

KANDIDÁTUSI ÉRTEKEZÉS

EGYES GABONAFÉLÉK BIOKÉMIAI JELLEMZÉSE AZ
AMINOSAVAK ÉS SZÁRMAZÉKAIK ANALIZISE ALAPJÁN

SIMONNÉ SARKADI LIVIA

BUDAPESTI MŰSZAKI EGYETEM
BIOKÉMIAI ÉS ÉLELMISZERTÉCHNOLÓGIAI TANSZÉK

BUDAPEST

- 1990 -

B 3027

TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
1. BEVEZETÉS	1.
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4.
2.1. A kukoricafehérjék jellemzése	4.
2.2. A kukoricafehérjék emészthetősége	8.
2.3. A kukoricafehérjék táplálkozástani értéke	13.
2.4. A vízhiánnyal, mint környezeti stressz- hatással összefüggő elméleti ismeretek	18.
2.4.1. Az ozmoreguláció során végbemenő változások	18.
2.5. Az aminosavak és a poliaminok analitikája	21.
2.5.1. A fehérjékben kötött aminosavak felsza- badítása	21.
2.5.1.1. Fehérje hidrolizis savakkal	23.
2.5.1.2. Fehérje hidrolizis lúgokkal	24.
2.5.1.3. Oxidációt követő hidrolizis	25.
2.5.2. A szabad aminosavak kinyerése	26.
2.5.3. A poliaminok kinyerése	26.
2.5.4. Az aminosavak és a poliaminok kromatog- ráfiás meghatározása	27.
2.5.4.1. Az aminosavak rétegekromatográfiás el- választása	27.
2.5.4.2. Az aminosavak oszlopkromatográfiás elválasztása	29.
2.5.4.3. A szabad aminosavak kromatográfiás meghatározása	30.
2.5.4.4. A poliaminok rétegekromatográfiás meghatározása	30.
2.5.4.5. A poliaminok oszlopkromatográfiás meghatározása	31.
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	33.
3.1. Biológiai vizsgálati anyagok	33.
3.1.1. A vizsgált kukoricafajták	33.
3.1.2. A szárazságstressz vizsgálatokhoz alkal- mazott búzafajták és vonalak	34.
3.2. Kémiai vizsgálati anyagok	34.
3.3. Vizsgálati módszerek	35.
3.3.1. A kukoricafajták nedvességtartalmának meghatározása	35.

3.3.2.	A kukoricafajták fehérjetartalmának meghatározása	35.
3.3.3.	A kukoricafehérjék oldószeres frakcionálása	36.
3.3.4.	A kukoricafehérjék aminosav-összetételének meghatározása	36.
3.3.4.1.	Mintaelőkészítés a teljes aminosav-összetétel meghatározásához	36.
3.3.4.2.	Mintaelőkészítés a cisztein meghatározásához	37.
3.3.4.3.	Az aminosavanalízis körülményei	38.
3.3.4.3.1.	A teljes aminosav-összetétel meghatározása túlnyomásos rétegekromatográfiával (OPLC)	38.
3.3.4.3.2.	A teljes aminosav-összetétel meghatározása aminosavanalizátorral	39.
3.3.4.3.3.	Ciszteinsav meghatározás	39.
3.3.5.	A kukoricafehérjék emészthetőségének meghatározása	40.
3.3.6.	A kukoricafehérjék <u>in vitro</u> biológiai értékének számítása	40.
3.3.7.	A szárazságtűrés vizsgálata búza kallusztenyészetekben	41.
3.3.7.1.	A szárazságtűrési kísérletek kiindulási anyagának előállítása	41.
3.3.7.2.	A kalluszok szárazanyagtartalmának és növekedési rátájának meghatározása	43.
3.3.7.3.	A kalluszok szabad aminosavtartalmának meghatározása	43.
3.3.7.4.	A szabad poliaminok meghatározása	43.
3.3.7.5.	Proteolitikus enzimaktivitás vizsgálatok	44.
3.3.7.6.	A kalluszok fehérjetartalmának meghatározása	46.
3.3.7.7.	Alkalmazott statisztikai módszerek	46.
4.	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	47.
4.1.	A kukoricafajták vizsgálatának eredményei	47.
4.1.1.	Nedvesség- és fehérjetartalom	47.
4.1.2.	A kukoricafehérjék aminosav-összetétele	48.
4.1.3.	A kukoricafehérjék emészthetősége és biológiai értéke	55.

4.1.4. A kukoricafajták fehérjefrakcióinak aminosav-összetétele	59.
4.2. A búza szárazságtűrésének vizsgálatával kapcsolatos eredmények	66.
4.2.1. A búzafajták vizsgálatának eredményei	67.
4.2.1.1. A búzafajták kalluszainak szárazanyag-tartalma	67.
4.2.1.2. A búzafajták kalluszainak növekedési rátája	68.
4.2.1.3. A búzafajták kalluszainak szabad aminosavtartalma	69.
4.2.1.4. A búzafajták kalluszainak szabad poliamintartalma	76.
4.2.1.5. A búzafajták kalluszainak extrahálható fehérjetartalma	78.
4.2.1.6. A proteolitikus enzimaktivitás vizsgálatok eredménye	80.
4.2.2. A szubsztitúciós sorozat vizsgálatával kapott eredmények	84.
4.2.2.1. A szubsztitúciós sorozat szárazanyag-tartalma és növekedési rátája	84.
4.2.2.2. A szubsztitúciós sorozat szabad aminosavtartalma	87.
4.2.2.3. A szubsztitúciós sorozat poliamintartalma	95.
4.2.2.4. A szubsztitúciós sorozat extrahálható fehérjetartalma	99.
4.2.2.5. A proteolitikus enzimaktivitás mérések eredményei	99.
5. ÖSSZEFOGLALÁS	103.
6. IRODALOM	108.

1. BEVEZETÉS

A gabonafélék alapvető fontosságú élelmezési, takarmányozási, valamint ipari alapanyagok. Sokoldalú felhasználásuk megköveteli az egyre értékesebb fajták nemesítését, a termesztési és feldolgozási technológiák fejlesztését.

A gabonafélék nemesítési célkitűzései általában a termőképesség növelésére, a beltartalom (elsősorban a fehérjetartalom és minőség), az ellenállóképesség (télállóság, szárazságtűrés, betegség-rezisztencia) javítására irányulnak. A megvalósításhoz szükség van a gabonafélék biokémiájával kapcsolatos kutatások elmélyítésére.

A gabonaféléket, mint fő táplálkozási forrásokat elsősorban táplálkozástani minőségük alapján jellemezhetjük. E minőséget nagyon sok tényező befolyásolja, a különböző kémiai paraméterek (szénhidrát-, lipid-, fehérjetartalom), a fiziológiai jelleg (a fogyasztó neme, életkora), a társadalmi szokások, stb. A minőség megállapítása azonban elsősorban a fehérjetartalom alapján történik. A sokoldalú funkciót ellátó, rendkívül változatos összetételű fehérjék tulajdonságait, biológiai értékét az alkotó aminosavak minősége, mennyisége, hozzáférhetősége határozza meg.

Az aminosavak analízise révén egyrészt a fehérjék sajátosságáról, összetételéről kaphatunk információkat, másrészt a fehérjemetabolizmusról és az ezzel esetleges összefüggésben lévő olyan növényfiziológiai jelenségekről, amelyek mind a gabonanemesítőket, mind a felhasználókat érdekelhetik.

A termesztett gabonafélék közül a legfontosabbnak tekinthető búza kémiai-biokémiai vizsgálata régmúltra tekint vissza, s a széleskörű kutatások eredményeképpen

meglehetősen alapos ismeretekkel rendelkezünk a búza-fehérjékre vonatkozóan.

A kukoricafehérjék vizsgálatára azonban kevesebb figyelmet fordítottak, pedig jelentőségük az ipari felhasználás mellett a humán táplálkozásban is egyre növekszik. A kukorica táplálkozástani, technológiai értékének megállapítását elősegítő minőségi előírások kidolgozása is jelentősen elmaradt a búzáéhoz képest. Sok esetben a kukoricafehérjékre vonatkozó megállapítások hiányos analitikai adatokra épülnek. Mindezek ismeretében szükséges e területen a kutatások meggyorsítása.

A jó beltartalmi minőségű gabonafélék előállítása mellett a gyakorlat szempontjából fontos a megfelelő termésmennyiség biztosítása is. A fajták termésbiztonságát kialakító tulajdonságok egyike a stresszrezisztencia. Magyarország éghajlatát figyelembe véve, nagy szerep jut a szárazságtűrő gabonafélék nemesítésének és termesztésének. A melegedő éghajlati viszonyainkhoz alkalmazkodni képes gabonafajták előállítása a búza esetében a legsürgetőbb feladat. E munkának fontos előfeltétele a szárazságstressz hatására létrejövő biokémiai folyamatok tisztázása, melyhez jól felhasználhatók az aminosavak és származékaik vizsgálatával kapott eredmények.

A szárazságstressz modellezése legegyszerűbben szövettenyészetekkel végezhető el. A sejt és szövettenyésztés módszerének fejlődése ma már a búzafaj esetén is lehetővé teszi kallusztényeszetek indukálását intenzíven osztódó szövetekből, embriókból. Szövettenyészetek esetén valamilyen környezeti paraméter beállítható és a fitotronban szabályozott körülmények között végezhető a kísérletek.

Értekezésemben összefoglalt kutatások irányait az előbbieken jelzett feladatok határozták meg.

A kukoricafajtákkal kapcsolatos kutatások célja a kukoricafehérjékre vonatkozó, adatbázist növelő vizsgálatok elvégzése volt, valamint a kukoricafehérjék jellegzetességeinek feltárása az aminosav-összetétel alapján.

A búza szárazságtűrésének vizsgálatára vonatkozó kísérletekkel a következő kérdések tisztázása volt a célom:

Az ozmotikus sokk alkalmazása megfelelő módszer-e a búza szárazságtűrésének modellezésére in vitro szövettenyészetekben?

Milyen biokémiai paraméterekkel jellemezhető a szövettenyészetek ozmotikus adaptálódó képessége?

Genotípustól függnék-e a létrejövő változások?

A szisztematikusan felépített szubsztitúciós sorozat elemzése révén kiválaszthatók-e a szárazságtűrésért felelős kromoszómák?

A sokrétű kísérleti munka számtalan analitikai módszer alkalmazását igényelte, valamint több esetben szükségessé tette a módszerek továbbfejlesztését, illetve új eljárások kidolgozását.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A kukoricafehérjék jellemzése

Irodalmi adatok szerint a kukoricaszem fehérjetartalma meglehetősen széles határok között változhat (9,7-10,7% /Robutti és társai, 1974/, 8,6-9,6% /Lásztity, 1975/, 9,8-12,1% /Gerstenkorn és Zwingelberg, 1976/, 10,3-17,7% /Rutz, 1977/, 6-15% /Rending és Jimenez, 1978/).

A kukoricaszem fehérjetartalma három fő szerkezeti rész a héj, a magbelső és a csíra fehérjetartalmából adódik össze. A szem kis részét képező héj fehérjetartalma 4-6%, a legnagyobb részt adó magbelsőé 8-9%, míg a csíráé 17-20% /Lásztity, 1984/.

A teljes kukoricaszem aminosav-összetételével foglalkozó irodalom igen nagy. A klasszikus munkák egyike Bressani és Mertz közleménye /1958/, amelyben különböző fajták összehasonlító vizsgálatát találjuk. A kukoricafehérjék aminosav-összetételére a limitáló triptofán- és lizin-szintek jellemzőek. Mertz és társai /1964/ felfedezése óta - miszerint az opaque-2 mutáns gén jelentősen megnöveli a lizin és triptofán arányát a fehérjén belül - számos genetikai és kombinált genetikai-agrotechnikai próbálkozás történt a kukoricaszem aminosav-összetételének javítására.

Különböző kukoricafajták szemtermésének aminosav-összetételét tartalmazza az 1. táblázat, mely jól tükrözi a fenti megállapításokat.

A kukoricaszem magbelsőjében lévő fehérjéket tartalékfehérjékre és metabolikusan aktív fehérjékre oszthatjuk.

1. táblázat

Különböző kukoricafajták szemtermésének aminosav-összetétele (g/16 gN)

Aminosav	a	b	c	d		e			
				SC 3365 HL f	Krasznodari 82 HL f	Single Cross g	Mv 580 SC f	NSSC 533 Wx h	Kb. DC 268 i
Asp	7,82	6,39	7,87	8,28	7,22	4,95	10,68	6,72	8,75
Thr	3,63	3,64	3,56	4,48	3,24	3,53	4,50	2,83	9,93
Ser	4,24	4,72	5,43	6,57	3,84	3,98	4,94	4,30	4,38
Glu	16,82	20,67	19,40	20,63	17,70	16,62	22,53	16,90	20,08
Pro	8,72	8,99	10,09	8,93	8,39	9,67	10,03	8,27	10,03
Gly	4,82	3,72	4,48	5,78	6,02	3,22	4,71	3,38	4,30
Ala	5,96	7,27	7,79	7,23	4,82	7,01	8,72	6,55	8,82
Cys	1,28	1,03	0,54	1,47	0,91	0,99	1,25	1,28	1,76
Val	5,22	4,89	3,33	5,62	4,62	2,81	5,19	4,66	3,78
Met	1,88	2,26	2,18	1,46	1,26	1,62	1,82	1,61	2,44
Ile	3,29	3,56	2,23	3,40	2,99	2,51	3,13	2,55	3,13
Leu	8,63	12,61	11,27	9,83	10,28	10,86	14,39	11,75	13,17
Tyr	3,55	4,42	3,86	3,02	3,32	3,01	3,51	2,91	4,27
Phe	3,99	5,01	4,84	4,89	4,13	4,35	5,14	4,40	4,32
Lys	4,18	2,96	3,17	5,04	3,78	2,93	3,40	3,30	3,75
His	3,58	2,97	2,58	3,33	4,97	2,99	3,30	2,93	3,62
Trp	0,96	0,87	nd	1,48	1,24	1,00	1,11	1,00	1,72
Arg	6,86	4,54	4,91	6,48	4,33	3,78	4,48	4,97	6,18

a = Eggum és társai /1979/

b = Geervani /1985/

c = Subramanyam és társai /1980/

d = El-Kady és társai /1983/

e = El-Kady és társai /1983/

f = magyar fajta

g = egyiptomi fajta

h = jugoszláv fajta

i = lengyel fajta

nd = nem mérték

Eltérő oldhatóságuk alapján albuminokat, globulinokat, prolaminokat (zein) és glutelineket különíthetünk el. A különböző frakciók mennyisége meglehetősen változó. Ezen belül a tartalékfehérjék (zein, glutelin) aránya a legnagyobb /Lásztity, 1981; Lásztity, 1984/.

