitása felelős az élelmiszer végső textúrájáért és ízéért. Proteomikai módszerekkel lehetőség nyílik metabolizmusuk in situ tanulmányozására a tejtermékekben. Megvizsgálhatjuk a tárolás ill. a különböző feldolgozási folyamatok (hűtés, melegítés, extrém pH, magas nyomás) során hogyan változik a baktérium törzsek proteom összetétele.

A tejtermékek előállítása során használnak ún. starter baktériumokat, melyek laktózból tejsavat állítanak elő, így a közeg savasodik, ez a patogének ellen hatásos védekezés.

Sajtok készítése során használt legfontosabb baktérium törzsek: Lactococci (*L. lactis*, *L. cremoris*, *L. diacetylactis*), Lactobacilli (*L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. casei*), *Streptococcus salivarius*. Az érést segítő baktérium törzsek a *Propionibacterium freudenreichii*, *Brevibacterium linens*.

Joghurtok készítése során használt legfontosabb baktérium törzsek a *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* és a *Streptococcus thermophilus*.

## Felhasznált irodalom

- Fidel T., Nollet L. M. L. (szerk.) (2013): Proteomics in Foods: Principles and Applications. Food Microbiology and Food Safety 2. Springer. New York, USA. 1-590.
- Manso M. A., Léonil J., Jan G., Gagnaire V. (2005): Application of proteomics to the characterisation of milk and dairy products. International Dairy Journal 15. 845-855.
- O'Donnella R., Holland J. V., Deeth H. C., Alewood P. (2004): Milk proteomics. International Dairy Journal 14. 1013–1023.
- Reinhardt T. A., Lippolis J. D. (2006): Bovine Milk Fat Globule Membrane Proteome. Journal of Dairy Research 73. 406–416.
- Spitsberg V. L. (2005): Invited Review: Bovine Milk Fat Globule Membrane as a Potential Nutraceutical. Journal of Dairy Science 88. 2289-2294.
- Vanderghem C., Blecker C., Danthine S., Deroanne C., Haubruge E., Guillonnet F., De Pauw E., Francis F. (2008): Proteome analysis of the bovine milk fat globule: Enhancement of membrane purification. International Dairy Journal 18. 885–893.

## A sör proteomikája

A sör a legrégebbi és legszélesebb körben fogyasztott alkoholos ital, már ie. 7000 évvel is készítették. Akkoriban még alacsonyabb volt az alkoholtartalma, de fehérjetartalma magasabb, sűrűbb és édesebb volt a mai söröknél. Szerepet játszott a vallási rituálékban, tápanyagforrásként szolgált, valamint betegségek kezelésére is alkalmazták.

Manapság a csehek a legnagyobb sörfogyasztók, évente átlagosan egy fő 144 liter sört fogyaszt. Magyarországon átlagosan 70 liter/fő az éves fogyasztás. Az Európai Unióban becslések szerint 40000 különböző sör létezik és 130 sörfajta.

Számos kedvező élettani hatása ismert, melyek csak mérsékelt fogyasztás esetén érvényesülnek. Ilyenek a vízhajtó képessége és a vesekő képződés megelőzése, nyugtató és altató hatása, magas vitamintartalma (B1, B2, B3, B6, B9), magas antioxidáns és jelentős ásványi anyag tartalma (Cu, Fe, Zn, Mg). Mindezek mellett csökkenti az LDL koleszterin szintet és stimulálja az immunrendszert.

## A sör fehérjéi

1 liter sör 500 mg fehérjét tartalmaz, mely proteinek molekulásúly az 5-100 kDa tartományba esik. A legtöbb fehérje a sörfőzés során használt gabonából származik. Ilyen például a hordein, mely egy nagy gyakoriságú (40-50%-a a teljes fehérje mennyiségnek) árpából származó fehérje vagy a lipid transzfer fehérje, mely szintén árpa eredetű. Egyéb sörben jelenlévő fehérjék a globulinok, albuminok, amiláz inhibitorok, chaperonok, lipid kötő fehérjék, enzimek. A sörgyártás során ezek a fehérjék különböző módosításokon eshetnek át (különösen a malátázás és a cefrőzés során), ilyen módosítások a hidrolízis, glikoziláció, glikáció. A fehérjék ezen módosításai hatással vannak a későbbi minőségi tulajdonságokra, mint például a sör színe, íze, zavarossága, habképződése és a stabilitás.

A sörben található fontosabb fehérjék ismertetése és hatásaik a sör minőségi jellemzőire:

#### Lipid transzfer protein 1 (LTP1)

A lipid transzfer protein 1 az egyik nagy gyakoriságú fehérje a sörben, mely az árpa aleuron rétegéből származik. Az LTP1 teljes fehérje-mennyiségnek 1%-át teszi ki. A natív LTP1-nek nincs habképző potenciálja, de hő hatására irreverzibilisen denaturálódik és így már kitűnő habképző. A hab stabilitásával azonban nincs összefüggésben a sör LTP1 tartalmával. A túlzott habzás (a palackok felrázása nélkül), ami az üvegek kinyitásakor néha megfigyelhető, súlyos minőségi probléma, mely háttérében szintén a lipid transzfer fehérjék állnak. Ennek az a magyarázata, hogy bizonyos árpát károsító gombafertőzések hatására az LTP1 expressziója jelentősen megnövekszik, ezáltal sokkal több LTP1 fehérje lesz a sörben, melyek denaturálódást követően erős habzást eredményeznek. Ezt az expressziós változást 2D-immunoblot technikával igazolták, LTP1 antitesteket használva bizonyították a fertőzött árpa megnövekedett LTP1 termelése.

#### Z Protein

A Z protein szintén nagy gyakoriságú fehérje, melyet a magas felületi feszültség és rugalmasság jellemez. Ezeknek a tulajdonságoknak köszönhetően fontos szerepet játszik a hab stabilitásban. 3 izoformája ismert: Z4, Z7, Zx. A proteomikai tanulmányok elsősorban a Z fehérjék módosulásait vizsgálják, melyek a malátázás során következnek be és összefüggésbe hozzák a hab stabilitásával.

#### Árpa alfa-amiláz inhibitor-1 dimer

Számos amiláz inhibitor azonosítható a sörből. A hab képződését pozitívan befolyásolják, de zavarosságot is okoznak. Kelt tészták esetén is az alfa-amiláz inhibitor-1 dimer fehérje felelős a gázbuborékok stabilizálásáért.

#### Hordeinek

A hordeinek a legnagyobb gyakoriságú sörfehérjék, ez a csoport teszi ki 40-50%-át a teljes fehérjemennyiségnek. Az elektroforetikus mobilitásuk alapján négy csoportba sorolhatjuk a hordeineket: B-, C-, D-,  $\gamma$ - csoport. A malátázás és a cefrézés során a maláta proteázok aminosavakra és kis polipeptidekre bontják a hordeineket. A habképződésben fontos szerepük van és a hab frakcióban koncentráltan vannak jelen.

Élesztőből származó fehérjék

Kétdimenziós gélelektroforézishez kapcsolt tömegspektrométerrel 40 féle élesztő eredetű fehérjét azonosítottak a sörből. Ilyen például az élesztő thioredoxin, mely a habzásra negatívan hat, vagy az élesztő proteináz A, mely szintén negatívan hat a habzásra azáltal, hogy a lipid transzfer protein 1-et bontja. Az enoláz és triózfoszfát izomeráz, melyek az élesztő citoplazmából származnak, az élesztő sejtek károsodását követően kerülnek a sörbe. A sörfőzés során használt élesztők számos környezeti stressznek vannak kitéve: alacsony pH, magas etanol koncentráció, magas ozmotikus nyomás, kevés tápanyag és szélsőséges hőmérsékleti viszonyok. Ezek mind hatással vannak a habképződésre és a sör ízére. A proteomikai módszerek segítségével ezek a fehérjék markerként használhatók az élesztősejtek kondíciójának monitorozására

## **Allergének**

A sörök is tartalmaznak allergén fehérjéket, ilyen a serpin-Z4 és a lipid transzfer protein 1, melyek a leginkább allergénhatásúak. Csalánkiütést és anafilaxiát okozhatnak. Mivel a sörök jelentős mennyiségű gabonafehérjét tartalmaznak, ezért a glutén érzékenyek számára kerülendő a fogyasztásuk. A búzából származó glutenin és gliadin fehérjék, az árpa eredetű hordeinek, a rozs secalin fehérjéi és a zab aveninjei okozzák a sör esetén az allergiás reakciót a glutén érzékenyeknél.

## **Kombinatorikus peptid ligand könyvtárak**

A különböző italok esetén a kombinatorikus peptid ligand könyvtárakat használják leggyakrabban a nagy gyakoriságú fehérjék csökkentésére, illetve a kis gyakoriságú fehérjék feldúsítására.

Egy tanulmány során egy kereskedelmi forgalomban kapható gyömbér ital fehérje összetételét vizsgálták úgy, hogy az alacsony expressziós szintet mutató proteineket keresték. A kis gyakoriságú fehérjék relatív dúsítását ProteoMiner segítségével végezték el. A projekt során 5

szőlő és 1 alma fehérjét sikerült azonosítani az italból, de gyömbérfehérjét egyet sem. A szőlő és alma fehérje jelenléte nem meglepő, mert az italon feltüntették, hogy szőlő és alma levét is tartalmaz. Azonban annak ellenére, hogy feltüntették az összetevők között a gyömbér kivonatot nem detektálták a gyömbér fehérjéinek egyikét sem.

Ezek a vizsgálatok felhívhatják a figyelmet a fogyasztóvédelmi műszeres laboratóriumi termékellenőrzések lehetőségeire, annak eszköztárára, illetve ezek fontosságára.

A szakirodalomban közöltek szerint a kombinatorikus peptid ligand könyvtárat a kóla, mandulatej mandulatej szirup vizsgálatánál is használták. Alkoholtartalmú italok esetében a peptid ligand könyvtár alkalmazása aperitifek (olasz cynar és braulio), borok és pezsgők elemzésénél történt meg eddig.

## **Felhasznált irodalom**

Colgrave M. L., Goswami H., Howitt C. A., Tanner G. J. (2013): Proteomics as a tool to understand the complexity of beer. *Food Research International* 54. 1001-1012.

Fasoli E., D'Amato A., Citterio A., Righetti P. G. (2012): Ginger Rogers? No, Ginger Ale and its invisible proteome. *Journal of Proteomics* 75. 1960-1965.

Fasoli E., D'Amato A., Kravchuk A. V., Citterio A., Righetti P. G (2012): In-depth proteomic analysis of non-alcoholic beverages with peptide ligand libraries. I: Almond milk and orgeat syrup. *Journal of Proteomics* 74. 1080-1090.

