

KÍSÉRLETEK DURUMŐRLEMÉNYEKHEZ ADAGOLT AESTIVUM ŐRLEMÉNY KIMUTATÁSÁRA

PALLAGINÉ DR. BÁNKFALVI EMESE*

Az utóbbi években számos közlemény jelent meg a durum őrleményekhez adagolt aestivum őrlemény kimutatásának és mennyiségi meghatározásának lehetőségeiről. A két búzafaj megkülönböztetésére az elektroforetikus módszer eredményesen alkalmazható. A hexaploid és tetraploid búzák genetikailag meghatározott, eltérő fehérje összetételéről elektroforetikus elválasztásokkal jól értékelhető, szemléletes képet nyerhetünk.

CUBADDA 1972-ben egy poliakrilamid disc elektroforetikus módszert írt le, mellyel 2%, 7%, 10%, 15% és 25% aestivum adalék kimutatását oldotta meg durum darákból. Vizsgálataihoz 7,5%-os gélkonzentrációt alkalmazott. Nem a teljes sóoldékony frakciót vizsgálta, hanem annak egy speciálisan elkülönített részét, a 0,13 mol $MgSO_4$ oldatban 6,1 pH-nál oldódó albuminokat. Így a meghatározást nem zavarta a teljes extraktumban előforduló fehérje frakciók nagy száma, amelyek között sok a hasonló elektroforetikus mozgékonyágú, ami a kiértékelést jelentősen megnehezíti.

Kísérleti munkánk során először CUBADDA módszerét próbáltuk reprodukálni. Ezt követően olyan eljárást dolgoztunk ki, mellyel a két búzafaj megkülönböztetése sikérfehérjéik eltérő polipeptidlánc összetételének kimutatása alapján történik.

1. Vizsgálati anyagok: GK-Minařet durum búza
Jubilejnaja 50 aestivum búza

A búzaminták aprítását QC—107 Univerzális aprítón végeztük, 600—700 μ részecskeméretig. Ezután 5%, 10%, 15%, 20% aestivum őrleményt tartalmazó keverékeket állítottunk össze. 50—50 g keveréket készítettünk, a keverékeket dörzszomsárban homogenizáltuk.

2. VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

2.1. Albumin frakciók előállítása

A vizsgálandó mintákból 8—8 g-ot táramérlegesen lemértünk és 50,0 cm³ 0,13 mól $MgSO_4$ oldatot adtunk hozzá, majd 1 órán keresztül mágneses keverővel kevertük. Ezután 20 percig centrifugáltuk 3500 ford./perc fordulatszámmal. A felülúszó fázis tartalmazta az albuminokat, a maradék a sikérfehérjét és a keményítőt. A felülúszó

* Kémia Osztály

pH-ját 6,1-re állítottuk be, majd annyi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -et adtunk hozzá, hogy az oldat koncentrációja $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -re 1,2 mol legyen. Ezután hűtőszekrényben $+4^\circ\text{C}$ -on 12 órán keresztül állni hagytuk. Az albumin frakció csapadék formájában elkülönült. A csapadékos oldatot 4500 ford./perc fordulattal 20 percig centrifugáltuk. A felülülő fázist elöntöttük.

Az albumin frakciót újraoldással és dialízissel tisztítottuk, majd liofileztük. Az így nyert fehérjéből 5 mg-ot oldottunk 1 cm^3 2% β -merkaptotetanolt és 2,5% SDS-t (nátrium-dodecil-szulfát) tartalmazó pH 8,3-as trisz-glicin pufferben.

2.2. Sikérfehérje frakciók előállítása

A vizsgálandó mintákból 20—20 g-ot táramérlegesen kimértük és 10 cm^3 csapvízzel porcelán mozsárban tésztaává gyúrtuk. 30 percen keresztül vizes főzőpohárral letakarva pihentettük, majd csapvízzel keményítőmentesre mostuk. Az így nyert sikércsomóból a vizet kinyomkodtuk, majd 50 mg-os részletét $3,0\text{ cm}^3$ 2%-os β -merkaptotetanolt és 2,5% SDS tartalmú elektródpufferben oldottuk.

2.3. Poliakrilamid gélelektroforézis

A nátrium-dodecil-szulfátos poliakrilamid gélelektroforézist LAEMMLI (1970) szerint végeztük, pH 8,3-as trisz-glicin pufferben 10%-os gélkoncentrációval.

2 mm vastagságú 10×14 cm-es méretű géllapokat készítettünk. Egy minta helyre $20\ \mu\text{l}$ fehérjeoldatot vittünk fel. Az elektroforézist vertikális lapelektroforézis készülékben 50 mA-en 14 órán keresztül végeztük. Az elválasztott fehérjezónákat a géllap 12%-os triklórecetsavba merítésével rögzítettük, majd Comassie-Brillant-Blue G—250 színezéssel festettük.