A kukoricafajták fehérjeeloszlásának egy jellemző összefoglalását mutatja a 2. táblázat.

A kukoricaszem fehérjefrakcióinak aminosav-összetétele a 3. táblázatban látható.

Az aminosav-összetétel alapján jellegzetesen különböznek egymástól az albumin, globulin, valamint a zein és glutelin frakciók. Az első kettőben több az Arg, kevesebb a Glu, a Pro, a Leu és a Tyr mennyisége. A zein jellegzetesen szegény lizinben, aszparaginsavban és glicinben, viszont nagyobb koncentrációban található benne a hidrofób aminosavak (Leu, Pro, Ala, Phe) /Baudet és társai, 1966/.

Amennyiben a zeinben szegény, de lizinben gazdag kukoricafajtákkal kapcsolatos kérdések (hozam, ellenállóképesség, stb.) megoldódnak, ezeknek a fajtáknak jelentős szerepe lehet a takarmányozásban és a humán célú felhasználásban egyaránt.

2. táblázat

A kukoricaszem fehérjéinek frakcióeloszlása,
az összfehérje százalékában

Forrás	Frakciók				
	*Nem fehérje nitrogén **Oldhatatlan maradék	Albumin	Globulin	Zein	Glutelin
Zeleny /1935/	*4,57	1,71	7,82	42,0	16,9
Nagy és társai /1941/	* ←—————17,4—————→			37,8	37,1
Baudet és társai /1966/	*6,25	←—————14,0—————→		36,3	-
Landry és Moureaux /1970/	* ←—————19,0—————→			40,0	37,0
Wall és társai /1975/	* ←—————21,0—————→			37,0	30,0
Hekschné (9 magyarországi fajta átlaga)/1978/	-	22,7	15,6	24,5	37,2
El Kady és Lásztity /1981/ (6 egyiptomi fajta átlaga)	**17,25	14,55	13,32	26,87	28,02
El Kady és Lásztity /1981/ (6 magyarországi fajta átlaga)	**17,17	14,98	11,38	30,75	25,73
El Kady és Lásztity/1981/ (6 jugoszláviai fajta átlaga)	**18,1	13,57	8,85	27,8	31,73
El Kady és Lásztity/1981/ (6 lengyelországi fajta átlaga)	**22,95	13,12	9,33	30,08	24,52

3. táblázat

A kukoricaszem fehérjefrakcióinak aminosav-
összetétele

/Paulis, 1982/

Aminosav	g/100 g fehérje			
	Albumin	Globulin	Zein	Glutelin
Lys	5,6	5,3	0,2	3,1
His	2,2	3,4	4,3	3,3
NH ₃	1,4	1,4	3,4	3,4
Arg	6,7	11,2	2,1	4,9
Asp	8,4	6,7	4,8	7,2
Thr	4,5	2,8	3,4	4,2
Ser	4,2	4,6	5,5	4,9
Glu	11,1	14,7	26,5	19,1
Pro	4,3	3,2	8,1	8,7
Gly	5,3	4,2	2,5	4,6
Ala	6,0	4,3	8,9	6,8
Val	5,0	4,9	3,6	5,2
Met	1,3	0,9	1,5	3,7
Ile	3,2	2,6	3,9	4,2
Leu	5,6	5,1	19,4	11,4
Tyr	3,1	2,8	5,8	5,4
Phe	3,1	4,1	7,1	4,0

2.2. A kukoricafehérjék emészthetősége

A fehérje minőségének egyik fontos jellemzője a fehérje emészthetősége, mely definíciószerűen az abszorbeált és felvett nitrogén hányadosát jelenti. A fehérjemínősítési vizsgálatok történhetnek in vivo - élő állatok felhasználásával - és in vitro - mesterséges laboratóriumi körülmények között végzett - módszerek segítségével.

A biológiai módszerek előnye, hogy ezek tükrözik legjobban a valóságos emésztési viszonyokat, ellentétben a kémiai módszerekkel, melyek csak közelítő modelljei lehet-

nek egy biológiai folyamatnak. Az in vivo kísérletek azonban meglehetősen költségesek, a mérés időigénye nagy, és egy-egy fajon elvégzett kísérlet eredményei nem adaptálhatók közvetlenül más állatfajra /Bodwell és társai, 1980/.

Az in vitro kémiai módszerekkel, a biológiai rendszereket többé-kevésbé utánzó laborkörülmények között, rövid idő alatt meghatározható az emészthetőség.

Az emésztést egy vagy több enzimmel végzik és a bomlásterméket detektálják. Az alkalmazott módszerek különböznek mind a felhasznált enzim minőségét, mind pedig a detektálás módját illetően.

A Magyar Szabvány (MSZ 6830/5-77) az emészthető fehérje meghatározásához pepszines emésztést ír elő. A mérés elvileg hibás, a bemérés nem veszi figyelembe az enzim-szubsztrát arányt, a kapott értékek az anyag fehérjetartalmától is függenek, nemcsak a fehérje emészthetőségétől. A módszer másik hibája, hogy a gyomorban lejátszódó folyamatokat mellezi, míg a valóságban a fehérjék emésztése a gyomorban csak elkezdődik, ám lényegében a vékonybélben zajlik le.

Saunders és társai /1973/ által kifejlesztett két-enzimes in vitro eljárás igen jól korrelált az in vivo nyert emészthetőségi adatokkal.

Ismertek három proteolitikus enzimet alkalmazó eljárások is /Hsu és társai 1977, 1978/. A szerzők által kidolgozott gyors és egyszerű emészthetőségi teszthez tripszin, kimotripszin és peptidáz multienzim oldatot alkalmaztak, és az emészthetőséget a felszabaduló karboxil csoportok által okozott pH-esésből számították.

Satterlee és társai /1981/ négy enzimet használtak az emésztés során, de nem kaptak jobb korrelációt az in vivo adatokkal, mint a Hsu-féle hármas enzimrendszer esetén.

A Pedersen és Eggum /1983/, valamint Salgó és társai /1985/ által kifejlesztett pH-sztat módszer alkalmazásával elkerülhetők a pH-eséses eljárásnál felmerülő problémák. A pH állandó 8-as értéken tartása biztosítja az enzimek optimális pH tartományban való működését, valamint visszaszorítja az aminocsoportok disszociációját. Így valóban csak egy hatás, a proteolízis során felszabaduló karboxil végcsoportok által létrehozott változás mérhető. Ezenkívül a pH-sztat modell jobban közelíti a valódi emésztési viszonyokat is.

A 4. és 5. táblázat különböző fehérjék in vivo és in vitro emészthetőségi adatait tartalmazza.

A kukoricafehérjék emészthetősége, mint általában a gabonafehérjéké közepesnek tekinthető.

4. táblázat

Különböző fehérjék in vivo emészthetőségi adatai

Paraméter	Fehérje						
	Búza	Kukorica	Árpa	Rozs	Szója	Kazein	Tojás
Valódi emészthetőség (TD) %	89,6 _a 90,9 _b 86 _c 90,7 _d 85,9-93,9 _f	87,6 _a 90,3 _b 85 _c 95,7 _d 72-80 _e 88,2-95,5 _f 81,6-91,3 _g	82 _a 84,6 _d	77 _a 79,4 _d	90,7 _a 90,5 _b 83 _c 72,1-78,7 _f	95,3 _a 96,3 _b	100,6 _a 97 _b 97 _c

a = Eggum /1968/

b = FAO /1970/

c = FAO/WHO/UNU /1984/

d = Geervani /1985/

e = Juhász és társai /1985/

f = Salgó és társai /1985/

g = Walger-Kunze /1985/

Különböző fehérjék in vitro emészthetőségi adatai

Paraméter	F e h é r j e					
	Búza	Kukorica	Árpa	Szója	Kazein	Tojás
Valódi emészthetőség (TD) %	87,3-94,8 _g	77,4-82,1 _e 85,5-95,1 _g 83,4-94,8 _h	87,7-88 _d 84-91 _f	79,7-82,5 _b 77-81 _c 92,2-93,2 _d 70,5-78,8 _g	89,2 _a 97,1-100,1 _f	82,2-88,5 _b 88,3-94,4 _f

a = Hsu és társai /1977/

b = Marshall és társai /1979/

c = Rich és társai /1980/

d = Pedersen és Eggum /1981/

e = El-Kady és társai /1983/

f = Pedersen és Eggum /1983/

g = Salgó és társai /1985/

h = Sharobeem és társai /1985/

2.3. A kukoricafehérjék táplálkozástani értéke

A táplálékfehérje minőségét a táplálni kívánt élőlény aminosavigénye, vagyis a fehérje által reprezentált aminosavak mennyisége, minősége, arányai határozzák meg. Ezenkívül fontos tényező, hogy a fehérje megfelelő mértékben elbontható, azaz jól emészthető legyen.

A fehérjék táplálkozástani minőségének mérésére kétféle metodikát alkalmaznak. Az in vivo módszerek etetési kísérleteken, az in vitro eljárások alapvetően kémiai méréseken alapulnak.

A táplálkozási, etetési kísérleteken alapuló módszerek a biológiai hasznosulás közvetlen meghatározására alkalmasak. Hátrányuk a költségesség, az időigényesség, és a biológiai kísérleteknél jelentkező viszonylag nagy szórás, valamint a kísérleti körülmények nehézkes standardizálása.

A biológiai módszerek két nagy csoportra oszthatók, a szervezet súlyváltozásának követésén alapuló módszerekre (Fehérjehatékonysági arány /PER/, Nettó fehérje arány /NPR/, Nitrogén növekedési index /NGI/, Bruttó fehérje érték /GPV/), illetve a szervezet nitrogén-egyensúlyának mérésén alapuló módszerekre (Biológiai érték index /BVI/, Fehérjehasznosítás /NPU/, Emészthetőség /D/ stb.).

A fentiekről részletes ismertetés Hegedűs és társai /1981/ közleményében található.

A kémiai módszerek (indexek) számtalan változata ismert, ami egyben jelzi is, hogy igazán elfogadható, univerzális matematikai modell még nem került kidolgozásra.

A gabonafélék jellemzéséhez gyakran alkalmazzák a limitáló aminosavak minimum törvényén alapuló módszereket (Chemical Score, FAO/WHO, Esszenciális Aminosav Index /EAA/, Módosított Esszenciális Aminosav Index /MEAA/, Korpáczy Index). Az indexszekkel kapcsolatos véleménykülönbségek még ma sem tisztázódtak. A fenti indexszekkel kapcsolatban a figyelembe vett esszenciális aminosavak megválasztása, a nem esszenciális aminosavak jelenlétének figyelmen kívül hagyása miatt merülnek fel problémák.

A másik sokszor alkalmazott Mørup-Olesen index esetén, ahol az in vivo biológiai érték adatokkal maximális korrelációs együtthatóval rendelkező függvény megadása a cél, és ahol az index a fehérje esszenciális aminosavainak függvénye, a számításnál alkalmazott reciprokképzés vitatott.

A Gauss típusú indexek a TGI (Transzformált Gauss Index), illetve a TGICD (Emészthetőséggel Korrigált Transzformált Gauss Index) számításakor nagyobb differenciálásra van lehetőség, mivel a mennyiségi szempontok mellett a minőségi mutatókat is figyelembe veszi /Békés és társai, 1984/.

A fentiekről részletesebb összefoglaló a Hidvégi és Békés /1985/ közleményében található.

A fehérjeminőség meghatározásának in vivo és in vitro módszerei körül jelenleg is élénk viták folynak. A mindennapi gyakorlatban az aminosav-összetételi adatokat, illetve a multienzimés emészthetőségi vizsgálatok eredményeit felhasználó fehérjeminőség meghatározási módszerek elterjedése várható.

A 6. és 7. táblázatban különböző fehérjék in vivo és in vitro táplálkozástani minősége látható.

A kukoricafehérjék táplálkozástani szempontból nem teljes értékűek, minőségük közepes.