Iimure T., Sato K. (2013): Beer proteomics analysis for beer quality control and malting barley breeding. *Food Research International* 54. 1013-1020.

## A bor proteomikája

A szőlőtermesztés és a borkészítés több ezer éves múltra tekint vissza. Az egyes országokban az egy főre jutó éves borfogyasztás nagyon széles tartományon belül mozog. Hazánkban átlagosan 23-25 liter bort fogyasztunk évente, míg Franciaországban ez az érték 54 liter, Olaszországban 49 liter, a világátlag pedig 4 literre tehető.

A boroknak számos kedvező élettani hatása ismert, melyek természetesen csak mérsékelt fogyasztás esetén érvényesülnek. A benne található ásványi anyagok közül a magnézium az izomműködésre, a mangán az idegrendszer- és a pajzsmirigyműködésre van jótékony hatással. A kalcium a csontritkulás ellen, míg a kálium szívritmuszavar ellen hatásos. A vas a vérképzést, a borkő, a citromsav és a borostyánkősav az emésztést segíti. Vitaminok közül a C- és B-vitamin található meg nagyobb mennyiségben a borokban. Antioxidáns tartalma is jelentős, mely a koleszterinszint csökkentésében játszhat szerepet. A fenolok a vérrögök kialakulását gátolják és a nitrogén-oxid termelést fokozzák, ezáltal értágító hatásuk van. Napi 1-2 dl vörösbor fogyasztása 50%-kal csökkentheti a szív- és érrendszeri megbetegedések kialakulásának esélyét.

## Borfehérjék

A borok fehérjetartalma 15-230 mg/liter között változik. A bor fehérjéi származhatnak magából a szőlőből (ez a nagyobb rész), illetve mikroorganizmusokból (élesztő), melyek az alkoholos erjedésben játszanak szerepet. A borfehérjék jelentősége többértű, a bor minőségét befolyásolják, az íz és testesség kialakításában is fontos szerepet játszanak. A pezsgőborok esetén a habzásért is a fehérjék felelősek. A borfehérjék azonban negatívan is befolyásolhatják a bor tulajdonságait, például gyakran zavarosságot okoznak, illetve a borok által okozott allergiás reakciókért is a fehérjék tehetők felelőssé.

A szőlőből származó fehérjék nagyon heterogének. Az érés kezdetét követően nő a mennyiségük. Funkciójukat tekintve három fő csoportba sorolhatók, 34%-uk az energiaháztartásban játszik szerepet, 19%-uk az ún. patogenezishez köthető fehérjék, melyek expressziója a sejtek védekezési folyamatai során (kórokozók ellen), a különböző stressz hatásokra, illetve betegségek és sérülések hatására növekszik meg. A harmadik fő csoportot a



metabolizmushoz köthető fehérjék teszik ki, ezek összessége megközelítőleg 13%-a a teljes fehérjeállománynak.

A szőlőszemek érése során a fehérje-összetétel folyamatosan változik. Például a szemek színváltozásának kezdetén a fotoszintézis, a szénhidrát metabolizmus, a stresszválasz fehérjeinek expressziója nő. A színváltozási folyamat végén az antocián szintézis fehérjei overexpresszálódnak a termés héjban, ennek hatására éri el az érett szőlőszem a rá jellemző szint. A szüretet követően pedig a patogenezishez köthető fehérjék a legdominánsabbak. A patogenezis köthető fehérjék közül legfontosabbak a kitináz és a thaumatin-szerű fehérjék, de az osmothint és a  $\beta$ -1,3-glukanázt is érdemes itt megemlíteni. Legfontosabb szerepük a gombák elleni védekezés, így egészséges növényekben alacsony a szintjük.

A kitináz fehérjék olyan enzimek, melyek a kitin nevű anyag bontására képesek, amely a gombák sejtfalának legfontosabb alkotórésze. Ez az enzimaktivitás teszi lehetővé, hogy a kitináz fehérjék a gombák elleni védekezés fontos szereplőivé válhassanak. Levelekben, gyökérben, szárban is expresszálódnak, de legnagyobb mennyiségben a bogyóban. A szőlőszemek érése során folyamatosan nő a mennyiségük.

A thaumatin-szerű fehérjék a gombák sejtmembránjának permeabilizálásában (átjárhatóvá válik a membrán) játszanak szerepet, ezáltal fejtve ki antifungális hatásukat. A thaumatin fehérje alapvetően édes ízű, de ezekre a thaumatin-szerű fehérjékre ez nem igaz.

Borkészítés során a szőlő fehérjei denaturálódnak, kivéve a patogenezishez köthető fehérjéket, melyek a proteolízissal és a bor alacsony pH-jával szemben ellenállóak, így túlélnek a borkészítést. A kitinázok például még a borban is aktívak, képesek kötődni a kitinhez.

Általánosságban elmondható, hogy nehézkes izolálni a bor fehérjéit, ennek oka a sok polifenol és más interferáló anyag. A fehérborok esetén kicsit könnyebb a dolgunk, ugyanis ezek a borfajták (szőlőfajták) nem tartalmazznak antociánokat.

## **Opálosság**

A borok opálosságát a tárolás során fellépő szélsőséges hőmérséklet okozza. A fehérjék ebben az esetben aggregálódnak, zavarosságot okozhatnak, és üledéket képezhetnek.

Ezek negatívan befolyásolják a borok minőségét, ezáltal csökkentve piaci értéküket. Nem mindegyik típusú borfehérje okoz zavarosságot, csak amelyek nem hőstabilak. Az opálosság

fő okozójaként patogenezishez kapcsolódó fehérjéket (kitináz, thaumatin-szerű fehérje,  $\beta$ -1,3-glukanáz) azonosítottak. Ezek proteázokkal és savas pH-val szemben ellenállóak, de a magas hőmérséklettel szemben nem. A bentonit (az agyag egy fajtája) abszorbeálja ezeket a fehérjéket, így ennek alkalmazásával megelőzhető a zavarosság kialakulása.

## Habképződés

Habképződésről a pezsgő borok esetén beszélhetünk, ebben a folyamatban is jelentős szerep jut a bor fehérjéinek. Már két évtizeddel ezelőtt bizonyították, hogy pozitív korreláció áll fenn a fehérje koncentráció és a habképződés között, és e mellett azt is megállapították, hogy a fehérje degradáció csökkenti a habképződést és a hab stabilitását. Ez a jelenség magyarázza a patogén gombák (pl.: *Botrytis cinerea*) hab stabilitásra gyakorolt negatív hatását, ugyanis a gomba proteázok hidrolizálják a bor fehérjéit, ezáltal csökkentve mennyiségüket. A 2D és 1D poliakrilamid géleken számos fehérje eltűnik a fertőzött mintákból, melynek oka a proteolízis és a gombafertőzés miatt megváltozott expresszió.

A bentonit nevű anyag, mely a zavarosság ellen hatásos, a habképződésre és stabilitásra negatívan hat, mivel megköti a borfehérjéket. Az élesztőből származó mannoproteinek azonban elősegítik a habképződést (sörben is).

## Nyomonkövethetőség

A jó minőségű borok eredetigazolása kiemelt fontossággal bír. Az üveg címkéjén fel kell tüntetni milyen típusú szőlőből készült a bor és földrajzilag honnan származik. A borban található többféle komponens (DNS, illékony és nem-illékony anyagok, fehérjék) alapján lehetséges a borok azonosítása többféle, egymástól metodikailag független molekuláris biológiai módszer segítségével. A borfehérjék vizsgálatára kezdetben natív-gélelektroforézist használtak, majd a kapilláris gélelektroforézis, az SDS-PAGE és az tömegspektrometria alapú módszerek is segítséget nyújtottak ezen fehérjék vizsgálatára. Habár ezek a módszerek manapság még nagyon idő és költségigényesek, egyre nagyobb igény lenne rá, hogy bekerüljenek a napi gyakorlatba, hiszen fontos szerepet tölthetnének be a fogyasztóvédelmi és az eredetigazoláshoz kapcsolódó munkában.

## Nem bor eredetű fehérjék

A borok nyomon-követhetőségi vizsgálata során egyre gyakrabban foglalkoznak a nem-bor eredetű fehérjékkel, melyek a borkészítés során kerülnek a borba. A borászok gyakran használnak fehérje-alapú derítőanyagokat, mint például a glutén, tej kazein vagy a tojás ovalbumin, segítségével eltávolíthatóak az üledékek. Ezek a fehérjék sokszor okoznak problémát a borok eladása során, ugyanis gyakori allergének.

A nem bor eredetű fehérjék kimutatására ELISA és Western blot technikákat használnak leginkább, de ezek detektálási határértéke túl magas (100 µg/liter). Egyre inkább a tömegspektrometria alapú módszerek kezdenek elterjedni, mivel ezek sokkal érzékenyebbek. A különböző italok esetén leggyakrabban használt eljárás a nagy gyakoriságú fehérjék csökkentésére, ill. a kis gyakoriságú fehérjék feldúsítására a kombinatorikus peptid ligand könyvtárak alkalmazása. Kombinatorikus peptid ligand könyvtárak segítségével már 1 µg/liter kazein mennyiség kimutatható. A fehér borokban leginkább kazeint használnak derítőanyagként, míg a vörös boroknál jellemzően albumint (tojásból). Bár egyes olasz vörösborokban egy kísérlet során csak kazeint találtak és ez a címkézésen nem volt feltüntetve, pedig a kazein veszélyes allergén lehet.

## Fermentáció

A borkészítés során lezajló fermentáció (alkoholos erjedés) nagyon komplex folyamat (mikrobiológiai és biokémiai), melyben a *Saccharomyces cerevisiae* borélesztő játszik központi szerepet. A fermentáció során megváltoznak a környezeti feltételek, ehhez a változáshoz az élesztő gombák is igyekeznek alkalmazkodni, megváltozik a fehérje összetételük. Fermentációs stressz hatására bizonyos fehérjék expressziója csökken (represszálódnak), míg más fehérjék expressziója növekszik, illetve bizonyos fehérjék proteolízise játszódik le.

## Felhasznált irodalom

Fidel T., Nollet L. M. L. (szerk.) (2013): Proteomics in Foods: Principles and Applications. Food Microbiology and Food Safety 2. Springer. New York, USA. 1-590.

Salvado Z. et al. (2008): Proteomic evolution of wine yeast during the first hours of fermentation. FEMS Yeast Research 8. 1137–1146.