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

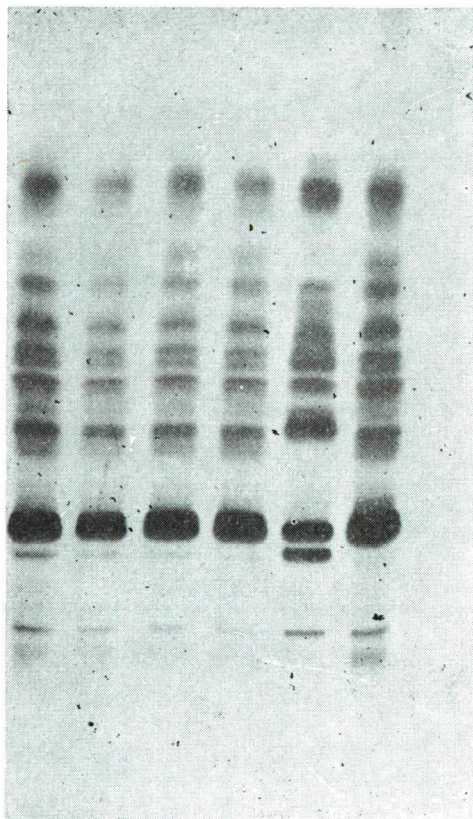
Az 1. ábrán bemutatjuk az aestivum és durum örleményekből és keverékekből nyert albumin frakciók gélképét. A tisztított, redukált albumin frakciók sok eltérő mozgékonyaságú polipeptidláncot tartalmaznak és csak egy olyan polipeptidláncot tudunk kimutatni, amely az aestivum minta jellemző és a durum örlemény nem tartalmazza. A képen jól látható, hogy ez az (E)-vel jelölt zóna színintenzitása az aestivum tartalom növelésével növekszik.

A 2. ábrán bemutatjuk az aestivum és durum örlemény sikérjének nátrium-dodecil-szulfátos poliakrilamid gélelektroforézisének gélképét (a kép jobb szélén ismert molekulatömegű standardok képe látható). A két fajta redukált sikérfehérjének polipeptidlánc összetétele jelentős eltéréseket mutat. Az aestivum minta képen 1, 4, 5-tel jelölt polipeptidláncokkal egyező mozgékonyaságú zóna a durum mintából nem mutatható ki. Így ezek megjelenése esetén a durum örleményhez kevert aestivum örlemény jelenlétére következtethetünk.

A 3. ábrán bemutatott 5%, 10%, 15% és 20% aestivumot tartalmazó durum örlemények sikérjéből az 1. és 4-gyel jelölt aestivum búzára jellemző polipeptidlánc jól kimutatható, az 5. csak a nagyobb aestivum tartalmú mintákból.

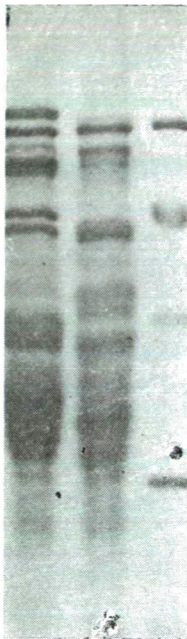
Ha géllapra felvitt minta mennyiségét kétszeresére növeltük (20 µl helyett 40 µl-t vittünk fel) az azonosításhoz használható zónák kimutathatósága javult, és az 5. jelzésű zóna is észlelhető már az 5% aestivum tartalom esetén is.

Eredményeink alapján a SDS-PAGE módszert használhatónak találtuk durum őrlemények aestivum adalék kimutatására. A továbbiakban szeretnénk a módszert úgy finomítani, hogy 5%-nál kevesebb aestivum lisztet tartalmazó durum őrlemények vizsgálatára is használható legyen.



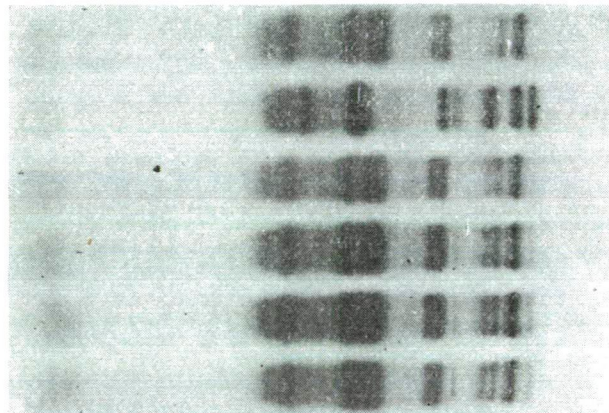
1. ábra. Durum és aestivum őrlemények és keverékeik albumin frakciói SDS-PAGE elválasztásának gélképei (balról jobbra: durum őrlemény, aestivum őrlemény 5%, 10%, 15%, 20% aestivum tartalmú keverékkel)