6. táblázat

Különböző fehérjék in vivo táplálkozástani értéke

Paraméter	F e h é r j e							
	Búza	Kukorica	Rizs	Árpa	Rozs	Szója	Kazein	Tojás
Biológiai érték % (BV)	59 _a 58-67 _b 68,2 _c 64,7 _d	58,1 _a 53-60 _b 62,4 _c 59,4 _d 64,09-93,11 _i 52-75 _j	65,5 _a 64 _d 68 _f	71,8 _a 74 _b 77,5 _c	77,7 _a 74 _b 74,3 _c	62 _a 72,8 _b	71,3 _a 79,7 _d	98,9 _a 95 _b 93,7 _d
Nettó fehérje hasznosítás % (NPU)	52,9 _a 61,8 _c 40 _d	50,9 _a 59,7 _c 51,1 _d	66,2 _a 57,2 _d 63 _l	58,9 _a 65,3 _c 60 _d	59 _a 58,9 _c	56,2 _a 61,4 _d	68 _a 72,1 _d	99,5 _a 93,5 _d
Fehérje hatékonysági arány (PER)	0,9-1,7 _b 1,53 _d 1,23 _g 0,93 _h	0,9-1,3 _b 1,12 _d 1,26 _h 1,74 _e	2,18 _d 1,5-2 _f	1,6-2 _b	1,8-2,3 _b	2,32 _d 2,32 _h	2,86 _d 3,36 _g 2,5 _h 3,55 _e	3,5 _b 3,92 _d

a = Eggum /1968/
b = Nierle /1985/
c = Geervani /1985/
d = FAO /1970/
e = Dako /1985/

f = Barber és Benedito de Barber /1985/
g = Pellett /1985/
h = Tsen /1985/
i = Walger-Kunze /1985/
j = Juhász és társai /1985/

7. táblázat

Különböző fehérjék in vitro táplálkozástani értékei

Paraméter	F e h é r j e							
	Búza	Kukorica	Rizs	Árpa	Rozs	Szója	Kazein	Tojás
Chemical Score %	37 _a 44 _c 49,8 _g 32 _l	28 _a 41 _c 50 _e 46,7 _h 55-82 _i	44 _a 56 _c 65,5 _m	54 _c		82 _b 47 _c 44 _d 86,9 _m	58 _a 89 _b 58 _c	100 _a referen- cia ér- ték
FAO/WHO Index %	52,6 _f 38 _j 52 _k 46 _l 53 _n	49,1 _f 44-74 _i 41 _j 48 _k 49 _n	66,5 _j 65 _k 70 _n 71 _p	65 _j 63 _k 64 _n	73 _j 62 _k 62 _n	80 _j 74 _k 74 _p	91,4 _f 91 _p	100 _f
Esszenciális Aminosav (EAA) Index %	64 _f 63 _k 64 _l	65 _k	73 _k 59,6 _n	69 _k	60 _k	83 _f 74 _k 63,5 _m	88 _f	100 _f referen- cia ér- ték
Módosított Esszenciális Aminosav (MEAA) Index %	56 _j 64 _l	50 _j		60 _j	61 _j	82 _d 69 _j		100 _d referen- cia ér- ték

7. táblázat folytatása

Paraméter	F e h é r j e							
	Búza	Kukorica	Rizs	Árpa	Rozs	Szója	Kazein	Tojás
Korpáczy Index %	55 _j 59 ₁	50-70 _i 55 _j		57 _j	58 _j	74 _j		100 _j referen- cia érték
Mørup-Olesen Index %	56 _j 46,5 ₁	48-104 _i 87 _j	60,6 _m	78 _j	86 _j	94 _j 90,6 _m		
Gauss Index (GI) %	16 _j 31 ₁	93 _j		101 _j	110 _j	122 _j		
Transzformált Gauss (TGI) Index %	73 ₁	67-91 _o						
Emészthetőség-gel Korrigált Transzformált Gauss (TGICD) Index %	62 ₁	56-79 _o						

a = Block és Mitchell /1946/
 b = Akeson és Stahmann /1964/
 c = FAO /1970/
 d = Mauron /1970/
 e = Bender /1973/
 f = Hackler /1977/
 g = Marshall és társai /1979/
 h = Rao és társai /1980/

i = El-Kady és társai /1983/
 j = Békés és társai /1984/
 k = Hackler /1985/
 l = Hidvégi és Békés /1985/
 m = Kárpáti és Saeed /1985/
 n = Pellett /1985/
 o = Sharobeem és társai /1985/
 p = Sosulski és Sarwar /1985/

2.4. A vízhiánnyal, mint környezeti stresszhatással összefüggő elméleti ismeretek

Magyarország időjárására a kontinentális éghajlat szélsőséges időjárás változásai jellemzőek. A meteorológiai előrejelzések az átlaghőmérséklet emelkedését, a csapadékmennyiség csökkenését, az aszályos időszakok gyakoriságának növekedését valószínűsítik. A növénytermesztés változatlan, illetve növekvő eredményességének biztosításához szükség van a szárazságtűrő gabonafajták előállítására.

A növények szárazságtűrése rendkívül összetett tulajdonság. A teljes növény szintjén az alkalmazkodás a gyökérzet, a szár, a levelek morfológiájában, a gázcsereenyí-lások elhelyezkedésében, stb. nyilvánul meg. Sejt- és szövetszinten vízhiány esetén a növény a citoplazmában szer- vetlen vegyületeket és kisméretű szerves molekulákat hal- moz fel. E folyamatot működtető fontos szabályozó mecha- nizmus az ozmoreguláció /Turner és Jones, 1980/.

2.4.1. Az ozmoreguláció során végbemenő változások

Magasabbrendű növényeknél vízhiány esetén az ozmotikus alkalmazkodás bizonyos vegyületek felhalmozódása révén történik.

Az ozmotikus sokk hatására növekszik egyes szabad ami- nosavak mennyisége. A változás mértéke jellegzetesen kü- lönböző a szárazságérzékeny és a szárazságtűrő búzafaj- táknál /Galiba és társai, 1989/.

A szabad aminosavak közül legjelentősebb a prolin fel- halmozódása /Pandey, 1982; Karamanos és társai, 1983/, ami több lehetséges okra vezethető vissza. Stewart és Hanson /1980/ szerint a prolin felhalmozódás a fokozott szintézis és a gátolt oxidáció révén valósul meg.

Mások szerint az abszcizinsav koncentrációtól függő /Stewart, 1980/ prolin szintézis serkentése /Bogges és társai, 1976/, a fehérjeszintézis gátlása /Stewart, 1973/ miatt nő a Pro mennyisége. Az is lehetséges, hogy a prolin felhalmozás a vízhiány okozta károsodás jele /Hanson és társai, 1977/ és nem az ozmotikus sokkhoz való alkalmazkodásé.

Ozmotikus sokk hatására a prolinon kívül nő a glutamin mennyisége is /Flores és Galston, 1984b/, valamint azoknak az aminosavaknak (Lys, Arg) a mennyisége növekszik, amelyek részt vesznek a poliaminok szintézisében /Galiba és társai, 1986/.

A stressz hatására poliamin felhalmozódás is megfigyelhető /Flores és Galston, 1982, 1984a/. A poliaminok mennyisége nemcsak ozmotikus sokk hatására növekszik, hanem a fokozott bioszintézis miatt a növekedést serkentő hormonok (auxin /Bagni, 1966/, gibberellinsav /Dai és társai, 1982/, citokinin /Suresh és társai, 1978/) hozzáadása után is. A hiányos vízellátáskor megnövekvő abszcizinsav koncentráció /Kannangara és társai, 1983/ a poliaminok bioszintézisének csökkentése révén gátolja a növekedést. Ez nem mond ellent annak a ténynek, hogy szárazságstressz esetén nő a szabad poliaminszint, ugyanis ezt nemcsak a de novo szintézis, hanem a kötött és szabad poliamin átalakulás is okozhatja. A kötött és szabad poliaminok aránya más lehet, amikor a növekedési hormonok és más mikor a szárazságstressz hatására nő a mennyiségük.

A poliaminok szintézisében az ornitin-dekarboxiláz (ODK) és az arginin-dekarboxiláz (ADK) enzimek vesznek részt /Koromilas és társai, 1985/. Az ODK aktivitást számos tényező szabályozza, pl. az auxin /Fienberg és társai, 1984/ és a poliaminszint /Pegg és társai, 1986/.



A poliaminok közvetlenül vagy közvetve ható szabályozó anyagok /Altman és társai, 1986/, így az általuk befolyásolt sejtosztódás és növekedés /Galston, 1983/, a differenciálódás /Heby, 1981/, a DNS replikációs ciklus /Kaur-Sawhney és társai, 1980/ is módosul vízhiány esetén. A poliaminok a membránok foszfolipidjeihez kapcsolódva megvédik a membránt a lizistől különböző körülmények esetén /Mager, 1959/.

A poliamintartalom (putreszcin) nemcsak magas külső ozmolaritás esetén nő, hanem magnéziumhiány /Smith, 1973/, alacsony pH /Smith és Sinclair, 1967/ hatására is.

A szabad aminosavak mellett a cukrok mennyisége addig növekszik, amíg ezen anyagok felhalmozása és a növekedés közti egyensúlyi állapot be nem következik /Munns és Weir, 1981/.

Szárazságstressz estén fokozódik a szuperoxid-dizmutáz aktivitása, lipid peroxidáció megy végbe és hidrogén-peroxid halmozódik fel a sejtben /Chowdhury és Choudhuri, 1985/.

Ozmotikus sokk hatására csökken a nitrát-reduktáz aktivitás /Morilla, 1973/, növekszik a ribonukleáz aktivitás, a poliriboszómák disszociációja, csökken a fehérjeszintézis sebessége /Pikaard és Cherry, 1984/.

A proteolitikus enzimek közül az exopeptidázok mennyisége és aktivitása nő a szárazságérzékeny búzafajtában /Galiba és társai, 1989/.

A proteolitikus enzimek a képződő poliaminokkal gátlhatók /Kaur-Sawhney és társai, 1982/. A legerősebb gátlást a spermin, spermidin, kadaverin és a legkisebbet a putreszcin okozta.

A vízhiányban szenvedő növényekben lejátszódó, igen sokrétű biokémiai folyamatok összefüggései még nem teljesen tisztázottak.

Az adaptációs folyamatok kialakulásában a vízzoldható szerves N-tartalmú vegyületek (aminosavak, aminok) anyagcseréjének érzékeny megváltozása fontos szerepet játszik.

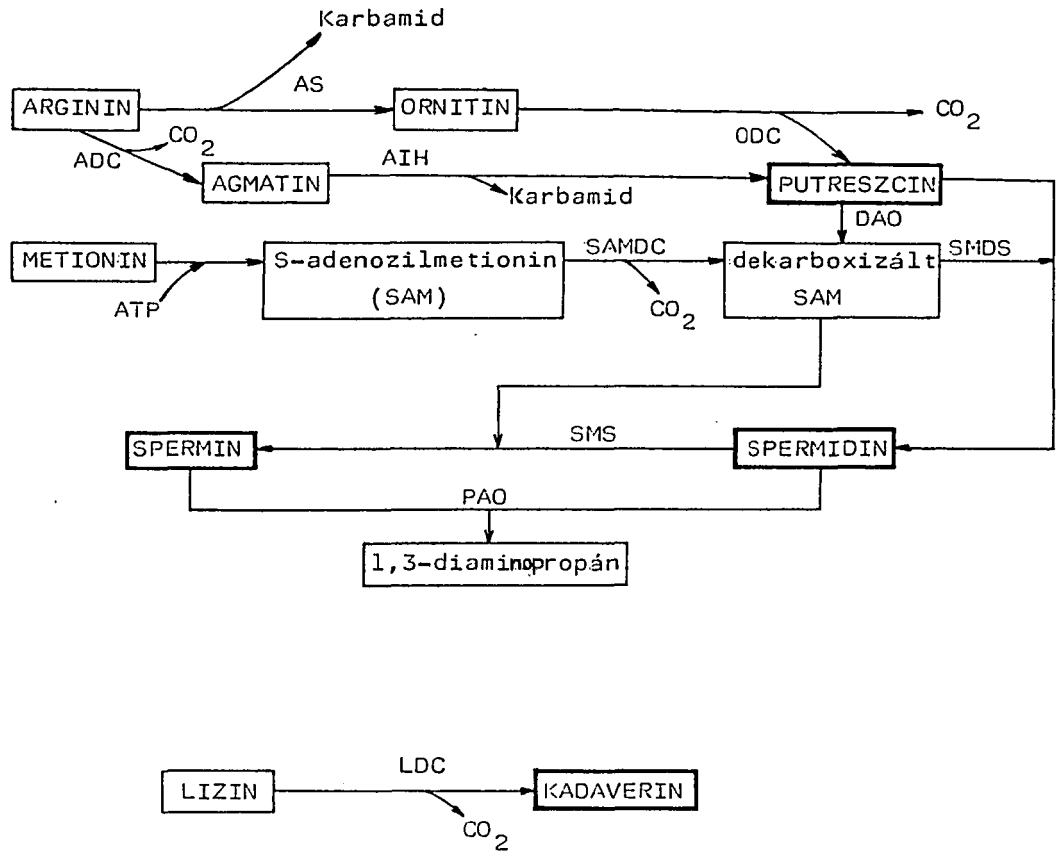
Az 1. ábrán a magasabbrendű növényekben lejátszódó aminosav-poliamin átalakulás lépései láthatók.

A putreszcin, a spermin és a spermidin az argininből és az ornitinből keletkezhet közös bioszintetikus úton. A kadaverin képződése a lizinből külön bioszintetikus úton történik /Galston, 1983/.

2.5. Az aminosavak és a poliaminok analitikája

2.5.1. A fehérjékben kötött aminosavak felszabadítása

A fehérjékben peptidkötéssel kapcsolódó aminosavak felszabadításához el kell hidrolizálni a kötéseket. A hidrolizálószerrel szembeni követelmény, hogy valamennyi aminosav szabaddá váljon, ne károsodjon és ne keletkezzen műtermék. Az analitikai gyakorlatban a savas és a lúgos (triptofán meghatározása) hidrolízis terjedt el. Az enzimikus módszereket csak speciális esetekben alkalmazzák drágaságuk és időigényességük miatt.



1. ábra: A poliamin szintézis útjai a magasabb rendű növényekben

AS: argináz, ODC: ornitin dekarboxiláz, ADC: arginin dekarboxiláz, AIH: agmatin iminohidroláz, DAO: diamino oxidáz, SAMDC: S-adenozilmetionin dekarboxiláz, SMDS: spermidin szintetáz, SMS: spermin szintetáz, PAO: poliamin oxidáz, LDC: lizin dekarboxiláz

2.5.1.1. Fehérje hidrolizis savakkal

Savas hidrolizáló ágensként legelterjedtebb a sósav. A 6 mol/dm^3 sósavas hidrolizis hagyományos (110°C , 24 óra) módszere /Moore és Stein, 1963/ mellett a magasabb hőmérsékletű ($140\text{-}150^\circ\text{C}$), rövidebb ideig (2-4 óra) tartó előkészítések egyre nagyobb teret hódítanak /Roach és Gehrke, 1970; Phillips, 1983; Zumwalt és társai, 1987a/. Koncentrált sósav és trifluor-ecetsav (2:1) elegyet alkalmazva 166°C -on, 25 min. elegendő a hidrolizishez /Tsugita és Scheffer, 1982/. Chen és társainak /1987/ mikrohullám segítségével, 4-5 min-ra sikerült csökkenteni a sósavas hidrolizis időszükségletét.