Cilindre C. et al. (2007): Influence of Botrytis cinerea infection on Champagne wine proteins (characterized by two-dimensional electrophoresis/immunodetection) and wine foaming properties. Food Chemistry 103. 139–149

Vincenzi S. et al. (2011): Protein evolution during the early stages of white winemaking and its relations with wine stability. Australian Journal of Grape and Wine Research 17. 20–27

Ferreira R. B., Picarra-Pereira M. A., Monteiro S., Loureiro V. B., Teixeira A. R. (2002): The wine proteins. Trends in Food Science & Technology 12. 230–239.

## A gabonafélék és proteomjuk

A gabonafélék az emberiség fő táplálkozási alapanyagai, mely a letelepedés és a növénytermesztés kezdetéig nyúlik vissza. A gabonanövények magjai jelentették és jelentik ma is a kenyérgabonát. Szemtermésükben magas az energia, vitamin és ásványianyag tartalom. Legnagyobb mennyiségben előforduló vitaminok az E1-, B1-, B2-, B6-vitamin és a niacin. Ásványi anyagok közül a magnézium, kalcium és a cink. A gabonafélék rosttartalma segíti a bélperisztaltikát, kedvezően hat a bélműködésre. A teljes kiőrlésű magokból készült termékek jelentősen több vitamint és ásványi anyagot tartalmaznak, ezáltal csökkenthetik több krónikus betegség kialakulásának kockázatát. A fontosabb gabonafélék három csoportba oszthatók: sikérképző fehérjéket tartalmaznak (búza, rozs, árpa, zab), sikérképző fehérjéket nem tartalmaznak (rizs, köles, cirok, kukorica), alternatív gabonafélék (hajdina, amaránt).

### Búza

A búza a legnagyobb területen termesztett gabonaféle, széleskörű elterjedését a fajták jó alkalmazkodóképessége teszi lehetővé. Felhasználása sokrétű, elsősorban őrleményeit használhatjuk a kenyerek, tészták alapanyagaként, de takarmánynak is kiváló és melléktermékei is értékesek. A búzaszem két legfontosabb összetevője a keményítő és a fehérjék, ezek aránya alapvetően meghatározza a búza minőségét. A magas fehérjetartalom kedvező minőséggel párosul. A legfontosabb búzafehérjék az albumin (leukozin), globulin (edesztin), prolamin (gliadin), glutelin (glutenin) és a nukleoproteidek. Ezek közül a gliadin és a glutenin képezik a sikért.

A búzaszemeket kívülről a maghéj veszi körül, belül található a csíra és az endospermium. Az endospermium a mag belső táplálósövege. Emberi táplálkozás szempontjából ez a legfontosabb része a búzaszemnek, mivel itt találhatóak a fehérjék és a keményítő, és ebből készül a liszt. Ez a leginkább tanulmányozott magrész, kutatások igazolták, hogy az endospermium fehérjei határozzák meg a lisztből készült tészta rugalmasságát, nyújthatóságát, levegőtartási képességét. Bizonyos amfipatikus fehérjék, mint például a membrán fehérjék, az endospermium fehérje mátrixa és a keményítő szemcse között helyezkednek el, befolyásolva a mag keménységét és végső soron a tészta tulajdonságait.

Olyan fehérjéket is megtalálhatunk a magban, melyek a rovarok és gombák elleni védekezésben játszanak szerepet. Ilyen proteinek az amiláz és proteáz inhibitor molekulák. Proteomikai analízisek eredményeként megállapították, hogy a külső rétegben baktériumok és gombák elleni védekezésben szereplő fehérjék találhatók, míg a belső rétegben oxalát szekretáló baktériumok ellen védő fehérjéket azonosítottak.

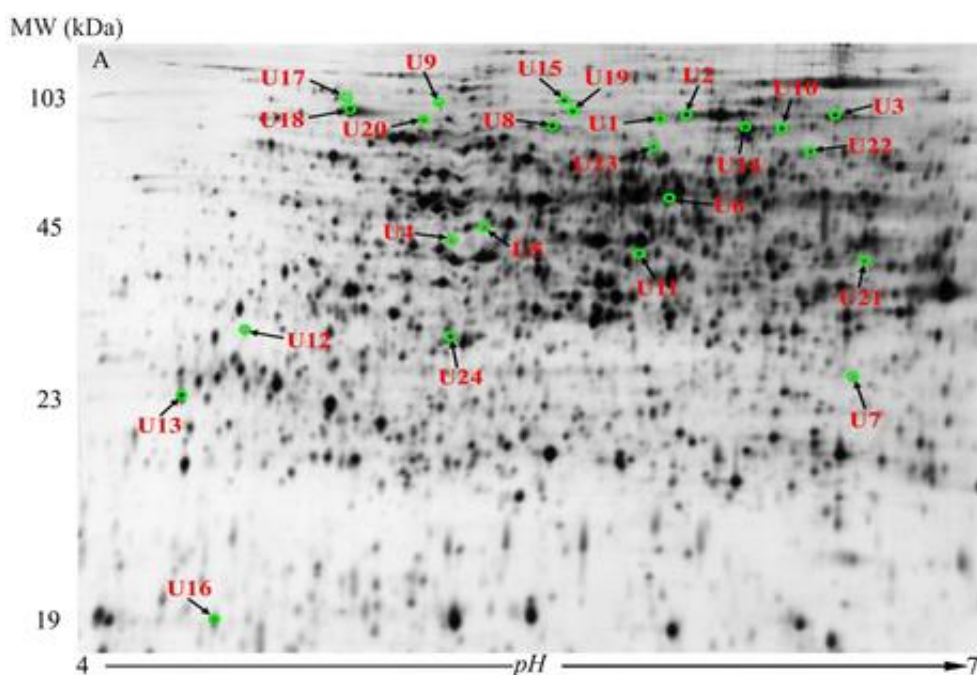
A búzaborpa nagyrészt a terméshéjből és az aleuron rétegből áll. Aleuron réteg az endospermium része, lizinben gazdag fehérjéket tartalmaz, valamint magas a vitamin és ásványianyag tartalma.

A búzamazag embrionikus szövete a csíra. Egyre növekvő érdeklődést mutatnak a fogyasztók a búzacsíra iránt, hiszen nagyon magas a vitamin- és ásványianyag tartalma. A búzacsíra 2D-PAGE térképe már 2006-ban elkészült, az azonosított fehérjék kétharmada az embrió növekedésével és fejlődésével volt összefüggésben, emellett nagy mennyiségben azonosítottak stresszhez köthető fehérjéket is, ellentétben az endospermiummal, ahol ez nem volt jellemző. Csírázás során számos fehérje expressziója megváltozik. Bizonyos proteinek csökkenő expressziós szintet mutatnak, ilyenek például az energiatermelő folyamatokhoz, a fehérje szintézishez, a jelátviteli mechanizmusokhoz, a stressz-hez és metabolizmushoz kapcsolódó fehérjék. Más fehérjék megemelkedett expressziós szintet mutatnak, ide tartoznak az energia és fehérje degradációhoz kapcsolódó fehérjék.

## Árpa

Az árpa is nagyon fontos gabonaféle, hazánkban is nagy területen termesztik. A sörkészítés legfontosabb alapanyaga, emellett abraktakarmányként is jelentős különösen a sertéstenyésztésben. A legnagyobb gyakoriságú fehérjék a sörben a hordeinek, melyek az árpából származnak, ez a csoport jellemzően allergén reakciót kiváltó fehérjéket foglal magába. Árpán vizsgálták az alumínium-mérgezés hatását, mely a savanyú talajok esetén fontos limitáló faktor.

Az alábbi elektroforetikus gélkép az árpaszem proteomját választja szék izoelektromos pont és molekulásúly szerint nagyfelbontású poliakrilamid gélen. Az enyhén savas tartományban közel ezer fehérjefoltot lehet egyedileg elválasztani.



12. ábra: Árpa mag proteomja 2D-PAGE gélképen (Dai és mtsai., 2013)

## Liszt

A liszt fehérjei befolyásolják a keverési és a sütési tulajdonságokat. A legtöbb vizsgálat glutenin polimerekre (nagy molekulású és kis molekulású alegység) és gliadin monomerekre irányul, általában kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézissel (2D-PAGE) és tömegspektrométer alapú módszerekkel analizálhatók. A fehérjék tömegspektrometriás azonosítása gyakran nehézségekbe ütközik, mivel a homológ fehérjék a hexaploid búza 3 genomjából származhatnak, emellett az is nehezíti az azonosítást, hogy a legtöbb glutén fehérje csak a búzára jellemző, így például a rizs szekvencia adatbázisok nem használhatóak az azonosításnál. A glutenin és a gliadin fehérjék mellett az amiláz és proteáz inhibitorok szintén nagy gyakoriságú fehérjék és ezek fontos esszenciális aminosav források.

A legtöbb tudományos közlemény, mely a liszt proteomjával foglalkozik, az albumin és a globulin fehérjék expresszióját és esetleges módosulásait vizsgálja.

Az elmúlt időszakban terjedő új irányvonala a lisztfehérjék kutatásának azon fehérjék vizsgálata, mely a cöliákiával, hétköznapi nevén a lisztérzékenységgel állnak kapcsolatban. Ez a terület az ételallergiával, vagyis a gabonafélék humánegészségügyi vonatkozásával foglalkozik. A glutén tartalmú ételek fogyasztása egyre több embernél okoz egészségügyi

problémát, egyes becslések szerint az európai lakosság 1-2%-át érinti. A szervezet bizonyos gabonafehérjékre adott allergiás reakciója számos kellemetlen és veszélyes tünettől jár együtt, úgy, mint csalánkiütés, emésztőrendszeri problémák, depresszió, ekcéma, alacsony szérum vaskoncentráció, autoimmun reakció, anafilaxiás hiperszenzitivitás. Mint gyűjtőfogalom, az allergén fehérjék azonosításával foglalkozó tudományterület az „allergenomics”. Tömegspektrometria alapú módszerek (LC-MS/MS) segítségével késztermékekből az allergén búza fehérjék, illetve a nem-búza eredetű összetevők mennyiségi meghatározása elvégezhető.

Nemcsak a liszt kapcsán végezhetünk fehérje vizsgálatokat, hanem a belőle készült tészták, kenyerek esetén is. A kelt tésztában kialakuló gázbuborékok stabilizálásában és a kenyér belső szerkezetének kialakításában ún. „hab-képző” oldható fehérjéket azonosítottak. Ilyen fehérjék a béta-amiláz, a tritin és a szerpin. Ezek a proteinek egy elasztikus „bélést” alkotnak a gázbuborékok körül, a tészta integritását biztosítják.