A sükérfehérjék gélelektroforézises vizsgálata gyorsabban és kevésbé munkaigényes mint az albumin frakció vizsgálata. Ezen túlmenően a sükérfehérjék elválasztása során több olyan polipeptidlánc mutatható ki, amely az aestivum búza jelenlétét bizonyítja. Ezek a gélképek denzitometrállás után alkalmasak lehetnek a keverékek aestivum tartalmának jó közelítéssel történő becslésére.



<i>A</i>	<i>B</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>Mt</i>
		1/≡	≡	— 94 000
		4/≡	≡	
		5/≡	—	— 67 000
				— 43 000
				— 36 000

2. ábra. *Triticum durum* (*B*) és *triticum aestivum* (*A*) búzalisztek sikérfehérjéinek SDS-PAGE elválasztása



3. ábra. Durum és aestivum őrlemények és keverékek sikérfehérjéinek SDS-PAGE elválasztásának elektroferogramja
(balról jobbra: durum őrlemény, aestivum őrlemény, 5%, 10%, 15%, 20% aestivum tartalmú keverékek)

IRODALOM

1. *Cubadda, R.*: Anwendung elektrophoretischer Methoden dem Nachweis und Bestimmung von Weichweizenprodukten in Hartweizen und Teigwaren Granum Verlag, Detmold (1972).
2. *Laemmli, U. K.*: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 Nature, 227, 680—685 (1970).

ATTEMPTS TO DETECT AESTIVUM MILLINGS AS AN ADDITIVE IN DURUM MILLINGS

Dr. Emese Bánkfalvi-Pallagi

Hexaploid and tetraploid wheats have different genetically determined protein compositions. It is therefore possible to differentiate these two wheat species by gel-electrophoretic study of their protein compositions.

SDS-PAGE separation was carried out on the albumin and gluten protein fractions of durum millings containing 5, 10, 15 or 20% aestivum millings.

The durum and aestivum wheats can be differentiated on the basis of the resulting gel pictures, and the aestivum contents of the mixtures can be detected and estimated. Gel-electrophoretic study of the gluten proteins is more advantageous than study of the albumin fractions from the aspects of both time requirements and reproducibility.

VERSUCHE ZUM NACHWEIS DES AESTIVUM-MAHLPRODUKTES BEI DEN DURUMMAHLPRODUKTEN

Dr. Emese Bánkfalvi-Pallaginé

Die genetisch bestimmte Eiweisszusammensetzung der Hexaploid- und Tetraploidweizenarten ist verschieden. Eben darum können die zwei Weizenarten durch gelelektroforesische Untersuchung von einander unterschieden werden.

Im Laufe unserer Untersuchungen führten wir die SDS-PAGE Separation mit Hilfe der Albumin- und Klebereiweissfraktionen der Durummahlprodukte durch, die 5, 10, 15, 20% Aestivummahlprodukte enthalten.

Auf Grund der erhaltenen Gelbilder sind die Durum- und Aestivumweizen zu unterscheiden, der Aestivumgehalt der Mischung ist nachweisbar und schätzbar. Die gelelektroforesische Untersuchung des Klebereiweisses ist in Anbetracht sowohl der Zeitdauer als auch der Reproduktionsmöglichkeit vorteilhafter als die Untersuchung der Albuminfraktionen.

ЭКСПЕРИМЕНТЫ ДЛЯ ПОКАЗА ЭЗТИВНОГО ПОМОЛА, ДОБАВЛЕННОГО К ПОМОЛУ ПШЕНИЦЫ ДУРУМ

Паллагине д-р Эмеше Банфалви

Определенный состав белков генетически различен у гексаплоидной и тетраплоидной сортов пшеницы. Поэтому различие двух сортов пшеницы по составу белка возможно на основе гелеэлектрофоретического исследования.

В ходе нашей экспериментальной работы помол пшеницы дурум, содержащий 5, 10, 15, 20% эзтивного помола, мы провели разделение фракциями альбумина и клейковины белка (разделение SDS—PAGE).

На основе полученной картины гелей пшеница дурум и эзтив различимы, содержание эзтива можно выявить и определить. Гелеэлектрофорезное исследование клейковины белков имеет большее преимущество как с точки зрения затраты времени, так и по воспроизводимости чем исследование альбумин-фракций.