A hidrolizis befejezése után a hidrolizálószer eltávolításának hagyományos megoldása a bepárlás /Moore és Stein, 1963/. A beszárított hidrolizátumot alkalmas oldószerben, pufferben felvéve kerül sor az analízisre. E folyamat elvégzésére komplett hidrolizáló és bepárló készüléket fejlesztettek ki /Hubbard és Finney, 1976/.

A másik lehetőség a semlegesítéses (nátrium-hidroxiddal) eljárás /Spitz, 1973/, sokkal egyszerűbb és kiméletebb az aminosavakra nézve. Ennek a módszernek is van automatizált változata /Phillips, 1983/.

A sósavas hidrolizis során az aminosavak egy része kisebb-nagyobb százalékban bomlik. A triptofán teljesen elbomlik, a treonin és szerin bomlása 5-10% /Tkachuk és Irvine, 1969, Gehrke és társai, 1971/, a kéntartalmú aminosavak (Cys, Met), különösen oxigén jelenlétében bomlanak /Moore és Stein, 1963/.

A sósavas hidrolízis problémáinak megoldására különböző adalékanyagok felhasználásával (fenol /Drawert és Reuther, 1963/, tioglikolsav /Matsubara és Sasaki, 1969/, szulfit /Kerese, 1975/, oxálsav /Maravalhas, 1970/), illetve újabb savas hidrolizáló szerek alkalmazásával tettek kísérletet.

A sósav helyett 3 mol/dm^3 p-toluol-szulfonsavval /Liu és Chang, 1971/ vagy 3 mol/dm^3 merkaptó-etán-szulfonsavval /Penke és társai, 1974/, illetve 4 mol/dm^3 metán-szulfonsavval /Simpson és társai, 1976/ végezve a hidrolíziseket a triptofánra nézve is jó eredményt (80-90%-os visszanyerést) értek el.

Az aminosav oxidatív bomlásának elkerülése miatt szükséges a hidrolízis előtti oxigénmentesítés is, ami nitrogén gáz átbuborékolatással vagy vákuum alá helyezéssel oldható meg.

2.5.1.2. Fehérje hidrolízis lúgokkal

A lúgos hidrolízis a triptofán meghatározására szolgáló előkészítő módszer. Hidrolizáló szerként általában bárium-hidroxid /Miller, 1967/ és nátrium-hidroxid /Knox és társai, 1970; Dévényi és társai, 1971a/ használatos. A nátrium-hidroxid alkalmazása kedvezőbb /Hugli és Moore, 1972/, mert a hidrolizáló szer eltávolítása egyszerűbb. Az alkalmazott lúg koncentráció 4 mol/dm^3 és a hidrolízis idő 18-20 óra, 110°C -on. Több összefoglaló készült a triptofán meghatározására szolgáló módszerekről /Friedman és Finley, 1971/, az ioncserés oszlopkromatográfiás meghatározásról /Moore és Stein, 1963; Dévényi és társai, 1971a/ és az egyéb fotometriás eljárásokról /Holz, 1972; Steinhart és Sandmann 1977; Ürsi és Hollósy, 1985/.

2.5.1.3. Oxidációt követő hidrolizis

A kéntartalmú aminosavak meghatározásának módszere az oxidációt követő hidrolizis. A ciszteinből oxidációval stabil ciszteinsavat, a metioninből metionin-szulfon vagy metionin-szulfoxidot képeznek, melyek a sósavas hidrolizis körülményei között nem bomlanak.

A hagyományos eljárás a perhangyasavas oxidáció /Hirs, 1967/. A ciszteinsavvá történő konverzió 90-95%-os.

Az oxidáció elvégzésére számos egyéb lehetőség adódik. Lee és Dreschert /1979/ módosított hangyasav: hidrogén-peroxid aránnyal (19:1) végezték az oxidációt. Lipton és Bodwell /1973/ dimetil-szulfoxidot alkalmaztak oxidáló szerként. Ezeknél az eljárásoknál az oxidációs lépés mindig külön műveletként megelőzte a sósavas hidrolizist.

Spencer és Wold /1969/ e két folyamatot egy lépésben hajtotta végre, azaz a mintához egyidejűleg adták az oxidáló szert és a hidrolizáló szert.

Lipton és Bodwell /1973, 1976/ dimetil-szulfidos oxidációval a metionint metionin-szulfoxid formában határozták meg.

Egy fehérje aminosav-összetételének meghatározása három (sósavas, lúgos, oxidációt követő), illetve két (p-toluol-szulfonsavas, oxidációt követő) hidrolizist igényel. Ez utóbbi esetben a triptofán is meghatározható a többi aminosavval együtt.

Az oxidációt követő eljárásoknál a perhangyasavat dimetil-szulfoxiddal helyettesítve egy lépésben elvégezhető az előkészítés, így csökken a meghatározás időigénye és a hibalehetőség is.

A 24 órás hidrolizis - a mai modern kromatográfiás berendezések egy órán belüli analízis idejéhez képest - nagyon lecsökkenti az elemzés hatékonyságát. A módszertani változások a magasabb (140-160 °C-on) hőmérsékleten, rövidebb (1-2 óra) ideig tartó mintaelőkészítést részesítik előnyben.

A rendelkezésünkre álló hidrolizis módszerek ismeretében a kiválasztásnál olyan eljárás mellett célszerű döntenünk, amely egyrészt kevés műveleti lépést tartalmaz, s így kevesebb a hibalehetőség, másrészt a leginkább kiszolgálja kromatográfiás igényeinket.

2.5.2. A szabad aminosavak kinyerése

A biológiai minták szabad aminosavtartalmának kinyerésére általános eljárás nem adható meg. A zavaró fehérjék eltávolítása legcélszerűbben ultraszűréssel, ultracentrifugálással és gélkromatográfiával valósítható meg. Az aminosavak kioldására alkoholos oldatok (70-80% etanol), vizes pufferek (pH 2-4) és „fehérje kicsapószer” oldatok alkalmazhatók. Ez utóbbiak előnye, hogy a mintából nem oldódnak ki a fehérjék. Általában 10%-os triklór-ecetsav, 5-6%-os perklórsav vagy 5-10%-os szulfoszalicilsav használható e célra /Kerese, 1975/.

2.5.3. A poliaminok kinyerése

A kisebb-nagyobb tagszámú peptidláncokhoz kapcsolódó poliaminok hidroliziséhez 6 mol/dm³ sósavat (110 °C, 16 óra) alkalmaznak /Flores és Galston, 1982/.

A szabad poliaminokat általában 5% triklórecetsavval /Bardócz és társai, 1985; Rosier és Peteghem, 1988/ vagy 5-6%-os perklórsavval /Slocum és társai, 1989; Flores és Galston, 1984a/ extrahálják a növényi mintákból.

2.5.4. Az aminosavak és a poliaminok kromatográfiás meghatározása

A hasonló típusú vegyületek elválasztásához és meghatározásához a kromatográfiás módszerek alkalmazása a legmegfelelőbb. Az elmúlt évtizedekben óriási fejlődésnek lehettünk tanúi, melynek során nagyhatékonyságú, automata berendezések születtek.

2.5.4.1. Az aminosavak rétegekromatográfiás elválasztása

Az aminosavak elválasztására számos rétegekromatográfiás módszert dolgoztak ki, s ezekről több irodalmi összefoglaló készült /Pataki, 1966; Tyihák, 1979/. Elsősorban szilikagél és cellulóz rétegeket alkalmaztak. E hagyományos módszerek segítségével a fehérjéket alkotó aminosavak csak kétdimenziós kifejtéssel választhatók szét, ami az azonosítást igen bonyolulttá teszi. Az aminosavak egydimenziós elválasztásának megvalósításához Dévényi és társai /1971b/ munkája nagymértékben hozzájárult, amelynek során erős kationcserélő gyantát rögzítettek műanyag fóliára.

Az oszloprendszerű és síkelrendezésű folyadékkromatográfiás technikák egymással kölcsönhatásban való fejlődésének eredményeképpen, a nagyteljesítményű folyadékkromatográfia intenzív fejlődése magával hozta a legelterjedtebb síkelrendezésű folyadékkromatográfiás technika, a rétegekromatográfia alapvető megújításának igényét is. A műszeres technikák elterjesztésével olyan eredmények elérése volt a cél, amelyek közvetlenül összehasonlíthatók az oszloprendszerű technikákkal kapott adatokkal és mindemellett megtartják a síkelrendezésből adódó objektív előnyöket.

A finomszemcsés kész réteglapok forgalomba hozatalával lerakták a nagyteljesítményű rétegekromatográfia alapját /Rippahn és Halpaap, 1977; Guiochon és társai, 1978/.

A nagyteljesítményű rétegekromatográfiában azonban ugyanúgy a négyzetes kifejlesztési törvény érvényesül, mint a klasszikus rétegekromatográfiában, s emiatt jobb felbontást csak rövid (6-8 cm) távolságon lehet elérni.

Tyihák és társai /1979, 1981/ olyan új technikát fejlesztettek ki, amely egyrészt a finomszemcsés rétegen is lehetővé teszi a hosszabb távolságokon való hatékony elválasztást, másrészt közelít az oszlopkromatográfiás jól standardizálható viszonyokhoz, s minde mellett megtartja a klasszikus rétegekromatográfia pótolhatatlan előnyeit. Ezt az új technikát túlnyomásos rétegekromatográfiának nevezték el (OPLC).

Napjainkban egyre újabb és újabb változatai jelennek meg ezen kedvelt eljárásnak, pl. a programozott hőmérsékletű OPLC, gradients OPLC, on-line OPLC stb. /Tyihák és Mincsovics, 1988/.

A túlnyomásos rétegekromatográfia az aminosavak elválasztásában is kedvező javulást eredményezett /Cong és társai 1982; Fatér és Mincsovics, 1984; Simon-Sarkadi és társai 1984/.

Az aminosavak meghatározására világszerte használt automatikus aminosavanalizátorok legmodernebb változatával is napi 8-10 minta analízisét lehet elvégezni. A túlnyomásos rétegekromatográfiával ugyanannyi idő alatt 80-100 minta elemzésére is lehetőség nyílik.

E technika kiegészítő lépéseinek automatizálásával (mintafelvitel, reagens permetezés, detektálás, stb.) tovább növelhető a pontosság és javítható a reprodukálhatóság. Különösen olyan esetekben, ahol nagyszámú minta gyors analizisére, a változások nyomonkövetésére van szükség, előnyösen alkalmazható a módszer.

2.5.4.2. Az aminosavak oszlopkromatográfiás elválasztása

Az aminosav analitika alapjának lerakása Moore és társai /1958/ nevéhez fűződik. 1958-ban számoltak be az első automatikus berendezésről, ahol az aminosavakat ioncserés kromatográfiás eljárással és ninhidrines színreakció segítségével határozták meg.

Az eredeti kétoszlopos technika továbbfejlesztésével számos kutató foglalkozott. Elsősorban az egyoszlopos elválasztás, a pufferes elúció, a gyorsabb és érzékenyebb analízis megvalósítására törekedtek /Priez és Morris, 1960; Hamilton, 1963; Benson és Hare, 1975/.

A kromatográfiás technikák rohamos fejlődése az aminosav analitikában is éreztette hatását. Az aminosavak közvetlen elválasztására és meghatározására legelterjedtebb ioncserés oszlopkromatográfiás módszer mellett egyre nagyobb teret követelnek a gázkromatográfiás /Zomzely és társai, 1962; Klebe és társai, 1966; Pisano és Bronzert, 1969; McKenzie és Tenaschuk, 1974; Küsters és társai, 1984; Zumwalt és társai 1987b/, illetve a nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) eljárások (Udenfriend és társai, 1972; Jong és társai, 1982; Jones és Gilligan, 1983; Einarsson és társai, 1983; Elkin és Wasynczuk, 1987; Gehrke és társai, 1987/.

A módszerek összehasonlító vizsgálata alapján néhány jellegzetes eltérés mutatható ki /Ihekoronye, 1985/. A problémák elsősorban a mintaelőkészítés bonyolultságából, illetve az érzékenységet növelő detektálási módok eltéréseiből adódnak. A legegyszerűbb vizsgálatra az ioncserés kromatográfia nyújt lehetőséget, mivel ebben az esetben a hidrolizátum közvetlenül analizálható. Az egyéb módszereknél származékképzés után határozhatók meg az aminosavak, ami némely (Pro, His) esetben problémát jelenthet. Kétségtelen viszont, hogy a ninhidrines színreakció érzékenysége kisebb az UV-, illetve a fluoreszcens származékképzés érzékenységénél. A táplálékfehérjék esetében, ahol az aminosavak koncentrációja elég nagy, a ninhidrines detektálás érzékenysége megfelelő. A klinikai kémia területén, illetve speciális esetekben, ahol nagyon kis mennyiségű, esetleg különleges aminosavak kimutatása a feladat, célszerű az érzékenyebb módszerek valamelyikét választani.

2.5.4.3. A szabad aminosavak kromatográfiás meghatározása

A szabad aminosavak kromatográfiás meghatározása némileg bonyolultabb a peptidkötésből felszabadított aminosavak analizéséhez képest. Az általánosan elterjedt automatikus aminosavanalizátoros eljárásnál alkalmazott Na-citrátos pufferekkel nem választható el valamennyi komponens (Asn, Gln). A probléma megoldható lítium-citrát pufferek alkalmazásával /Kaldy és Kerelink, 1984/.

2.5.4.4. A poliaminok rétegekromatográfiás meghatározása

A síkelrendezésű változatban leggyakrabban szilika-gél rétegen, kloroform-trietylamin (25:5) /Flores és Galston, 1982; Slocum és társai, 1989/, etilacetát-ciklohexán (4:5) /Slocum és társai, 1989/ n-hexán-etilacetát (11:8) /Remo és Bertani, 1989/ elegyekkel végzik a kromatografálást.