## **Gabona-proteomikai vizsgálatok gyakorlati jelentősége**

A proteomikai módszerekkel betekintést nyerhetünk a gabonaszemek fejlődésének, táplálkozási jellemzőinek szabályozásába és megfigyelhetjük a biotikus és az abiotikus stressz hatások okozta változásokat. Az abiotikus stressz vizsgálata kiemelt fontosságú manapság, hiszen a globális klímaváltozás szignifikánsan befolyásolja a mezőgazdaságot és az élelmiszeripart. A fehérje vizsgálatok segíthetik a klimatikus faktorok által okozott változások megértését, mint például a fotoszintetikus stressz, a légszennyezés, a hő és hideg stressz, az ozmotikus stressz (aszály, árvíz) vagy a fém stressz. Ha megismerjük ezen folyamatok okozta változások molekuláris hátterét, olyan információval rendelkezünk, melyet felhasználva csökkenthetjük ezen faktorok negatív hatásait az élelmiszer-előállításban.

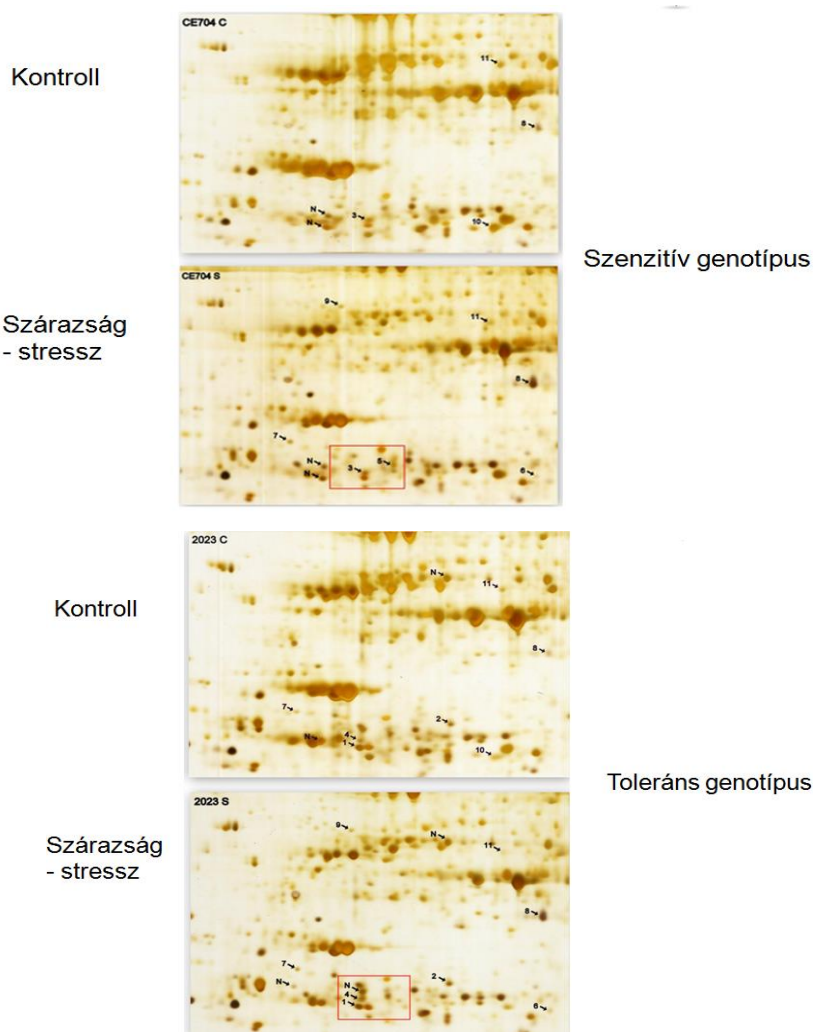
## **Abiotikus stressz**

A proteomikai eszköztár a környezeti stresszre adott válaszreakciók azonosítására is felhasználható. Erre konkrét példát nyújt egy tanulmány, melyben búzaszemeken vizsgálták a hőstressz, a hideg, a szárazság, és a só hatását a mag fehérje-expressziójára. Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézissel több mint 140 fehérjét azonosítottak, melyek közül 124



fehérje expressziójában történt változás, valamilyen stresszfaktor hatására. E szerint az azonosított proteinek közel 90%-ánál mennyiségi változást indukált a szuboptimális környezet a gabona szemtermésére. Ezek a vizsgálatok segíthetik a stressz tolerancia és adaptáció megértését. A különböző stresszfolyamatok során azonosított marker fehérjék azonosítása a nemesítésben, szelekcióban hasznos eszköz lehet.

A kukoricánál szárazságtűrésének molekuláris hátterének feltérképezése a klímaváltozással együtt járó kihívás, hiszen a szárazságra adott válasz megértése az első lépés a toleráns fajták termesztésében. Dehidratációra való érzékenység szempontjából két fajtát vizsgáltak, egy toleráns és egy szenzitív fajtát. A védekező és stresszhez kapcsolódó fehérjék expressziója nő mindkét fajtánál, de a védekező fehérjék szintje a szenzitívnél kevésbé nőtt meg, mint a toleránsnál.



13.ábra: Kukorica szárazságtűrésének vizsgálata (Benešová és mtsai., 2012)

## Felhasznált irodalom

Guo H. et al. (2011): Identification of Changes in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seeds Proteome in Response to Anti-*trx s* Gene. PLoS ONE 6 (7): e22255.

Dai H. et al. (2013): Comparative Proteomic Analysis of Aluminum Tolerance in Tibetan Wild and Cultivated Barleys. PLoS ONE 8 (5): e63428.

Fidel T., Nollet L. M. L. (szerk.) (2013): Proteomics in Foods: Principles and Applications. Food Microbiology and Food Safety 2. Springer. New York, USA. 1-590.

Benešová M. et al. (2012): The Physiology and Proteomics of Drought Tolerance in Maize: Early Stomatal Closure as a Cause of Lower Tolerance to Short-Term Dehydration? PLoS ONE 7 (6): e38017.doi:10.1371/journal.pone.0038017

Mak Y., Skylas D. J., Willows R., Connolly A., Cordwell S. J., Wrigley C. W., Sharp P. J., Copeland L. (2006): A proteomic approach to the identification and characterisation of protein composition in wheat germ. Functional & Integrative Genomics 6. 322–337.

## **Gyümölcsök és expresszált fehérjék**

Az egészséges táplálkozás egyik alappillére a rendszeres, megfelelő mennyiségű gyümölcsfogyasztás. Magyarországon évi 73 kg gyümölcsöt fogyaszt átlagosan egy fő, sajnos ez az érték egyre csökkenő tendenciát mutat. Egy átlagos európai napi 220 g gyümölcsöt fogyaszt, az ajánlott mennyiség azonban 500-700 g/nap lenne.

A gyümölcsök köztudottan nagyon egészséges élelmiszerek. Magas a karotinoid, B- és C-vitamin tartalmuk, emellett jelentős kálium, kalcium, vas és foszfor forrásoknak tekinthetők. Magas a rost és víztartalmuk, a gyümölcsfogyasztás élettani hatásai között szerepel a szív és érrendszeri betegségek, daganatos megbetegedések és hiánybetegségek megelőzése. A kiegyensúlyozott táplálkozás része a napi gyümölcsfogyasztás.

Kémiai összetételüket tekintve, külön kell a száraztermésű, héjas gyümölcsökről és a lédús gyümölcsökről beszélnünk. A száraztermésűek alacsony víztartalommal jellemezhetők (6-9 %), fehérjetartalmuk: 18-27 %, szénhidrátartalmuk: 4-24 %, zsírtartalmuk: 50-60 %. A lédús gyümölcsök víztartalma magas 75-90 %, fehérjetartalmuk nagyon alacsony 0,1-1,3 %, szénhidrátartalmuk 4-24 %, zsírtartalmuk nem jelentős.

A gyümölcsök esetén végzett proteomikai vizsgálatoknál a leginkább tanulmányozott területek az érés során bekövetkező változások monitorozása, a tárolás során megváltozó fehérje-összetétel, a környezeti tényezők, úgy, mint hő, hideg és anaerob körülmények hatása.

## **Érés során bekövetkező változások**

Az érés a gyümölcsök fejlődésének utolsó fázisa, mely során édesebbek és puhábbak lesznek. A folyamat során biokémiai, fiziológiai és génexpressziós változások is történnek. A klorofill molekulák degradálódnak, míg karotinoidok és antociánok szintetizálódnak, így a termés eléri az érettséget mutató színét. További folyamat, hogy az etilén receptorok degradálódnak (megjegyzés: az etilén növényi hormon, mely gyorsítja az érést), a sejtfalak meglágyulnak, a keményítő egyszerű cukrokká alakul és illóanyagok keletkeznek.

A citrusfélék a legfontosabb örökzöld gyümölcsök a világpiacon, évi 105 millió tonnát termesztenek, felhasználásuk széleskörű. Bogyótermésük egyedülálló anatómiai struktúrával

rendelkezik: héjrészből (exocarpium + mesocarpium) és endocarpiumból (lédús mirigyszőrök) áll.

A narancs gyümölcsének érése során bekövetkező változásokat folyadék kromatográfia MS/MS proteomikai megközelítéssel végezve a metabolikus enzimek expressziójában találhatóak változások. Az invertáz, mely a szacharózt bontó enzim, szintje nem változik, viszont egy invertáz inhibitor expressziós szintje megnő az érés végső fázisában. A szacharóz foszfát szintáz és szacharóz 6-foszfát foszfátáz szint növekszik, így alakul ki a magas szacharóz szint az érett gyümölcsben.

Az eper az egyik legnépszerűbb gyümölcs, magas antioxidáns tartalommal rendelkezik. Különböző proteomikai módszereket alkalmaztak már az eper termésének vizsgálatára, úgy mint 1D PAGE, 2D PAGE, DIGE, illetve nanoLC-MS. Az eper fehérjéinek referencia térképét már elkészítették. Az érés folyamatában számos fehérjéről megállapították, hogy expressziójuk megváltozik. Csoportokba sorolva ezeket a fehérjéket az energia és szénhidrát metabolizmushoz, stressz válaszhoz, sejtalkotók szintéziséhez és transzkripcióhoz köthető fehérjékként azonosították.

A szőlő esetén nem csak táplálkozási szempontból, hanem a borkészítés kapcsán is végeznek vizsgálatokat. A szőlőből származó fehérjék nagyon heterogének. Az érés kezdetét követően többségük expressziója megváltozik. Funkciójukat tekintve három fő csoportba sorolhatóak. Ilyen megközelítéssel 34%-uk az energiaháztartásban játszik szerepet, 19%-uk az ún. patogenezishez köthető fehérjék, melyek expressziója a sejtek védekezési folyamatai során (kórokozók ellen), a különböző stressz hatásokra, illetve betegségek és sérülések hatására növekszik. A harmadik fő csoportot a metabolizmushoz köthető fehérjék teszik ki, melyek mennyisége a teljes fehérjeállománynak 1/7 részét jelenti.

A szőlőszemek érése során lejátszódó proteomváltozásra egy példa, hogy a szemek színváltozásának kezdetén a fotoszintézis, szénhidrát metabolizmus, stressz válasz fehérjéinek expressziója nő meg. A színváltozási folyamat végén az antocián szintézis fehérjéi overexpresszálódnak a terméshéjban, ennek hatására éri el az érett szőlőszem a rá jellemző szint. A szüretet követően pedig a patogenezishez köthető fehérjék a legdominánsabbak. A patogenezis köthető fehérjék közül legfontosabbak a kitináz és a thaumatin-szerű fehérjék, de az osmothint és a  $\beta$ -1,3-glukanáz is érdemes itt megemlíteni. Legfontosabb szerepük a gombák elleni védekezés, így egészséges növényekben alacsony a szintjük. A borkészítés

során a szőlő fehérjéinek többsége denaturálódik a kialakuló savas kémhatás miatt, a proteázok aktivitása miatt degradálódnak és precipitálódnak. Ezek alól kivételt képeznek a patogenezisben szerepet játszó fehérjék.

Az éretlen és az érett gyümölcsök fehérjeprofiljának összehasonlító analízise a banán esetén is rendelkezésre áll. A banántermésén végzett kétdimenziós DIGE jelölés és tömegspektrometria elemzés adta meg a választ az érés során lejátszódó folyamatok fehérjeszintű megismeréséhez. Az éretlen gyümölcsökben magas a kitinázok mennyisége, mely kitinázoknak több izoformája is létezik, élettani szerepük a patogének elleni védekezésben nyilvánul meg, valamint befolyásolja a növekedési és fejlődési folyamatokat is. A pektát-liáz az érett banánban van túlsúlyban, szerepe a pektin bontása, ami a sejtfal fő komponense, de csak mérsékelt szerepe van a gyümölcs puhaságának kialakításában. A keményítőt bontó enzim is az érett banánban overexpresszálódik, melynek az édes íz kialakításban van szerepe, mivel a keményítőt monomerre, vagyis glükózra bontja. Az érett banánban ezek mellett a hőszokk fehérjék mennyisége is emelkedett szintet mutat. Az érés során azonosított funkcionális fehérjék nagymértékben befolyásolják az érett gyümölcs minőségi paramétereit, így megismerésük hozzájárulhat az eredményes termék előállítás technológiájához.

## **Tárolás során bekövetkező változások**

A gyümölcsök tárolása során alkalmazott kezelések célja alapvetően a szavatossági idő meghosszabbítása.

Az őszibarack rövid szavatossági idővel rendelkező gyümölcsök közé tartozik. Több eljárás létezik, amivel meghosszabbítható a szavatossági idő, ilyenek például a hűtve tárolás, a módosított nyomásviszonyok, az ehető bevonat, illetve a hőkezelés. A hőkezelés során a gyümölcsöket 48°C-s vízbe merítik 10 percre, majd a további tárolásuk szobahőmérsékleten történik.

A felmerülő kérdés az, hogy hő hatására megváltozik-e a barack termésének proteomja és ha igen, az mely fehérjéket érinti. A tanulmányok szerint a gyümölcsöt érő magas hőmérséklet hatására a reaktív oxigén gyökök metabolizmusa csökken, valamint néhány allergén fehérje mennyisége növekszik, ugyanígy változik a kis molekulású stressz fehérjék mennyisége és

a sejtfal integritásának fenntartásában részt vevő fehérjék expressziója is. Mindezek mellett a hőkezelésnek negatív hatása van a glikolitikus útvonalra, ami csökkent energiatermelést jelent.

Az alacsony hőmérsékletnek számos pozitív hatása van a gyümölcsök tárolása során. Ilyenkor az organikus savak és vitaminok mennyisége megnő, a gyümölcsök húsa így keményebb marad. Hűtve tárolás során a pomelo néhány fehérjéjének expressziója növekedést mutat. Ilyenek a stresszválasz fehérjéi, a metabolizmust gátló fehérjék, és a metabolitok transzportját gátló fehérjék. Az alacsony hőmérséklet okozta stressz jelátviteli folyamatában a calcineurin B-szerű fehérje és a protein kinázok komplexe fontos szerephez jut.

A mandarin gyümölcs proteomja 4°C-on 85-90%-os páratartalom mellett történő tárolás hatására legalább 74 fehérje expressziójában változik meg 2D-PAGE és MALDI-TOF-TOF MS módszer alapján. Funkciójuk alapján, az expressziós változást mutató proteinek a szénhidrátok metabolizmusa, az aminosav metabolizmus, illetve a betegség rezisztenciával kapcsolatos fehérjék csoportjába tartoznak. A legutóbbi csoport fehérjéi különös figyelmet érdemelnek, mivel befolyásolhatják a tárolási időtartamot, a gyümölcs minőségét.

A tárolás során a gyümölcsök gyakran ki vannak téve anaerob viszonyoknak, például olyan bevonat van a felszínükön, ami nem engedi át a gázokat, esetleg nem biztosítanak megfelelő légcserét az adott helyiségben vagy műanyag zsákokban tárolják a gyümölcsöt. A 10% alatti oxigéntartalmat és az 5% feletti szén-dioxid tartalmat a citrusfélék nem tudják tolerálni, ez már erős stresszfaktorként jelentkezik, ezért az anaerob respiráció nő, etanol és acetaldehid akkumulálódik, ezáltal ízetlen lesz a gyümölcs. A mandarin különösen érzékeny az anaerob körülményekre, mert a héja kevésbé permeábilis a gázokra.

2D-PAGE és HPLC/MS/MS módszerekkel vizsgálták mandarin és grapefruit esetén az anaerob körülmények hatását a külső héj (flavedo) és gyümölcshús proteom összetételére. A héjban a mandarin és grapefruit esetén is a stresszhez köthető fehérjék expressziója nő. Az oxidoreduktáz (melynek feladata a reaktív oxigén gyökök detoxifikálása) szint az anaerob körülmények között tartott grapefruitban magasabb, mint a mandarinban, ezzel magyarázható, hogy a grapefruit jobban ellenáll az anaerob stressznek. A gyümölcshús esetén az energiatermeléshez, a sejt ciklushoz és a sejt károsodás elleni folyamatokhoz kapcsolódó fehérjék expressziójában változik meg. A mandarinban nagyobb mértékűek a változások, mint a grapefruit esetén. Tízszerez expressziós különbséget mutat az alkohol dehidrogenáz fehérje

az anaerob körülményekre a mandarin mintáknál, mely jól szemlélteti a mandarin anaerob stressz érzékenységet, valamint a kis hőstressz fehérjék (HSP – heat shock protein) mennyisége is a mandarin esetén mutat magasabb értéket.

Az etilén kezelés a gyümölcsök tárolása során gyakran alkalmazott módszer, mivel az etilén, mint növényi hormon elősegíti a gyümölcserést. Az alma érése során is termelődik etilén, ami etilén kezelésre magasabb koncentrációt ér el, mivel maga az etilén kezelés is indukálja a gyümölcs endogén etilén termelését. A 2D-PAGE LC MS/MS metodika igazolta, hogy etilén hatására megnövekszik azon fehérjék expressziója, melyek normál érés során nem jelennek meg, illetve bizonyos fehérjék expressziója csökken, mint például a glikolitikus útvonal utolsó néhány enzime.

Az ózon kezelés megakadályozza a bakteriális leromlást és néhány betegség kialakulását a gyümölcsöknél. Segíti az etilén oxidációját a tároláskor, a szacharóz degradációt stimulálja és az antioxidánsok termelését serkenti. Ezen kívül az ózon sejthalált és sejtkárosodást indukáló sejteket is aktivál. Az ózon jelenléte blokkolja a kivi gyümölcsök etilén termelését, késlelteti az érést, stimulálja az antioxidáns és szabadgyök képződést. Az érés alapvetően indukálja a fehérjék karbonilációját, de az ózon gátolja ezt a folyamatot. A jelenség magyarázata az, hogy a kivi kandidáns fehérjéinek nagy része érzékeny a karbonilácóra, ezért képes az ózon késleltetni az érést.

A két ismert narancsváltozat, a vérnarancs és a narancs proteomja közötti különbséget 11 fehérje csoportba tartozó proteinek mutatnak. Ezek funkciójuk szerint a cukor metabolizmus (vérnarancsban overexpresszió), stresszválasz (narancsban overexpresszió), aminosav metabolizmus (narancsban overexpresszió), oxidatív folyamatok (vérnarancsban overexpresszió), transzport (vérnarancsban overexpresszió), védekezés (vérnarancsban overexpresszió), sejtalkotók biogenezise (narancsban overexpresszió) feladatokat látják el. A fehérje csoportok 2/3-a a vérnarancsban mutat emelkedett expressziót, ennek valószínű oka a magas antocianin szint. Az antocianin bioszintézis és a hozzá kapcsolódó útvonalak változtatják meg a fehérje expressziót. A stresszválasz fehérjéi a narancsban mutattak magasabb expressziós szintet, ennek valószínű oka az, hogy a vérnarancs az antocianin szint növelésével reagál a rossz környezeti feltételekre, míg a normál narancs a stresszfehérjék termelésével.

## **Allergének**

Allergiás reakciók elkerülésének érdekében, meg kell határozni, hogy mely növény okozza a tüneteket, ehhez először azonosítani kell az allergén anyagokat. Egy növény számos allergént tartalmazhat, így módon közel 350 ismert allergénről van ismeretünk. Leggyakrabban a tároláshoz kapcsolódó fehérjék, illetve enzimatis és szerkezeti fehérjék okoznak allergiás reakciót. Ezen molekulák kimutatásukra leggyakrabban a western blot, ELISA, 2D PAGE + MS, protein microarray, LC-MS/MS proteomikai módszereket használják.

A gyakori fehérje allergének közé tartoznak a patogenezishez kapcsolódó fehérjék (alma, eper, cseresznye, répa, körte, mogyoró), a profilin (körte, ananász, banán, alma, eper, répa, cseresznye, mangó) és a nem-specifikus lipid transzfer fehérjék (barack, kivi, alma, mogyoró, kukorica, cseresznye).