Az elválasztás hatékonyságának növelésére nagyhatékonyságú (HPTLC) réteglapok alkalmazására is van lehetőség /Seiler, 1977/. Ezenkívül fordított fázisú és ioncserés rétegek is alkalmazhatók /Lepri és társai, 1979; Bardócz és Karsai, 1981/.

A túlnyomásos rétegekromatográfiás technika pedig lehetőséget nyújt a gyors és hatékony elválasztásra finomszemcsés rétegeken is /Simon-Sarkadi és Galiba, 1988/.

Mennyiségi értékelésre UV-aktív származékokat, ninhidrint /Bardócz és társai, 1985/, dinitrofenil vegyületeket, danzil-kloridot /Flores és Galston, 1984a/, illetve dabzil-kloridot /Lin és Lai, 1982/, valamint fluoreszkamint /Nakamura, 1977/ és o-ftálaldehidet /Seiler, 1977/ alkalmaznak.

2.5.4.5. A poliaminok oszlopkromatográfiás meghatározása

A poliaminok oszlopkromatográfiás elválasztása aminosav-analizátor segítségével, kationcserélő gyantán, gradiens elúcióval megvalósítható.

Az elválasztott vegyületek detektálása elválasztás utáni származékképzés alapján, történhet ninhidrinnel vagy o-ftálaldehiddel. A meghatározás előnye főként akkor értékelhető, ha az aminokat és az aminosavakat egyaránt meg kell határozni. Viszonylagos hátránya a hosszú analízis idő.

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerek esetén többnyire fordított fázisú oszlopon történik az elválasztás UV-aktív, illetve fluoreszcens származékok formájában /Sugiura és társai, 1975; Bontemps és

társai 1984/. A származékképzés általában elválasztás előtt vagy az ioncserés HPLC-nél az elválasztás után történik /Shaw és Al-Deen, 1980/.

Megfelelő származékképzés után a poliaminok gázkromatográfiás meghatározása is elvégezhető /Henion és társai, 1981; és Fujihara és társai, 1983/.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Biológiai vizsgálati anyagok

3.1.1. A vizsgált kukoricafajták

A 8. táblázatban látható a 4 országból származó, 25 elemzett kukoricafajta.

8. táblázat

A vizsgált kukoricafajták

Ország	Fajta
Amerikai Egyesült Államok	Fehér kukorica (sima) Sárga kukorica (lófogú) K 811 opaque-2 inbred line (lófogú) K 812 opaque-2 inbred line (lófogú) K 813 opaque-2 inbred line (sima) K 814 opaque-2 inbred line (sima)
Egyiptom	Giza 2 (sima) Pioneer 514 (lófogú) Pioneer 201 SC (lófogú) Pioneer 202 DC (lófogú)
Magyarország	Bema 210 TC (sima) Mv 394 SC (sima) Mv 434 SC (sima) Mv 484 SC (sima) Pioneer 3732 SC (lófogú) Pioneer 3901 SC (lófogú) Pioneer 3965 A MTC (lófogú) Mv 550 SC Wx (lófogú) SC 6390 HL opaque-2 (lófogú) Fehér csemegekukorica (lófogú) Mv SC Ideál csemegekukorica (lófogú)
NSZK	Brillant (lófogú) Nicco (sima) Forte (sima) Dea (sima)



A vizsgálatokhoz a reprezentatív magokból, laboratóriumi elektromos darálóval (Labor MIM, Budapest) előállított $300 \pm 10 \mu\text{m}$ szemcsenagyságú őrleményeket használtam.

3.1.2. A szárazságstressz vizsgálatokhoz alkalmazott búzafajták és vonalak

A kísérleteket a kenyérbúza, Triticum aestivum L. négy fajtájának: a szárazságtűrő kurdisztáni Saberbeg és a kansasi Plainsman, a közepesen szárazságtűrő kínai Chinese Spring, a szárazságérzékeny francia Cappelle Desprez, valamint a Chinese Spring - Cappelle Desprez kromoszóma szubsztitúciós sorozat kalluszaival végeztem.

A szubsztitúciós sorozat alatt azt értjük, hogy az egyik búzafajta egy kromoszóma párja ki van cserélve egy másik búzafajta azonos kromoszóma párjával.

A búzának 21 kromoszóma párja van, ezért 21 vonal (3x7) létesítésére van lehetőség. Ebből 19 állt rendelkezésemre, a 2A és 2B vonal hiányzott. A szövettenyészeteket az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézetének fitotronjában dr. Galiba Gábor tudományos munkatárs készítette és bocsátotta rendelkezésemre.

3.2. Kémiai vizsgálati anyagok

p-toluol-szulfonsav	(Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, NSZK)
aminosav standard elegy	(Serva, Heidelberg, NSZK)
ciszteinsav standard	(Serva, Heidelberg, NSZK)
ninhidrin	(Merck, Darmstadt, NSZK)
Pico-puffer II, A,B,C	(Pierce, Oud-Beijerland, Hollandia)
tripszin	(Merck 24579, Darmstadt, NSZK)

pankreatin P-1750	(Sigma, St.Louis, Amerikai Egyesült Államok)
putreszcin, kadaverin, spermin, spermidin	(Sigma, St. Louis, Amerikai Egye- sült Államok)
danzil-klorid	(Sigma, St.Louis, Amerikai Egyesült Államok)
polivinil-polipirrolidon	(Serva, Heidelberg, NSZK)
L-leucin-p-nitroanilid	(Serva, Heidelberg, NSZK)
p-nitroanilin	(Serva, Heidelberg, NSZK)
N-karbobenzoxi-L-fenilalanil-alanin	(Sigma, St.Louis, Amerikai Egyesült Államok)
trinitro-benzolszulfonsav	(Sigma, St. Louis, Amerikai Egyesült Államok)
azokazein	(Sigma, St. Louis, Amerikai Egyesült Államok)

A többi alkalmazott vegyszer, analitikai tisztaságú, a Reanal (Budapest, Magyarország) által forgalmazott készítmény volt.

3.3. Vizsgálati módszerek

3.3.1. A kukoricafajták nedvességtartalmának meghatározása

A nedvességtartalom meghatározás a szárításos technikával (130 °C, 4 óra) történt /Lásztity és Törley, 1987/.

3.3.2. A kukoricafajták fehérjetartalmának meghatározása

A fehérjetartalom meghatározás a Kjeldahl-eljárás alapuló, automatikus Kjel-Foss Automatic 16210 (Dánia) analizátorral történt. A H_2SO_4 - H_2O_2 -os roncsolás után felszabadult NH_3 mennyiségéből meghatározott nitrogéntartalomból, a 6,25-ös szorzófaktorral számítható a fehérje mennyisége /Lásztity és Törley, 1987/.

3.3.3. A kukoricafehérjék oldószeres frakcionálása

A fehérje kivonás az Osborne-féle frakcionálás módosított változatával történt /Sharobeem és társai, 1987/. A kivonás fő lépései a következők:
A zsírtalanított minta extrahálása ($20 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O}$, 1 óra), majd centrifugálása Janetzki 570 (Lengyelország) típusú laboratóriumi centrifugával (20 min, 2500 g, 20°C), az extrakció megismétlése után a felülúszó eltávolítása (albumin), majd a maradék extrahálása ($20 \text{ cm}^3 \text{ 1 mol/dm}^3 \text{ NaCl}$, 1 óra), centrifugálása (u.a.); az extrakció megismétlése után a felülúszó eltávolítása (globulin), majd a maradék extrahálása ($20 \text{ cm}^3 \text{ 70\% etanol}$, 1 óra), centrifugálása (u.a.), az extrakció megismétlése után a felülúszó eltávolítása (zein), ezt követően a maradék extrahálása ($20 \text{ cm}^3 \text{ 0,2\% KOH}$, 1 óra), centrifugálása (u.a.), az extrakció megismétlése után a felülúszó eltávolítása (glutelin), majd a maradék extrahálása ($20 \text{ cm}^3 \text{ 0,1 mol/dm}^3 \text{ NaOH}$, 1 óra) és centrifugálása (u.a.). Az extrakció megismétlése után maradt csapadék az oldhatatlan fehérje.

3.3.4. A kukoricafehérjék aminosav-összetételének meghatározása

3.3.4.1. Mintaelőkészítés a teljes aminosav-összetétel meghatározásához

A hidrolízis módszerek ($6 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$, szulfit adalékos $6 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$, $3 \text{ mol/dm}^3 \text{ p-toluol-szulfonsav}$) összehasonlító vizsgálata alapján a legkedvezőbb eredményeket a p-toluol-szulfonsavas hidrolízis adta. A sósavas hidrolízishez képest jobb volt a hidrofób oldalláncú aminosavak (Leu, Ile, Val) felszabadulása, ezenkívül a Met, Thr, Ser károsodása kisebb mértékű volt és a Trp sem bomlott el /Simonné-Sarkadi, 1986/.

A mintaelőkészítés lépései:

30 mg fehérjének megfelelő mintához 10 cm^3 3 mol/dm^3 p-toluol-szulfonsavat (amely 0,2% triptamint tartalmazott) adtam, majd nitrogén gáz átbuborékoltatás (3 min) után a hidrolizist $110\text{ }^\circ\text{C}$ -on, 24 órán át, block-termosztátban végeztem. A hidrolizis befejeztével a mintát 10 cm^3 2 mol/dm^3 NaOH-al 25 cm^3 -es lombikba mostam, majd desztillált vízzel jelig töltöttem. A mintákat szűrés után, $-18\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltam az analízis elvégzéséig.

3.3.4.2. Mintaelőkészítés a cisztein meghatározásához

A ciszteint oxidációval ciszteinsavvá kell alakítani, amely a sósavas hidrolízis során stabil marad. A mintaelőkészítés legegyszerűbben Spencer és Wold /1969/ módszere alapján végezhető. Méréseik szerint 0,2-0,3 mol dimetil-szulfoxidot (DMSO) tartalmazó 6 mol/dm^3 HCl-al hidrolizálva, a cisztein ciszteinsavvá történő átalakulása kvantitatív. Laboratóriumi körülményeink között megismételve az eljárást csak 91 illetve 95%-os konverziót tapasztaltam. A DMSO koncentrációt 2,5-3%-ra növelve javítható az eredmény (98%) /Simonné-Sarkadi és Szerző, 1985/.

A mintaelőkészítés lépései:

60 mg fehérjének megfelelő mintához 10 cm^3 6 mol/dm^3 HCl-t (amely 2,5% DMSO-t tartalmazott) adtam, majd nitrogén gáz átbuborékoltatás (3 min) után, a hidrolizist $110\text{ }^\circ\text{C}$ -on, 22 órán át végeztem. A hidrolízis befejeztével a mintát 10 cm^3 5 mol/dm^3 NaOH oldattal részlegesen semlegesítettem, majd Na-citrát pufferrel (pH 2,2) 25 cm^3 végtérfogatot állítottam be. Szűrés után a mintákat $-18\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltam az analízis elvégzéséig.

3.3.4.3. Az aminosavanalízis körülményei

3.3.4.3.1. A teljes aminosav-összetétel meghatározása túlnyomásos rétegekromatográfiával (OPLC)

Az OPLC-s technika előnyei az aminosavak meghatározásánál kedvezően kihasználhatók. Ioncserés réteglap felhasználásával modellezhető az aminosavanalizátoros elválasztás.

Az OPLC-s meghatározás optimális körülményeinek beállítását standard aminosav elegy kromatografálásával végeztem. A kísérletekhez a Labor MIM kísérleti IONPRES-6 elnevezésű, finomszemcsés, ioncserés réteglapjai álltak rendelkezésemre /Simon-Sarkadi és társai, 1984/.

A mérés körülményei:

CHROMPRES 10 túlnyomásos rétegekromatográf (Labor MIM, Budapest)

IONPRES-6 ioncserés réteglap 20x20, 20x40 cm (Labor MIM, Budapest)

Linomat III automatikus mintafelvivő (Camag, Svájc),

1-5 μ l minta

Impres U.P. imregnáló oldat (Labor Műszergyár RT., Budapest)

Eluens: Na-citrát puffer (pH =3,15, összetétel 100 cm³ térfogatban: 1,2 g NaOH, 4,2 g citromsav, 1,3 cm³, cc. HCl, 10% i-propanol)

Készülék hőmérséklet: 40 °C

Lineáris áramlási sebesség: 0,1 mm/s

Párna nyomás: 10 bar

Futtatási távolság: 18 cm, 35 cm

Futtatási idő: 30 min, 59 min

Előhívás: ninhidrines színreakcióval (reagens összetétel: 1 g ninhidrin, 0,25 g kadmium-acetát, 50 cm³ etanol, 10 cm³ ecetsav), 50 °C, 5 min

Értékelés: Shimadzu CS 920 TLC/HPTLC denzitométerrel

(Kyoto, Japán) 535 nm, 300 nm (Pro meghatározása)

3.3.4.3.2. A teljes aminosavösszetétel meghatározása aminosavanalizátorral

Az analiziseket az Aminochrom II OE-914 típusú (Labor MIM, Budapest) automatikus aminosavanalizátorral végeztem. A mennyiségi értékeléshez standard aminosav elegyet alkalmaztam.

A készülék jellemzői:

ioncserélő gyanta: DC 4A

puffer oldatok (Pico puffer II: A,B,C) áramlási

sebessége: $20 \text{ cm}^3/\text{óra}$

ninhidrin reagens áramlási sebessége: $10 \text{ cm}^3/\text{óra}$

oszlop hőmérséklet: $T_1 = 35 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_2 = 65 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_3 = 75 \text{ }^\circ\text{C}$

analízis idő: 100 min

detektálás: 570, 440 nm

3.3.4.3.3. Ciszteinsav meghatározás

A meghatározást csehszlovák gyártmányú Mikrotechna AAA 881 típusú aminosavanalizátor segítségével végeztem. A mennyiségi értékeléshez ciszteinsav standard oldatot használtam. A készüléket egyoszlopos üzemmódban működtettem és az elucióhoz az aminosavanalízishez használatos első puffert (pH 3,25) használtam. Mivel a ciszteinsav körülményeink között az első eluálódó aminosav, ezért lehetőség nyílt arra, hogy egymás után 6 mintát (meghatározott időközökkel) vigyek fel az oszlopra. Így mire az első minta aszparaginsav csúcsa megjelenik (mely természetesen ebből a hidrolizátumból nem határozható meg pontosan) a hatodik minta ciszteinsav csúcsa már eluálódott.