## Felhasznált irodalom

- Toledo T. T. et al. (2012): Proteomic analysis of banana fruit reveals proteins that are differentially accumulated during ripening. *Postharvest Biology and Technology* 70. 51–58.
- Muccillia V. et al. (2009): Proteome analysis of *Citrus sinensis* L. (Osbeck) flesh at ripening time. *Journal of Proteomics* 73. 134-152.
- Shi J. X. et al. (2008): Effects of anaerobic stress on the proteome of citrus fruit. *Plant Science* 175. 478–486.
- Minas I. S. et al. (2012): Physiological and proteomic approaches to address the active role of ozone in kiwifruit post-harvest ripening. *Journal of Experimental Botany* 63. 7. 2449–2464.
- Nakamura R., Teshima R. (2013): Proteomics-based allergen analysis in plants. *Journal of Proteomics* 93. 40-49.
- Biancoa L., Lopeza L., Scalonea A. G., Di Carlib M., Desideriob A., Benvenutob E., Perrotta G. (2009): Strawberry proteome characterization and its regulation during fruit ripening and in different genotypes. *Journal of Proteomics* 72. 586-607.

## **Zöldségek fehérjéi élelmiszeripari szempontból**

A gyümölcsfogyasztás mellett a megfelelő mennyiségű zöldségfogyasztás is fontos szerepet játszik az egészséges táplálkozásban. Magyarországon az emberek átlagos zöldségfogyasztása évi 90kg, Európában ez átlagosnak tekinthető, de összetétel szempontjából nagyon szegényes, mivel nagyrészt paradicsomból, paprikából, káposztából és vöröshagymából áll. Ha a világszerte tekintjük, akkor 1970 és 2000 között évi 60 kg-ról 105 kg/fő-re növekedett a zöldségfogyasztás. A zöldségek nem csak fontos tápanyagok, hanem számos pozitív élettani hatásuk is jól ismert. Általában fehérjékben szegények (kivéve a hüvelyes növények, úgy, mint a borsó, bab), ásványianyag-tartalom szempontjából a kálium a legjelentősebb, ezenkívül foszfor, kalcium, magnézium, nátrium és vas tartalmuk is számottevő. Vitaminok közül a D- és B12-vitamin kivételével az összes egyéb vitamin megtalálható a zöldségekben. Az ajánlott napi zöldségbevitel egy felnőtt ember számára 40-50 dkg.

A zöldségféléknél, akár csak a gyümölcsöknél, a proteomikai vizsgálatok elsősorban az érés során bekövetkező változások monitorozására, illetve a tárolás során alkalmazott kezelések hatásaira fókuszálnak.

## **Zöldségek termésének érése**

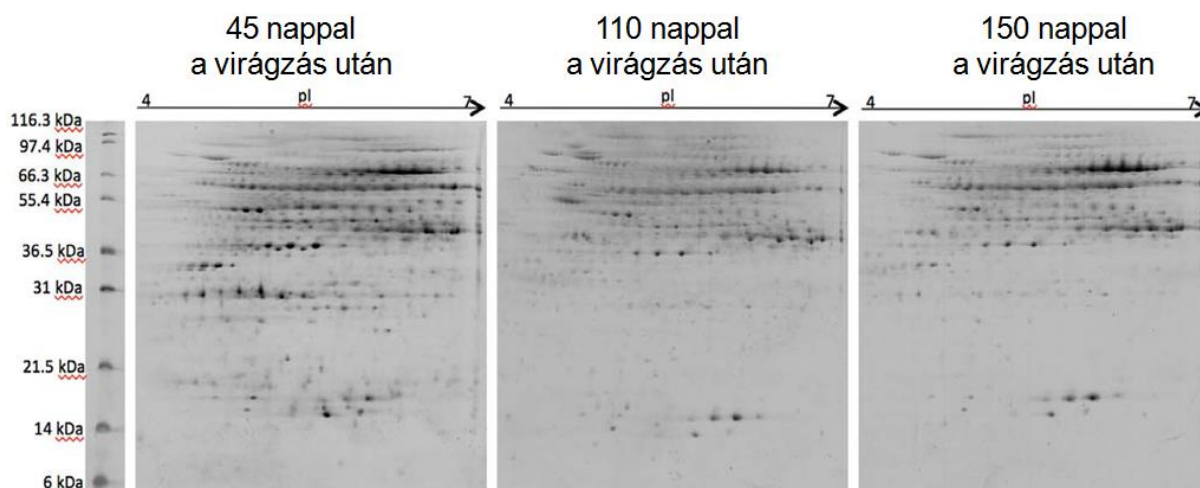
Akár csak a gyümölcsöknél, a zöldségek érése során is különböző biokémiai, fiziológiai és génexpressziós változások történnek. A folyamat során a klorofillok degradálódnak, a karotinoidok és antociánok szintetizálódnak. Etilén receptorok degradálódnak, a sejtfalak meglágyulnak, a keményítő egyszerű cukrokká alakul, illóanyagok keletkeznek és az ízanyagok akkumulálódnak.

A paradicsom világszerte elterjedt zöldségféle, melyet régóta használnak modell szervezetként genetikai, fiziológiai, fejlődéstani és termésérési vizsgálatokban. Több proteomikai vizsgálat során tanulmányozták már a kutatók a paradicsom érési folyamatát. Éretlen, közepesen érett és érett terméseket hasonlítottak össze. Megállapították, hogy a pektinészteráz és a GTP-kötő fehérje specifikus marker fehérjék, melyek mennyisége nő az

érés során, ezek a fehérjék a sejtfalak puhulásában és ezáltal a paradicsomtermés keménységének kialakításában vesznek részt.

Gél alapú proteomikai elemzés szerint a koktélpáradicsom termésének érése során a poliakrilamid gélen lévő fehérje spotok 8%-a mutat expressziós különbséget. Az érés kezdeti szakaszában az aminosav metabolizmus és fehérje szintézis fehérjéi expresszálódnak nagyobb mennyiségben. Ezzel ellentétben a szénhidrát metabolizmushoz és oxidatív folyamatokhoz kapcsolódó fehérjék expressziója az érett gyümölcsben éri el a maximumot.

Az olíva gazdaságilag fontos növény, az olívaolaj alapanyaga. Az olívaolaj zsírsavösszetétele (telítetlen zsírsavak aránya magas) miatt kedvelt ételkészítmény, bizonyos források antikarcinogén tulajdonságot tulajdonítanak a kisajtott olajnak. Az olaj minőségének alakulásában a bogyóban lejátszódó anabolitikus (felépítő) és katabolitikus (lebontó) folyamatok függvénye. A 2D PAGE és MALDI TOF módszer eredménye szerint az olíva bogyó különböző fejlődési fázisában az expressziós profil nem konstans, az folyamatosan változik. Ez a jelenség a fehérjék több csoportját is érinti, funkcionális csoportok szerint ilyenek az aminosav metabolizmus, sejtciklus, energia és szén metabolizmus, lipid szintézis, fotoszintézis, fehérje szintézis, stresszválasz, allergének szintézise folyamatokban szerepet játszó proteinek, illetve a malát-dehidrogenáz enzim (MDH, malic enzyme) mely folyamatosan akkumulálódik.



14. ábra: Az olíva bogyó különböző fejlődési stádiumai (Bianco és mtsai., 2013)

## Tárolás során alkalmazott kezelések

Paprika esetén proteomikai módszerek segítségével vizsgálják a hűtve tárolás hatását. Leszedést követően a paprika termését ajánlott minél hamarabb lehűteni 7,5 °C körüli értékre. A paprika érzékeny a túlzottan alacsony hőmérsékletre, amennyiben 7 °C-nál alacsonyabb hőmérsékleten tartjuk, akkor lyukak jelennek meg a felszínén, a magok megbarnulnak, a termés húsa elszíntelenedik, nedvességtartalma csökken, másodlagos hatásként reaktív oxigéngyökök szabadulnak fel.

2D DIGE + MALDI-TOF MS módszer alkalmazása segítette a 10 °C-on tárolt és 1 °C-on tárolt paprikák terméshúsának proteomja közötti különbségek megállapítására. Szemmel látható változások történnek az 1 °C-on tárolt paprikák esetén és fokozott etilén termelődés is mérhető. Fő különbségek a redox homeosztázisban és a szénhidrát metabolizmusban mutatkozik. Az eredmények szerint a glikolízis, a Calvin-ciklus és a Krebs-ciklus enzimei gátlódik a hűtve tárolás során. Az enoláz és a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz fehérjék a fő okozói a hűtés során kialakuló károsodásokért. A citoszolban lévő malát-dehidrogenáz (MDH) is részt vesz az abiotikus stressz kialakításában, korábbi ismeretek szerint csak a plasztiszokban lévő MDH-t tudták ehhez a stressztípushoz kapcsolni.

Paradicsom esetén is megfigyelhető a hűtve tárolás káros hatása, ilyen esetekben előfordul, hogy gumyszerűvé válik a paradicsom. Fehérje expressziós szinten is több változás is bekövetkezik, így az éréshez kapcsolódó fehérjék expressziója csökken, ebbe a csoportba tartozik többek között a savas invertáz enzim. A fagy toleranciáért felelős fehérjék expressziója nő, a kis hősokk fehérjék expressziója is nő, a sejtfal fehérjék expressziójának szintje pedig úgy változik, hogy a  $\beta$ -galaktozidáz szint nő, míg a poligalakturonáz szint csökken.

A burgonya tárolása befolyásolja a gumók rügyezését, mely a későbbi hozamra van hatással. Az eddig közölt proteomot érintő átalakulás szerint az expressziós szint megváltozik a keményítő metabolizmusban, a fehérje konformáció szabályozásában, a fehérjék újrahasonosításában és a stresszválasz folyamatában jelenlévő proteinek esetén. A burgonyagumókban erőteljes szabadgyök semlegesítés is folyik, így az oxidatív károsodások nem halmozódnak fel a tárolás során.

## Hagyományos és biotermelés

A bio- vagy ökológiai termelésnek számos előnye van a hagyományos termeléssel szemben. A biotermelés nagyon komplex, erősen szabályozott folyamat, mely hatással van a növények fiziológiás és minőségi tulajdonságaira, és mivel számos faktor együttes hatása jelentkezik, így összetett és kihívásokkal teli a proteomok között eltérést megfelelően értelmezni és magyarázni.

A tápanyagpótlás terén jelentkezik az egyik legmarkánsabb különbség a két termesztési mód között, úgy, mint szerves-, illetve műtrágyafelhasználás. A burgonyatermesztés során alkalmazott trágya befolyásolta a burgonya expressziós profilját. Ezidáig 160 olyan fehérjét ismerünk, melyek termelődése más volt szerves-, illetve műtrágya hatására. 17 fehérje a műtrágyás csoportban mutat emelkedett expressziós szintet, míg 143 fehérje a szerves trágyázás hatására volt magasabb, ezek közé tartoztak a fehérjeszintézisben és turnover-ben, szén és energia metabolizmusban, illetve a védekezési válaszokban részt vevő fehérjék. Ez az utóbbi jelzi, hogy a szervestrágyázás a fehérjék alapján értékelve növeli a stresszválaszt.

A hagyományos és a biotermesztés során előállított káposzta proteomjában 58 fehérje esetében ismerjük, hogy megváltozik az expressziója, ez hozzávetőlegesen 5%-a az összes detektált fehérjének. Az expressziós különbséget mutató fehérjék főleg a glikolízisben vesznek részt vagy ahhoz kapcsolódnak. A hagyományos termesztés során a detoxikáláshoz kapcsolódó fehérjék expressziója nőtt meg.

A sárgarépa karógyökerének proteomikai vizsgálata során 68 fehérje esetében ismerjük az expressziós különbséget a hagyományos és a bio termesztés összehasonlításakor. Ezek a proteinek a szénhidrát és polipeptid metabolizmusban és a másodlagos metabolitok termelésében játszanak szerepet. A biotermesztés sárgarépa esetén negatívan befolyásolja a chaperonok mennyiségét és a fehérjeszintézishez szükséges fehérjéket.

## Egyéb proteomikai vizsgálatok

A bab és a borsó a két legfontosabb hüvelyes zöldségféle a humán táplálkozásban. Mindkettőnek elkészült már a 2D-PAGE térképe. Borsó esetében több tanulmány a

kórokozók (pl. lisztharmat) hatását vizsgálta a proteom összetételre. A babszemben a nagy gyakoriságú fehérjék a phaseolin, fitohemagglutinin és a lektinhez kapcsolódó alfa-amiláz inhibitor.

Cukorrépa levelében és a gyökérében megtalálható fehérjék egy része a magas sótartalom hatására expressziós változással reagálnak. A gél alapú vizsgálatok azt mutatják, hogy a legtöbb fehérje nem változik a só stressz hatására, expressziójuk stabil maradt. A levélben 6 fehérje, a gyökérben 3 fehérje expressziója változik meg. Ezek a fehérjék azonban nem kapcsolhatóak a sóhoz való alkalmazkodáshoz.

Zöldségekből származó minták esetében is komoly kihívás a nagy gyakoriságú fehérjék csökkentése, ill. a kis gyakoriságú fehérjék feldúsítása. A kombinatorikus peptid ligand könyvtárak ezeknél a mintatípusoknál is alkalmasak erre a feladatra. Spenót és olivabogyó minták esetén is sikeresen alkalmazták a kisebb gyakoriságú fehérjék feldúsítására.

## Felhasznált irodalom

Sánchez-Bel P. et al. (2012): Understanding the mechanisms of chilling injury in bell pepper fruits using the proteomic approach. *Journal of Proteomics* 75. 5463-5478.

Bianco L, Alagna F, Baldoni L, Finnie C, Svensson B, et al. (2013): Proteome Regulation during *Olea europaea* Fruit Development. *PLoS ONE* 8 (1): e53563. doi:10.1371/journal.pone.0053563

Nawrocki A. et al. (2011): Quantitative proteomics by 2DE and MALDI MS/MS uncover the effects of organic and conventional cropping methods on vegetable products. *Journal of Proteomics* 74. 2810-2825.

Lehesranta S. J., Koistinen K. M., Massat N., Davies H. V., Shepherd L. V. T., McNicol J. W., Cakmak I., Cooper J., Lück L., Kärenlampi S. O., Leifert C. (2007): Effects of agricultural production systems and their components on protein profiles of potato tubers. *Proteomics* 7. 597–604.

## **A hal, mint élelmiszer proteomikája**

Az Európai Uniót tekintve Magyarországon a legalacsonyabb az évi halfogyasztás. Átlagosan 4,5 kg élősúly/fő halat fogyasztunk el egy évben, míg az Uniós átlag 22 kg élősúly/fő, a világátlag pedig 13,5 kg élősúly/fő. Pedig a halfogyasztásnak számos pozitív élettani hatása ismert, ilyen a magas omega-3 zsírsavak aránya, magas fehérjetartalom, alacsony energiatartalom, mely az alacsony zsírtartalomnak köszönhető, vitaminok: A, D, E, B1, B2, ásványi anyagok: jód, foszfor, nátrium, kálium, vas. Humán egészségügyi vonatkozása a halfogyasztásnak az a prevenció, melyet a szív- és érrendszeri megbetegedések kialakulásának megelőzésével nyújt.

A haltenyésztésben proteomikai módszereket számos területen alkalmaznak, ilyen a hamisítások kiszűrése; az allergének vizsgálata; a tenyésztett és vadvízi állományok összehasonlítása; a post-mortem változások vizsgálata; a mikrobiális leromlás, és veszteségek meghatározása.

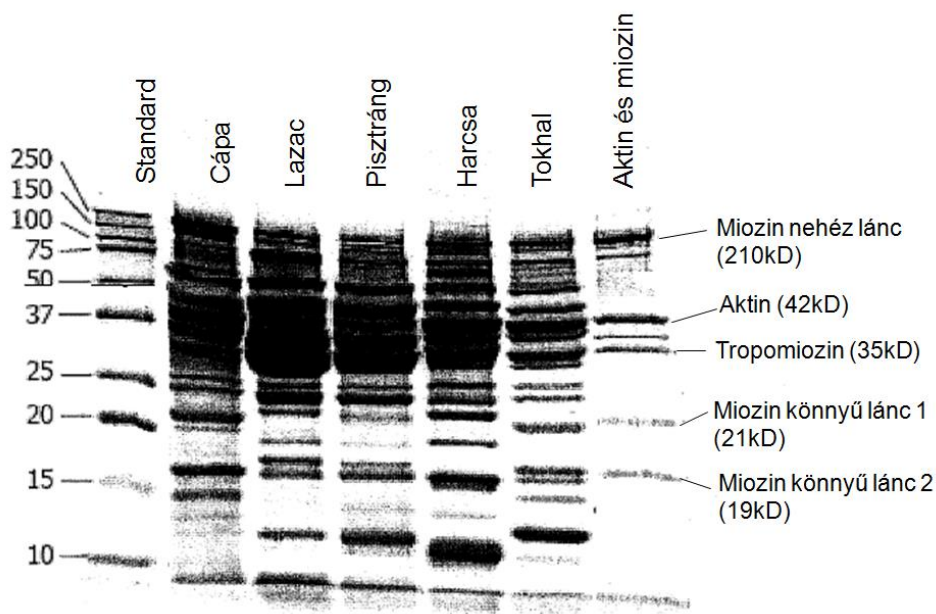
## **Hamisítások**

A haltermékek hamisításának leggyakoribb módja, amikor a címkézésen nem jelölt fajt tartalmaz az élelmiszer, illetve amikor más halfajt, halhúst értékesítenek, tehát a teljes terméket érinti a hamisítás. Ennek több oka is lehet, ilyen például, hogy olcsóbbá válik a termék előállítás, adókat próbálnak elkerülni, illegálisan kifogott halakat tudnak így eladni. A vásárlók félrevezetése mellett, ezek a hamisítások egészségügyi kockázattal is járhatnak, ugyanis a különböző halfajok a leggyakoribb étel allergének. Éppen ezért az Európai Unióban szigorúan szabályozott jelölési rendszer van, mely jelöléseket a csomagoláson kell feltüntetni. A csomagoláson szerepelnie kell a pontos fajmegnevezésnek, annak hogy az adott hal tenyésztett vagy vadvízből származik, valamint a származási helynek. Ahhoz hogy ezeket a szabályozásokat betartsák, szükség van pontos, gyors és érzékeny módszerekre, melyekkel egyszerűen megoldható a halfajok azonosítása bármilyen élelmiszerből, hiszen a feldolgozási eljárások során a külső anatómiai ismérvek alapján történő megkülönböztetés lehetetlenné válik. Emellett néha még a szakértőknek is nehézséget okoz az azonos élőhelyen megtalálható nagyon közeli halfajok elkülönítése. A különböző molekuláris biológiai módszerek a



legalkalmasabbak az egyes halfajok biztos azonosítására. A DNS alapú módszerek mellett egyre inkább használnak proteomikai vizsgálatokat is ilyen jellegű fajazonosításra.

A gél és nem-gél alapú proteomikai vizsgálatok között egyaránt találunk példát halfajok azonosítására. Egydimenziós SDS-PAGE módszert használva már 1985-ben Keenan és Saklee 164 különböző halfaj legáltalánosabb enzimfehérjéinek mintázatát publikálta. Ezzel a módszerrel izomfehérjék alapján történő elkülönítés is lehetséges nyers és feldolgozott halhúsból egyaránt. Izoelektromos fókuszálás segítségével a parvalbumint, mely egy kalciumkötő fehérje az izmokban, használva marker fehérjeként nagyfokú variabilitás mutatható ki egyes halfajok között. 2D-PAGE módszer használatával a kétdimenziós fehérje mintázatok összehasonlítása végezhető el. Gélelemző szoftverek segítségével fehérje biomarkerek azonosíthatóak. Többek között a triózfoszfát izomeráz marker fehérje alkalmas lehet rokon fajok elkülönítésére, alkalmazásával így például sikeresen azonosítható és elkülöníthető három tonhalfaj. A szarkoplazmatikus fehérjék a sügér fajok megkülönböztetését teszik lehetővé, valamint kilenc laposhal faj is megkülönböztethető ennek a markernek a segítségével. A tömegspektrometria alapú módszerek közül a MALDI-TOF és az ESI-MS/MS is alkalmas 25 kereskedelmi forgalomban kapható halfaj elkülönítésére, szintén szarkoplazmatikus marker fehérjék alapján.



15. ábra: Különböző halfajok izomfehérjéinek SDS-PAGE mintázata (Bio-Rad Manual)

## Allergének

A különböző halfajok nagyon gyakori ételallergének, becslések szerint ez a népesség 0,2-0,6%-át érinti. Az allergének immunoglobulin E (IgE) által közvetített allergiás reakciót váltanak ki, mely súlyos esetekben életveszélyes is lehet, anafilaxiás sokk kialakulását okozhatja. Az allergén molekula kapcsolódik az IgE-hez, melynek hatására különböző anyagok, így hisztaminok, citokinek, interleukinok szabadulnak fel a szervezetünkben, melyek gyulladáshoz vezetnek. Az Európai Unió szabványának megfelelően a 14 leggyakoribb allergént fel kell tüntetni az élelmiszerek csomagolásán. Ezek a tej, tojás, zeller, farkasbab, gluténtartalmú gabonák, puhatestűek, földimogyoró, mustár, szezám, szója, kagyló, kéndioxid, olajos magvak és ebbe a csoportba tartoznak a halak is. Sajnos a szigorú szabályozás ellenére előfordulhat, hogy az élelmiszer feldolgozási folyamatok során kontaminálódhatnak az egyes élelmiszerek az allergén élelmiszer valamilyen összetevőjével. Ezért feltétlenül szükséges a gyors, pontos, érzékeny és jó ismételtető allergén azonosítási módszerek kidolgozása. A proteomika vizsgálati módszerei megfelelnek ezeknek a kritériumoknak.