A készülék jellemzői:

ioncserélő gyanta: OSTION LGKS 0803

puffer oldat áramlási sebessége:

$80 \text{ cm}^3/\text{óra}$

ninhidrin áramlási sebessége:

$40 \text{ cm}^3/\text{óra}$

hidrazin áramlási sebessége:	20 cm ³ /óra
oszlop hőmérséklet :	60 °C
analízis idő (6 minta):	60 min
detektálás:	570, 440 nm

3.3.5. A kukoricafehérjék emészthetőségének meghatározása

Az emészthetőség vizsgálat Salgó és társai /1985/ által továbbfejlesztett pH-sztat módszerrel történt. Melynek lényege, hogy a szuszpenzió pH-ját az emésztés teljes ideje alatt automata titrátor tartja az előre beállított 8-as értéken, és az enzimek befecskendezésétől számított 10 min alatt mért lúgfogyás arányos az emészthetőséggel.

Az in vitro valódi emészthetőség (TD) % = $0,0223 A + 52,00$ képlet alapján számítható, ahol A = a lúgfogyás /ul-
ben megadva.

3.3.6. A kukoricafehérjék in vitro biológiai értékének számítása

A kukoricafajták in vitro biológiai értékének meghatározására alkalmazott módszerek a következők voltak.

A limitáló esszenciális aminosavak meghatározása a FAO/WHO módszer alapján történt. A minta esszenciális aminosavainak koncentrációját az összes esszenciális aminosav ezrelékében kifejezve és a referencia adatokra vonatkoztatva, a legkisebb értéket adó aminosav az elsősorban limitáló, a második legkisebb értéket eredményező a másodsorban limitáló esszenciális aminosav /Hidvégi és Békés, 1985/.

A transzformált Gauss-index számításához alkalmazott képlet:

$$\text{TGI \%} = 100 (q_{\text{Lys}}^{0,28} \cdot q_{\text{Tyr+Phe}}^{0,72} \cdot q_{\text{Cys+Met}}^{0,67} \cdot q_{\text{Thr}}^{3,32} \cdot q_{\text{Trp}}^{0,19})^{0,125}$$

ahol

$$q_i = \exp \left[(-4,5) \left(\frac{A_i - A_{i \text{ ref}}}{A_{i \text{ ref}}} \right)^2 \right], \quad A_i \text{ és } A_{i \text{ ref}}$$

az *i*-edik esszenciális aminosav, illetve referenciabeli koncentrációja mg/g összes esszenciális aminosav dimenzióban /Hidvégi és Békés, 1985/.

Az emészthetőséggel korrigált transzformált Gauss-index számítása:

$$\text{TGICD \%} = \text{TGI \%} \frac{\text{in vitro TD\%}}{100} \quad \text{képlet alapján történt,}$$

ahol TD = valódi emészthetőség és TGI = transzformált Gauss-index /Hidvégi és Békés, 1985/.

3.3.7. A szárazságtűrés vizsgálata búza kallusztenyészetekben

3.3.7.1. A szárazságtűrés kísérletek kiindulási anyagának előállítása

A fitotronban, standard növénynevelési program /Pletser, 1973/ alapján, cserépben nevelt növények izolált, zöld kalászainak sterilizálása a következő módon történt: vizes öblítés, áztatás (70% etanol, 10 min), kétszeri steril vizes öblítés, áztatás (5% kalcium-hipoklorit, 5 min), háromszori steril vizes öblítés, áztatás (0,1% higanyklorid, 3 min), végül négyszeri steril vizes mosás.

A kalászból aszeptikus körülmények között kipreparált embriók, 9 cm átmérőjű petricsészékbe kiöntött, Sears és Deckard /1982/ által módosított Murashige és Skoog /1962/ táptalajon (MS) növekedtek. A táptalaj fő komponenseit a 9. táblázat mutatja. A tápközeg az MS-sók mellett tiamin-HCl-t ($0,5 \text{ mg/dm}^3$), L-aszparagint (150 mg/dm^3), 2,4-diklórfenoxi-ecetsavat (2 mg/dm^3), inozitolt (100 mg/dm^3), szacharózt (20 g/dm^3) és agart (7 g/dm^3) is tartalmazott. A pH érték 5,8 volt.

9. táblázat

Az MS-táptalaj fő komponensei /Murashige és Skoog, 1962/

	mg/dm ³
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
Na_2EDTA	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
H_3BO_3	6,2
KI	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
CuSO_4	0,025

A kalluszok egy hónap után kerültek a négy fajta esetén mannitmentes kontroll, 9%, 13%, 17% mannitot tartalmazó táptalajra, a szubsztitúciós sorozat esetében mannitmentes kontroll és 13% mannitot tartalmazó táptalajra.

A búzafajták kalluszait 2, 10, 21 napos, a szubsztitúciós sorozat kalluszait 21 napos tenyésztés után vizsgáltam.

3.3.7.2. A kalluszok szárazanyagtartalmának és növekedési rátájának meghatározása

A szárazanyagtartalom meghatározás szárítósos (70 °C, 48 óra) módszerrel történt. A növekedési rátát a Fisher képlet alapján számoltam /Fisher, 1921/:

$$R = \frac{\ln w_2 - \ln w_1}{t_2 - t_1}$$

w_1 = a nedves tömeg a kezelés kezdetekor

w_2 = a nedves tömeg a kezelés befejezésekor

t_1 = a kezelés kezdetének ideje

t_2 = a kezelés befejezésének ideje

3.3.7.3. A kalluszok szabad aminosavtartalmának meghatározása

300 mg kalluszt 1,5 cm³ hűtött 6%-os perklórsavval egy órán át rázatva extraháltam. Centrifugálás (12000 g, 20 min, 20 °C) után a felülúszóból határoztam meg a szabad aminosavakat, az Aminochrom II OE 914 típusú automatikus aminosav-analizátorral. Az analízis körülményei megfelelnek a 3.3.4.3.2. pontban leírtaknak.

Az aszparagin és a glutamin meghatározását Li-citrát pufferrel (Pico puffer IV. A, pH = 3,2) végeztem, 40 °C-os oszlop hőmérséklet mellett.

3.3.7.4. A szabad poliaminok meghatározása

A perklórsavas extraktumból danzil-kloridos származék-képzés után, túlnyomásos rétegekromatográfiával (OPLC) határoztam meg a szabad poliaminokat.

A mintaelőkészítés lépései a következők:

400 μl 6%-os perklórsavas extrakthoz először 400 μl telített nátrium-karbonát oldatot, majd 800 μl danzil-kloridot (5 mg/cm^3 aceton) adtam. Egy napig sötétben tartottam a mintákat, majd a fölös reagenst 200 μl prolin (100 mg/cm^3 víz) oldattal kötöttem le. Ezt követően 30 min eltelte után $2 \times 0,4 \text{ cm}^3$ benzollal extraháltam a szabad poliaminokat. A standard poliaminok ($0,1 \text{ mg/cm}^3$) danzilezését a mintákkal együtt, azonos körülmények között végeztem.

Az OPLC-s meghatározás optimális körülményeit standard poliaminok kromatografálásával állítottam be /Simon-Sarkadi és Galiba, 1988/.

A kromatografálás körülményei:

CHROMPRES 10 túlnyomásos rétegekromatográf (Labor MIM, Budapest)

HPTLC 20x20 cm szilikagél réteglap (Merck, Darmstadt, NSZK)

Impres U.P. impregnáló oldat (Labor Műszergyár RT., Budapest)

Linomat III automatikus mintafelvívő (Camag, Svájc), 1-5 μl minta

Futtató elegy: kloroform-trietilamin (10:1,5)

Lineáris áramlási sebesség: 1,2 cm/min

Párna nyomás: 10 bar

Futtatási távolság: 18 cm

Futtatási idő: 15 min

Értékelés: Shimadzu CS 920 TLC/HPTLC denzitométer (Kyoto, Japán) 313 nm

3.3.7.5. Proteolitikus enzimaktivitás vizsgálatok

Az aminoszintetáz, karboxipeptidáz és azokazeináz aktivitás mérés Salgó és Feller /1987/ módszere alapján történt, fotometriás úton.

A mintaelőkészítés a következő lépésekből állt: 100 mg kallusz extrahálása centrifugacsőben, 3 cm³ hideg extrahálószerrel (50 mM, pH = 5,4 acetát-puffer, amely 1% polivinil-polipirrolidont és 0,1% β -merkaptóetanolt tartalmazott) először 2 s, 3000 g, 20 °C, majd 4 s, 7500 g, 20 °C körülmények között Ultra-Turrax T25 típusú biomixerrel történt. A következő lépés a homogenizált anyag centrifugálása (10 min, 2300 g, 20 °C), majd a szétválasztás után a felülúszó centrifugálása (10 min, 2300 g, 20 °C) volt. Az így nyert extraktum szolgált enzimmeghatározásként.

Az aminopeptidáz aktivitás meghatározásának menete: 200 μ l 2 mM L-leucin-p-nitroanilid szubsztrátum oldathoz, 20 μ l sómentes extraktumot adva 37 °C-on, 1 órán keresztül folyt az inkubáció. A felszabadult p-nitroanilin mennyiségének mérése Titertek Multiscan MKII nyolccsatornás, függőleges fényutú fotométer segítségével (405 nm) történt. A specifikus aktivitás egység = felszabadított μ mol p-nitroanilin/cm³, óra, g fehérje.

A karboxipeptidáz aktivitás meghatározásának menete: 50 μ l 200 μ M N-karbobenzoxi-L-fenilalanil-L-alanin szubsztrátum oldathoz, 10 μ l extraktumot adva 37 °C-on, 1 órán keresztül folyt az inkubáció, majd 200 μ l trinitrobenzolszulfonsav oldattal (350 μ g/g TNBS oldva 50 mM borát pufferben, pH = 9,5) történt a reakció leállítás. 1 óra múlva került sor az optikai denzitás mérésére 405 nm-en. A specifikus aktivitás egység = felszabadított μ mol alanin/cm³, óra, g fehérje.

Az azokazeináz aktivitás meghatározásának menete: 100 μ l 0,5%-os azokazein szubsztrát oldathoz 50 μ l sómentes extraktumot adva 37 °C-on, 1 órán át folyt az inkubáció. A reakció leállítására 75 μ l 15%-os triklór-ecet-

savval történt, majd a kicsapott fehérjék centrifugálása (10 min, 750 g, 6 °C) hűtött centrifugában folyt. 100 µl felülúszóhoz 100 µl 1 mol/dm³ NaOH-t adva, 450 nm-n történt a meghatározás fotometriás úton. A specifikus aktivitás egység = felszabadított mg azokazein/cm³, óra, mg fehérje.

3.3.7.6. A kalluszok fehérjetartalmának meghatározása

Az enzimaktivitás méréseknél elkészített extraktumok fehérjetartalmának meghatározása Lowry és társai /1951/ módszere alapján CONTIFLO (Labor MIM, Budapest) automatikus mintaelemzővel történt /Varga és társai, 1977/. A mennyiségi értékelést kazein standard kalibrációs sorozat (0-1 mg/cm³) segítségével végeztem.

3.3.7.7. Alkalmazott statisztikai módszerek

A kezelések hatásosságát, a fajták és a vonalak közötti esetleges eltéréseket különböző szignifikancia szinten végzett statisztikai számításokkal ellenőriztem. Több minta összehasonlításakor variancia analízist és főkomponens analízist végeztem /Sváb, 1979/.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. A kukoricafajták vizsgálatának eredményei

Kísérleteim során 4 országból származó, 25 kukoricafajtát vizsgáltam és kerestem az aminosav-összetétel alapján megállapítható fontosabb összefüggéseket.

4.1.1. Nedvesség- és fehérjetartalom

A mérési eredményeket a 10. táblázat tartalmazza.

A kukoricafajták nedvességtartalma 8,9-10,8% között változott.

A fehérjetartalom szempontjából a kukoricafajták három csoportba sorolhatók, normál (9-10%), nagy (10-12%) és igen nagy (12-14%) fehérjetartalmú osztályba. A legnagyobb fehérjetartalommal - szárazanyagra vetítve - a martonvásári Ideál csemegekukorica, a fehér csemegekukorica, az Mv 394 SC és az Amerikai Egyesült Államokban termesztett fehér kukorica rendelkezik. Ezenkívül elég nagy a K 811-814 opaque-2 mutánsok és az NSZK-beli fajták fehérjetartalma is.

10. táblázat

A vizsgált kukoricafajták nedvesség- és
fehérjetartalma

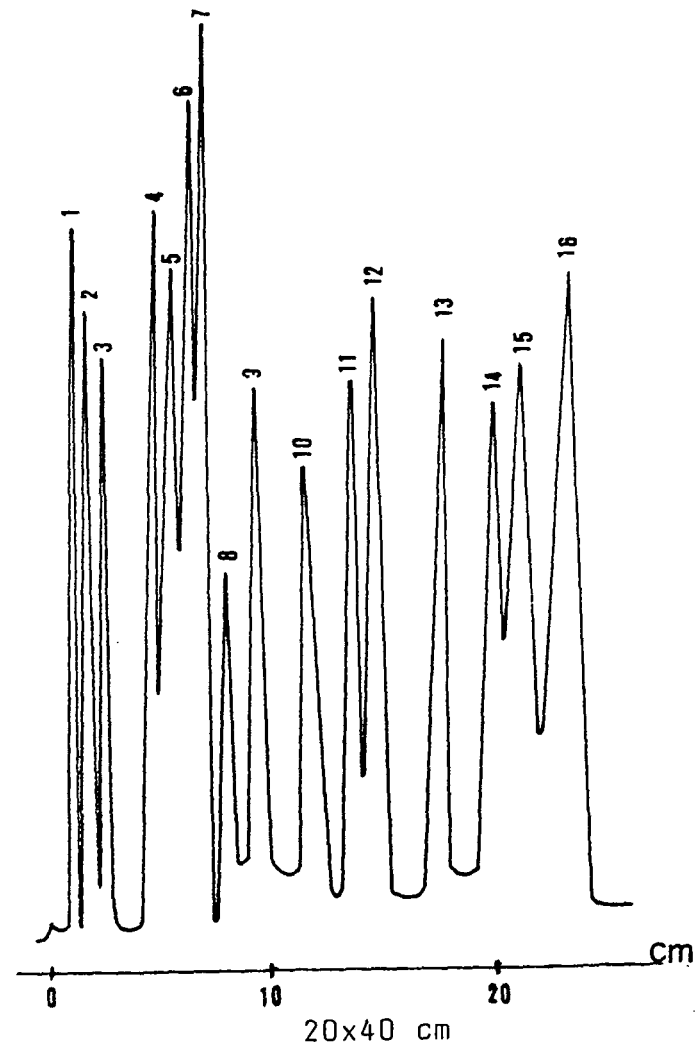
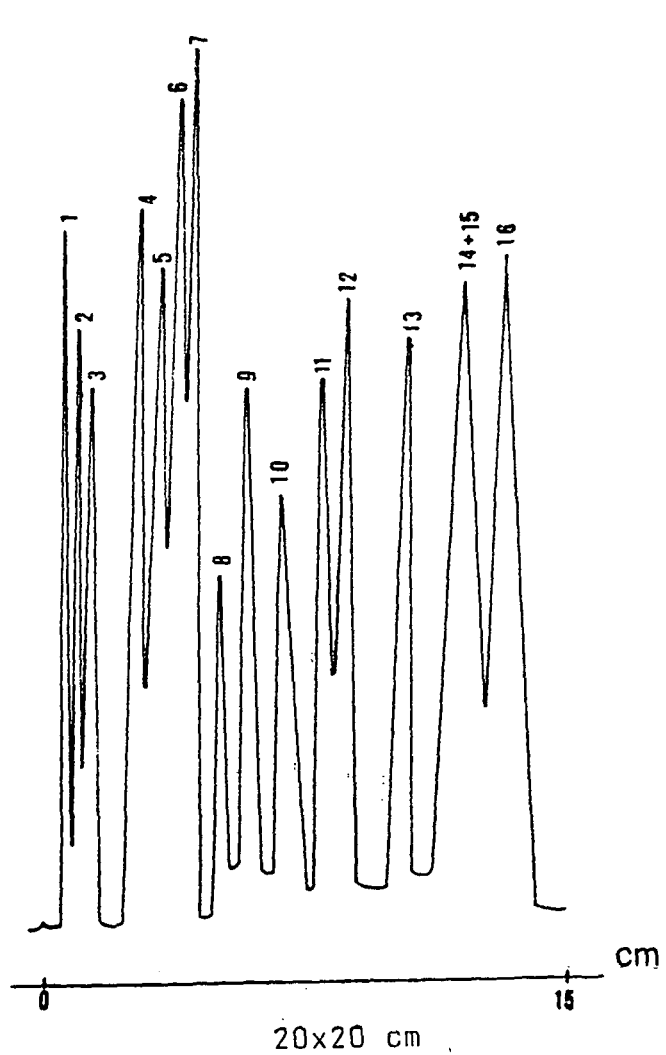
Fajta	Nedvesség %	Fehérje %
Fehér kukorica	9,4	12,2
Sárga kukorica	9,4	9,8
K 811 opaque-2 inbred line	9,1	10,3
K 812 opaque-2 inbred line	9,7	10,2
K 813 opaque-2 inbred line	9,6	10,7
K 814 opaque-2 inbred line	9,1	11,2
Giza 2	9,3	10,4
Pioneer 514	10,3	9,9
Pioneer 201 SC	10,5	9,0
Pioneer 202 DC	9,4	9,5
Bema 210 TC	10,4	10,5
Mv 394 SC	10,2	12,3
Mv 434 SC	10,7	9,1
Mv 484 SC	10,6	10,9
Pioneer 3732 SC	10,8	8,8
Pioneer 3901 SC	10,2	9,3
Pioneer 3965 A MTC	10,2	9,9
Mv 550 SC Wx	10,5	9,2
SC 6390 HL opaque-2	10,0	9,8
Fehér csemegekukorica	8,9	13,4
Mv SC Ideál csemegekukorica	8,9	14,1
Brillant	9,9	11,1
Nicco	10,2	11,1
Forte	10,1	10,6
Dea	9,9	10,5

4.1.2. A kukoricafehérjék aminosav-összetétele

A fehérjék aminosav-összetételének meghatározására elterjedten alkalmazott aminosavanalizátoros eljárás modellezésére, módszert dolgoztam ki a legújabb réteg-kromatográfiás technika, az OPLC segítségével.

A kromatográfiás meghatározás körülményei megfelelnek a 3.3.4.3.1. pontban leírtaknak.

A 2. ábrán a 20x20 cm és 20x40 cm-es ioncserés réteglapon végzett kifejlesztés denzitogramjai láthatók. A hosszabb réteglap alkalmazása, azaz a kifejlesztés távolságának a növelése a savas aminosavak (Asp, Thr, Ser) jobb elválasztását eredményezte. Az IONPRES-6 finomszemcsés, erős kationcserélő réteglapon, Na-citrát (pH= 3,15) pufferrel, 40 °C-on kromatografálva, 59 min alatt, 10-15 minta egyidejű elemzése végezhető el. A relatív szórás értékek 5-7% között változtak. Az automatikus aminosavanalizátoros meghatározás pontosságát még nem éri el, de azokban az esetekben, ahol nagyszámú minta gyors analizisével szűrővizsgálat elvégzése vagy a változások nyomonkövetése a cél, előnyösen használható a módszer, a nagy mintaelemző teljesítménye, olcsó és egyszerű üzemeltetése következtében. A kísérleti körülmények állandóságának biztosításával (automatizált mintafelvitel, reagens permetezés, jó minőségű ioncserés réteglap, stb.) tovább növelhető az aminosavanalizátoros meghatározás modellezésének eredményessége.



2.ábra: Az IONPRES-6 ioncserés réteglapon történt kifejlesztés denzitogramjai
 1 Arg, 2 Lys, 3 His, 4 Phe, 5 Tyr, 6 Leu, 7 Ile, 8 Met, 9 Val, 10 Cys,
 11 Ala, 12 Gly, 13 Glu, 14 Ser, 15 Thr, 16 Asp

A négy országból származó kukoricafajták automatikus aminosav-analizátoros meghatározásának eredményeit a 11-14. táblázat tartalmazza.

Az aminosav-összetételben, mint ez várható volt, kicsi a lizin- és a triptofántartalom. A nagy Lys tartalmú opaque-2 mutánsok esetén a limitáló szerepet a Trp mellett az Ile veszi át.

Két jellemző összefüggés mutatható ki az aminosav-összetétel alapján a vizsgált fajtákban. Az egyik a Lys-tartalom és a Leu/Ile arány között, a másik a szemtípus (sima, lófogú), illetve a Glu/Pro arány között.

A kis Lys tartalmú fajtáknál a Leu/Ile arány nagy (4-8), míg a nagy Lys tartalmú opaque-2 mutánsok esetén ez az arány kicsi (2-4).

A sima szemű kukoricafajtáknál a Glu/Pro arány nagy (4-7), míg a lófogúak esetén ez az arány kicsi (1-3).

E két összefüggés alapján, adott esetben a nagy Lys tartalmú mutánsok, illetve a sima és a lófogú kukoricafajták örleményének gyors megkülönböztetésére nyílik lehetőség.

11. táblázat
Az Amerikai Egyesült Államokban termesztett kukoricafajták
összfehérjéinek aminosav-összetétele (g/16 gN)

Aminosav	Fehér kukorica	Sárga kukorica	K 811 opaque-2	K 812 opaque-2	K 813 opaque-2	K 814 opaque-2
Asp	8,90	5,87	7,59	11,73	13,64	18,75
Thr *	2,56	2,90	4,58	4,58	3,71	3,68
Ser	5,19	3,95	4,63	4,92	5,67	5,24
Glu	<u>32,07</u>	<u>21,70</u>	<u>20,81</u>	<u>20,93</u>	<u>25,37</u>	<u>25,55</u>
Pro	<u>6,63</u>	<u>12,20</u>	<u>7,45</u>	<u>6,97</u>	<u>4,37</u>	<u>3,41</u>
Gly	<u>2,72</u>	<u>4,22</u>	<u>5,74</u>	<u>4,03</u>	<u>3,14</u>	<u>3,51</u>
Ala	6,38	7,01	5,68	7,05	8,55	7,06
Cys *	1,80	1,65	1,61	1,64	2,13	1,28
Val *	2,75	4,14	3,76	2,68	2,40	2,92
Met *	1,66	2,25	1,23	1,62	1,40	1,49
Ile *	<u>1,77</u>	<u>2,77</u>	<u>2,30</u>	<u>2,07</u>	<u>1,96</u>	<u>2,01</u>
Leu *	<u>11,44</u>	<u>14,77</u>	<u>8,68</u>	<u>7,10</u>	<u>8,65</u>	<u>6,69</u>
Tyr *	<u>3,60</u>	<u>3,37</u>	<u>3,38</u>	<u>3,11</u>	<u>2,87</u>	<u>2,85</u>
Phe *	4,28	4,71	4,16	3,08	2,45	3,30
Lys *	2,77	2,17	5,96	6,21	4,69	4,81
His	2,83	2,38	3,40	4,12	3,17	2,34
Trp *	0,23	0,31	0,36	0,43	0,43	0,41
Arg	4,44	3,63	8,68	7,73	5,40	4,70
*Összes esszenci- ális ami- nosav	32,84	39,04	36,02	32,52	30,69	29,44

12. táblázat
Az Egyiptomban termesztett kukoricafajták összfehérjéinek
aminosav-összetétele (g/16 gN)

Aminosav	Giza 2	Pioneer 514	Pioneer 201 SC	Pioneer 202 DC
Asp	1,67	4,94	7,51	5,43
Thr *	3,83	2,62	4,42	2,58
Ser	5,99	3,52	4,43	3,79
Glu	<u>31,79</u>	<u>18,30</u>	<u>22,05</u>	<u>17,70</u>
Pro	<u>5,26</u>	<u>16,01</u>	<u>8,96</u>	<u>13,80</u>
Gly	<u>4,16</u>	<u>3,20</u>	<u>3,96</u>	<u>4,08</u>
Ala	9,09	5,84	6,36	7,85
Cys *	1,25	1,64	1,30	1,96
Val *	2,64	4,62	3,92	3,34
Met *	2,18	2,42	2,29	2,32
Ile *	<u>2,13</u>	<u>3,51</u>	<u>2,24</u>	<u>2,54</u>
Leu *	<u>14,87</u>	<u>14,70</u>	<u>12,27</u>	<u>13,60</u>
Tyr *	<u>4,00</u>	<u>3,20</u>	<u>3,63</u>	<u>4,12</u>
Phe *	4,20	5,80	4,34	5,70
Lys *	1,89	2,80	3,57	2,80
His	1,89	2,44	2,65	3,60
Trp *	0,37	0,39	0,38	0,40
Arg	2,79	4,05	5,72	4,40
*Összes esszenci- ális ami- nosav	37,36	41,70	38,36	39,35

13. táblázat

A Magyarországon termesztett kukoricafajták összfehérjéinek aminosav-összetétele (g/16 gN)

Aminosav	Bema 210 TC	Mv 394 SC	Mv 434 SC	Mv 484 SC	Pioneer 3732 SC	Pioneer 3901 SC	Pioneer 3965 A MTC	Mv 550 SC Wx	SC 6390 HL opa- que-2	Fehér csemege- kukorica	Mv SC Ide- ál csemege- kukorica
Asp	7,25	6,60	7,40	7,30	6,71	7,05	7,21	7,70	9,33	6,21	7,21
Thr *	4,32	3,86	4,16	4,64	3,92	3,61	4,16	4,14	3,80	3,53	4,39
Ser	4,99	5,07	4,55	5,62	3,84	4,21	3,99	3,80	4,53	4,31	4,33
Glu	<u>26,90</u>	<u>27,50</u>	<u>29,44</u>	<u>27,50</u>	<u>19,33</u>	<u>22,71</u>	<u>18,94</u>	<u>18,28</u>	<u>21,64</u>	<u>24,80</u>	<u>21,77</u>
Pro	<u>9,63</u>	<u>7,30</u>	<u>10,20</u>	<u>5,65</u>	<u>17,48</u>	<u>12,97</u>	<u>15,43</u>	<u>13,35</u>	<u>10,54</u>	<u>10,13</u>	<u>15,33</u>
Gly	3,48	2,85	3,68	3,54	4,26	3,52	4,59	4,89	4,43	3,71	1,17
Ala	5,10	5,62	5,38	6,66	4,69	6,03	5,78	5,52	5,78	6,59	5,65
Cys *	1,14	1,46	1,42	1,56	1,04	1,06	0,67	0,61	0,70	0,85	0,44
Val *	3,64	4,12	3,75	4,46	5,00	5,02	5,80	6,57	5,74	5,29	5,28
Met *	1,36	1,51	2,12	1,93	1,95	1,53	1,61	1,82	1,60	1,60	1,26
Ile *	<u>2,45</u>	<u>2,23</u>	<u>3,07</u>	<u>2,02</u>	<u>3,68</u>	<u>3,08</u>	<u>2,78</u>	<u>3,34</u>	<u>3,41</u>	<u>3,23</u>	<u>2,94</u>
Leu *	<u>12,58</u>	<u>15,75</u>	<u>12,33</u>	<u>15,33</u>	<u>13,61</u>	<u>12,59</u>	<u>12,30</u>	<u>11,65</u>	<u>8,52</u>	<u>13,05</u>	<u>13,41</u>
Tyr *	2,86	3,11	2,66	3,26	3,14	2,92	3,19	2,88	2,90	2,61	2,80
Phe *	4,53	4,62	4,43	5,14	4,43	4,70	4,25	4,45	4,22	3,97	4,40
Lys *	3,02	2,85	2,12	1,74	2,26	2,39	2,44	3,17	3,89	2,68	2,72
His	1,30	0,86	0,82	0,73	0,84	0,71	1,50	1,76	1,69	1,94	2,64
Trp *	0,30	0,36	0,29	0,30	0,41	0,32	0,29	0,33	0,40	0,28	0,27
Arg	5,15	4,33	2,18	2,62	3,41	5,58	5,07	5,74	6,25	4,95	3,99
* Összes esszenci- ális ami- nosav	36,20	39,87	36,35	40,38	39,44	37,22	37,49	38,96	35,18	37,09	37,91