A parvalbumin, egy kalciumkötő albumin, illetve más fehérjék a legfontosabb allergének a halhúsban, melyek biomarkerként használhatóak a proteomikai vizsgálatok során. Tömegspektrometrián alapú módszerekkel lehetséges a parvalbumin szekvenciák monitorozása az élelmiszerekben. Jelenleg a leggyorsabb és legmodernebb eljárás a High Intensity Focused Ultrasound (HIFU) + Selected MS/MS Ion Monitoring (SMIM) + Linear Ion Trap (LIT). A módszer legnagyobb előnye, hogy kevesebb, mint 2 óra alatt elvégezhető a parvalbumin szekvenciák azonosítása.

## Tenyésztett és vadvízi állományok összehasonlítása

Bizonyos halfaj populációk egyedszáma tekintélyes mértékben lecsökkent a természetes élőhelyükön, ez visszavezethető a nem szabályozott halászatra és a növekvő népesség haltermékek iránti fokozott igényére. A haltenyésztés biztosíthatja a természetes vizek biodiverzitásának fenntartását és kielégítheti a fokozott fogyasztói igényeket. A haltermelési rendszerek fejlődésével a szükségleteknek megfelelő mennyiségű és a speciális igényeknek is megfelelő minőségű hálhús és haltermékek előállítására van lehetőség.

Proteomikai módszerek segítségével a tenyésztett és vadvízi állományok proteomjának összehasonlítása során vizsgálhatjuk a különböző termelési rendszerek / környezet közötti eltérést. Megállapíthatjuk a környezeti különbségek (víz minőség, hőmérséklet), illetve a különböző takarmányok milyen változást okoznak a fehérje összetételben. Halak esetén is leggyakrabban az izomszövetet használják proteomikai vizsgálatokhoz, mivel könnyen begyűjthető és kereskedelmi szempontból is ez a szövet a legjelentősebb, hiszen ez jelenti a fő terméket.

Az alábbiakban néhány tanulmányon keresztül ismertetjük a halakon végzett, élőhelyhez köthető proteomikai munkát. Atlanti tőkehal kapcsán a post-mortem degradáció sebessége és a vadvízi állomány vs. tenyésztett állomány hatást úgy ismerjük, hogy a tenyésztett populációban gyorsabb a post mortem degradáció és mivel genetikai távolság nem volt a tenyésztett és a vadvízi állomány között, ezért ez a különbség a környezeti különbségből adódik. Ezeknek a tenyésztett egyedeknek a húsa kevésbé kemény, magas a víztartalma, az izomrostok szerkezete is különböző. Lehetséges okként a tenyésztés során fellépő stresszt említik. Az óriás laposhalnál is ugyanezt a jelenséget figyelték meg a tenyésztett állatok izomszövetében, ezen kívül a mitokondriumok szerkezetében is találtak különbséget, valamint abnormális zsírsav lerakódást is tapasztaltak, mely a metabolikus enzimek megváltozott fehérje expressziójára vezethető vissza, ugyanis ez a változás elégtelen zsírsav oxidációt eredményez.

A farkassügér Európa haltenyésztésének egyik fő terméke. SDS-PAGE segítségével kilenc fehérje expressziójában találtak különbséget a tenyésztett és a vadvízi élőhelyről származó halak között. A tömegspektrometriás azonosítást követően megállapították, hogy a szénhidrát metabolizmus enzimeji a tenyésztett állatoknál overexpresszálódtak, míg a kreatin kináz, nukleozid difoszfát kináz B és a parvalbumin expressziója csökkent a tenyésztett állománynál. Ezek alapján megállapítható, hogy a tartási körülmények befolyásolják a tenyésztett állatok izomfejlődését.

Szivárványos pisztráng proteomikai vizsgálata során a dezmin fehérje, ami egy sejtvázas fehérje, expressziója mutat különbséget. Mennyisége kevesebb a tenyésztett állatokban, ezáltal azok húsának kevésbé kedvezőek a húsminőségi paraméterei.

Tengeri sügér esetén is arra a megállapításra jutottak, hogy a tenyésztés hatással van az izom összetételre, mivel a glikolitikus enzimek és parvalbumin frakció expressziója eltérő volt a vadvízi és a tenyésztett állományok között.

Az izomszöveten kívül májból és vérből is lehetséges a fehérje vizsgálatok elvégzése. Ilyen jellegű munka volt, amikor szívárványos pisztrángoknál megállapították, hogy az emelt szójatartalmú táp, valamint a rövid ideig tartó éhezés módosítja a máj proteomjának összetételét.

Aranydurbincs egyedeken tanulmányozták, hogy a hideg hatására hogyan változik a máj proteomja, illetve a melyek a tenyésztés során fellépő stresszhatások fehérjeszintű következményei. Ezek háttérében az áll, hogy a hideg hatására a hepatocitákban oxidatív károsodások alakulnak ki, illetve a máj proteomjában számos fehérje összefüggésbe hozható a stresszel.

A vérplazma mintákat leggyakrabban az immunrendszer feltérképezésére használják a halak esetén.

## **Post-mortem változások**

Az állatok vágását követően az izomszövetben bizonyos kémiai változások mennek végbe, ezeket nevezzük post-mortem változásoknak. A fehérjék szempontjából megkülönböztethetünk enzimátikus és nem enzimátikus módosításokat a post-mortem folyamatok során.

Enzimátikus autolízis esetén a nagyméretű miofibrilláris fehérjék (miozin, aktin, titin) a proteázok enzimátikus aktivitásának hatására kisméretű peptidekre hasadnak (proteolízis). Ez a folyamat nagymértékben meghatározza a hús ízét, textúráját és illatát. A vágás előtti események, mint például a fizikai aktivitás, stressz, meghatározó hatást gyakorol az izom post-mortem tulajdonságaira. Ezek a tényezők befolyásolják a hús glikogén tartalmát, pH változását. A nem enzimátikus módosítások közé sorolhatjuk az oxidációt, karbonilációt, tiol-oxidációt, aromás hidroxilációt, és egyéb folyamatokat. Ezek a reakciók hatással vannak a halhús minőségére, mert megváltoztathatják a fehérjék oldhatóságát, aggregációs képességét és hidrofobitását is.

A tárolási körülmények szintén hatással vannak a post-mortem folyamatokra. A tárolási hőmérséklet például, hatással van a proteolízis mértékére, mert alacsonyabb hőmérsékleten kevésbé aktívak a proteolitikus enzimek. Különböző vizsgálatokból kiderült, hogy a tárolás időtartama nagyobb hatással van a halhús fehérje összetételére, mint a tárolási hőmérséklet. Tőkehalaknál végeztek olyan vizsgálatokat, melyekkel a halhús frissességét próbálták megállapítani. Találtak egy olyan 16 kDa nagyságú fehérjét, mely a tárolási idő

előrehaladtával degradálódik, eltűnik a gélképről, így a degradáció mértékéből megállapítható az eltelt idő. Durbincok esetén is találtak olyan fehérjéket, melyek a tárolási idővel hozhatók összefüggésbe, ezek az alfa-actin és a tropomiozin, melyek a vágást követő 6. napig stabilak, majd degradálódnak. A parvalbumin fehérjéről, mely a fő allergénje a haltermékeknek, megállapították, hogy mennyisége a tárolás során csökken.

Nem csak a tárolás körülményei, hanem maga a vágás is befolyásolja a későbbi húsminőséget. Különböző vágási technikákat, úgy, mint asphyxia levegőn, asphyxia jégben, gerincvelő átvágása, 2D-DIGE módszerrel összehasonlítva az tapasztalható, hogy az izom fehérjeösszetételét tekintve a gerincvelő átvágás a legideálisabb módszer, mert ennél az esetben őrizték meg integritásukat leginkább a fehérjék, aminek valószínűleg az az oka, hogy itt érte a legkevesebb stressz az állatokat.

## **Mikrobiális leromlás, veszteség**

A mikrobiális leromlás az a folyamat, mely során különböző biokémiai változások történnek mikrobiális aktivitás hatására. Ez a jelenség káros, mivel gazdasági veszteséget és súlyos ételmiszer eredetű megbetegedéseket okozhatnak. A folyamat során aminok (pl. hisztamin), alkoholok, ketonok, aldehidek, keletkeznek, melyek kellemetlen ízűek, vagy ízetlenné teszik a húst. Az ételmiszer mikrobiológiában nagy kihívást jelent, hogy megismerjék ezeknek a patogéneknek a viselkedését magában az ételmiszerben. Ehhez nyújthat segítséget a proteomika. Tömegspektrometria-alapú módszerekkel sokféle patogént lehet azonosítani nyers, füstölt és vákuum csomagolt halfélékből.

Ilyen például a *Listeria monocytogenes*, a liszteriózis kórokozója, mely az egyik leggyakoribb ételmiszer útján terjedő baktérium, az általa okozott megbetegedés halálos kimenetelű is lehet. Sikerült megállapítani, hogy a folyékony füst (természetes füstaroma vizes oldata) változást okoz a proteom összetételükben, ezáltal csökkenti a növekedésüket és túlélésüket. Ezzel magyarázható, hogy a füsttel tartósított halfélék fogyasztása esetén ritkán alakul ki liszteriózis.

Hasonlóan ételmiszer-romlást és emberi megbetegedést okoznak az alábbi baktériumok:

- Gram-negatív: *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter baumannii*,  
*Enterobacter spp.*, *Campilobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*;
- Gram-pozitív: *Carnobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Staphylococcus spp.*

## Felhasznált irodalom

- Fidel T., Nollet L. M. L. (szerk.) (2013): Proteomics in Foods: Principles and Applications. Food Microbiology and Food Safety 2. Springer. New York, USA. 1-590.
- Carrera M., Canas B., Callardo J. M. (2013): Proteomics for the assessment of quality and safety of fishery products. Food Research International 51. 972-979.
- Wulffa T. et al. (2012): Time-dependent changes in protein expression in rainbow trout muscle following hypoxia. Journal of Proteomics 75. 2342-2351.
- Addisa M. F. et al. (2012): 2D DIGE/MS to investigate the impact of slaughtering techniques on postmortem integrity of fish filet proteins. Journal of Proteomics 75. 3654 - 3664.
- Ofstad R., Egelanddal B., Kidman S., Myklebust R., Olsen R. L., Hermansson A. M. (1996): Liquid loss as effected by post mortem ultrastructural changes in fish muscle: Cod (*Gadus morhua* L) and salmon (*Salmo salar*). Journal of the Science of Food and Agriculture 71 3. 301-312.