14. táblázat

Az NSZK-ban termesztett kukoricafajták összfehérjéinek
aminosav-összetétele (g/16 gN)

Aminosav	Brillant	Nicco	Forte	Dea
Asp	5,83	6,01	7,20	5,98
Thr *	2,36	2,80	3,19	3,12
Ser	4,12	5,79	4,96	4,68
Glu	<u>21,58</u>	<u>29,76</u>	<u>28,79</u>	<u>30,04</u>
Pro	<u>16,44</u>	<u>5,64</u>	<u>7,14</u>	<u>6,67</u>
Gly	3,47	2,23	3,15	3,79
Ala	7,35	9,82	6,95	6,84
Cys *	1,33	1,85	1,48	1,49
Val *	2,26	2,34	2,63	2,79
Met *	2,43	1,51	1,46	1,60
Ile *	<u>2,43</u>	<u>2,07</u>	<u>1,66</u>	<u>2,15</u>
Leu *	<u>14,76</u>	<u>14,13</u>	<u>14,61</u>	<u>13,62</u>
Tyr *	3,58	3,82	3,57	3,55
Phe *	3,97	3,87	3,92	4,05
Lys *	3,84	2,31	2,65	2,90
His	1,46	2,71	2,66	2,67
Trp *	0,31	0,32	0,29	0,27
Arg	2,48	3,02	3,69	3,79
* Összes esszenci- ális ami- nosav	37,27	35,02	35,46	35,54

Az esszenciális és nem esszenciális aminosavak arányát tekintve, a vizsgált kukoricafajták fehérjéinek esszenciális (Thr, Cys, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, Lys, Trp) aminosavtartalma átlagosan 37%. Országoként vizsgálva ez az átlag az Egyiptomban termesztett kukoricafajták esetén a legnagyobb (39%), ezt követik a Magyarországon (38%) és az NSZK-ban (36%) termesztett fajták és végül a legkisebb (34%) esszenciális aminosavtartalommal az Amerikai Egyesült Államokban termesztett kukoricafajták rendelkeznek.

A fehérjetartalom és az esszenciális aminosavak mennyiségének összefüggését vizsgálva megállapítható, hogy a legtöbb esetben a nagyobb fehérjetartalmú mintákban nem nőtt arányosan az esszenciális aminosavak mennyisége, sőt

például a Magyarországon termesztett Pioneer fajtnál a fehérjetartalom növekedésével az esszenciális aminosav-tartalom 39%-ról 37%-ra, illetve az amerikai opaque-2 mutánsoknál 32%-ról 29%-ra csökkent.

4.1.3. A kukoricafehérjék emészthetősége és biológiai értéke

A kukorica minták emészthetőségét a 15. táblázat, a limitáló esszenciális aminosavakat a 16. táblázat, az in vitro biológiai értékeket a 17. táblázat tartalmazza.

A vizsgált fajták emészthetősége átlagosan 87%-os. Az Mv SC Ideál csemegekukorica, a Pioneer 3965 A MTC, a Brillant és a Bema 210 TC fajták nagyon jól emészthető (95-92%) fehérjékkel rendelkeznek. Az opaque mutánsok emészthetősége (83-88%) szignifikánsan kisebb. Ez utóbbi okainak felderítése további vizsgálatot igényel.

A vizsgált kukoricafajták átlagos biológiai értéke a TGI érték alapján 83%. A Magyarországon termesztett fajták (86%), valamint a német Forte (89%) és a Dea (89%), illetve az Egyiptomban termesztett Giza 2 (89%) és Pioneer 201 SC (89%) fajták igen jó táplálkozástani értékűek. A leggyengébbek e tekintetben a K 812 mutáns (67%), valamint a Pioneer 202 DC (70%) és a Pioneer 514 (70%) fajták. Az in vitro nettó fehérjehasznosítási adatokból is hasonló következtetések vonhatók le.

15. táblázat

A vizsgált kukoricafajták emészthetősége

Ország	Fajta	Emészthetőség %
Amerikai Egyesült Államok	Fehér kukorica	86,1
	Sárga kukorica	86,0
	K 811 opaque-2 inbred line	88,3
	K 812 opaque-2 inbred line	83,4
	K 813 opaque-2 inbred line	87,7
	K 814 opaque-2 inbred line	83,7
Egyiptom	Giza 2	85,3
	Pioneer 514	87,0
	Pioneer 201 SC	88,2
	Pioneer 202 DC	86,1
Magyarország	Bema 210 TC	91,9
	Mv 394 SC	87,7
	Mv 434 SC	85,1
	Mv 484 SC	86,4
	Pioneer 3732 SC	84,8
	Pioneer 3901 SC	84,8
	Pioneer 3965 A MTC	93,3
	Mv 550 SC Wx	89,8
	SC 6390 HL opaque-2	84,5
	Fehér csemegekukorica	86,1
	Mv SC Ideál csemegekukorica	94,8
NSZK	Brillant	93,3
	Nicco	87,6
	Forte	84,0
	Dea	88,7

16. táblázat

Első- és másodsorban limitáló esszenciális
aminosavak a vizsgált kukoricafajtákban

Ország	Fajta	Elsősorban limitáló	Másodsorban esszenciális aminosav
Amerikai Egyesült Államok	Fehér kukorica	TRP	ILE
	Sárga kukorica	TRP	LYS
	K 811 opaque-2 inbred line	TRP	ILE
	K 812 opaque-2 inbred line	TRP	ILE
	K 813 opaque-2 inbred line	TRP	VAL
	K 814 opaque-2 inbred line	TRP	ILE
Egyiptom	Giza 2	LYS	TRP
	Pioneer 514	TRP	LYS
	Pioneer 201 SC	TRP	ILE
	Pioneer 202 DC	TRP	LYS
Magyar- ország	Bema 210 TC	TRP	LYS
	Mv 394 SC	TRP	LYS
	Mv 434 SC	TRP	LYS
	Mv 484 SC	TRP	LYS
	Pioneer 3732 SC	LYS	TRP
	Pioneer 3901 SC	TRP	LYS
	Pioneer 3965 A MTC	TRP	LYS
	Mv 550 SC Wx	TRP	LYS
	SC 6390 HL opaque-2	TRP	LYS
	Fehér csemegekukorica	TRP	LYS
	Mv SC Ideál csemegekukorica	TRP	LYS
NSZK	Brillant	TRP	VAL
	Nicco	TRP	LYS
	Forte	TRP	ILE
	Dea	TRP	ILE

17. táblázat

A vizsgált kukoricafajták in vitro biológiai értéke

Ország	Fajta	TGI %	TGICD %
Amerikai Egyesült Államok	Fehér kukorica	82,6	71,4
	Sárga kukorica	78,8	67,8
	K 811 opaque-2 inbred line	81,2	71,7
	K 812 opaque-2 inbred line	67,2	56,1
	K 813 opaque-2 inbred line	84,5	74,1
	K 814 opaque-2 inbred line	84,8	71,0
Egyiptom	Giza 2	89,1	76,0
	Pioneer 514	70,8	61,6
	Pioneer 201 SC	88,9	78,4
	Pioneer 202 DC	70,3	60,5
Magyarország	Bema 210 TC	84,8	77,9
	Mv 394 SC	90,1	79,0
	Mv 434 SC	85,0	72,3
	Mv 484 SC	83,1	71,8
	Pioneer 3732 SC	89,3	75,7
	Pioneer 3901 SC	88,7	75,2
	Pioneer 3965 A MTC	84,3	78,6
	Mv 550 SC Wx	87,6	78,7
	SC 6390 HL opaque-2	91,3	77,1
	Fehér csemegekukorica	87,3	75,2
	Mv SC Ideál csemegekukorica	77,8	73,8
NSZK	Brillant	72,8	67,9
	Nicco	84,5	74,0
	Forte	89,7	75,4
	Dea	89,4	79,3

4.1.4. A kukoricafajták fehérjefrakcióinak aminosav-összetétele

Szemléltetésül nyolc minta fehérjefrakcióinak aminosav-összetételét mutatom be (18-25. táblázat).

Az aminosavak mennyiségi eloszlásának értékelését az egyes frakciókban, adott fajtán belül ún. rangsorszámok segítségével végeztem, melyek a 26. táblázatban láthatók.

Ezek alapján megállapítható, hogy egy adott frakció mely aminosavakban gazdagabb (azaz a nyolc mintát alapul véve, az adott aminosav mennyiségét tekintve legalább hétszer került az első, illetve a második helyre a frakciók közötti rangsorban) és mely aminosavakban szegényebb (azaz legalább hétszer szerepelt a harmadik, illetve a negyedik helyen).

18. táblázat

Az Amerikai Egyesült Államokban termesztett fehér kukorica-
fajta fehérjefrakcióinak aminosav-összetétele
(g/16 gN)

Aminosav	Albumin	Globulin	Zein	Glutelin
Asp	19,75	12,03	7,30	7,06
Thr *	5,59	4,21	4,63	4,03
Ser	4,53	4,95	4,76	3,64
Glu	13,10	10,24	17,88	12,64
Pro	5,03	4,47	12,93	8,82
Gly	7,22	5,59	2,11	9,09
Ala	3,61	4,62	7,51	5,79
Cys *	3,04	4,28	1,65	2,11
Val *	2,19	2,57	3,49	5,92
Met *	0,69	1,75	0,95	1,49
Ile *	1,20	2,83	2,67	4,15
Leu *	2,19	4,84	11,43	6,47
Tyr *	3,54	4,02	4,43	4,54
Phe *	2,55	1,45	4,69	5,08
Lys *	6,58	6,18	1,78	4,99
His	3,40	10,39	1,99	5,47
Trp *	1,49	0,82	0,98	1,13
Arg	14,30	14,76	8,82	7,58
*Összes * esszenci- ális ami- nosav	29,06	32,95	36,70	39,91

19. táblázat

A Giza-2 kukoricafajta fehérjefrakcióinak
aminosav-összetétele (g/16 gN)

Aminosav	Albumin	Globulin	Zein	Glutelin
Asp	14,32	11,28	4,48	10,20
Thr *	6,01	3,33	2,42	2,69
Ser	3,87	3,88	6,16	4,41
Glu	14,18	13,40	20,18	11,40
Pro	9,88	4,29	9,96	6,81
Gly	7,39	6,46	1,36	4,58
Ala	4,04	6,05	8,85	6,01
Cys *	3,44	3,81	0,63	1,41
Val *	2,32	3,13	3,42	4,17
Met *	1,20	1,77	0,95	2,54
Ile *	1,38	2,52	2,55	3,12
Leu *	1,98	4,83	15,97	5,43
Tyr *	3,44	4,29	4,26	4,34
Phe *	1,80	2,18	4,90	4,65
Lys *	7,82	8,91	1,62	7,53
His	3,27	3,95	1,94	5,76
Trp *	1,55	1,36	0,68	1,24
Arg	12,11	14,56	9,67	13,71
* Összes esszenci- ális ami- nosav	30,94	36,13	37,40	37,12

20. táblázat

Az Mv 394 SC kukoricafajta fehérjefrakcióinak
aminosav-összetétele (g/16 gN)

Aminosav	Albumin	Globulin	Zein	Glutelin
Asp	12,05	9,87	6,86	11,12
Thr *	5,52	4,45	4,37	3,73
Ser	4,08	5,28	7,15	4,19
Glu	13,51	14,13	18,00	10,91
Pro	3,36	3,10	9,17	8,59
Gly	8,31	5,86	2,37	6,60
Ala	4,88	4,74	9,39	5,90
Cys *	4,96	6,39	1,04	2,11
Val *	2,00	3,82	4,43	5,71
Met *	1,92	1,36	1,31	1,37
Ile *	1,60	2,18	2,50	3,19
Leu *	3,28	4,41	11,23	6,55
Tyr *	2,48	2,81	5,25	6,55
Phe *	1,44	2,28	5,87	6,36
Lys *	5,60	6,87	1,93	3,12
His	12,95	7,99	1,82	4,67
Trp *	1,50	1,02	0,36	0,50
Arg	10,46	13,44	6,95	9,83
* Összes esszenci- ális ami- nosav	30,40	35,52	38,29	38,19

21. táblázat

A Pioneer 3732 SC kukoricafajta fehérjefrakcióinak
aminosavösszetétele (g/16 gN)

Aminosav	Albumin	Globulin	Zein	Glutelin
Asp	8,10	7,28	6,56	10,43
Thr *	4,21	2,01	3,07	2,13
Ser	4,28	3,05	7,74	4,99
Glu	15,97	9,88	19,18	13,96
Pro	5,53	4,16	8,63	6,90
Gly	9,19	4,68	2,62	5,76
Ala	5,53	3,27	9,06	6,92
Cys *	3,27	8,02	1,64	2,17
Val *	2,73	2,82	3,94	3,94
Met *	1,25	1,26	1,51	1,28
Ile *	1,56	2,60	2,36	2,31
Leu *	3,35	4,23	13,92	7,12
Tyr *	3,04	3,42	4,52	5,66
Phe *	2,34	2,90	5,12	6,01
Lys *	7,63	10,55	2,25	3,31
His	5,22	6,84	2,08	6,15
Trp *	1,64	1,71	0,64	1,20
Arg	15,16	21,32	5,16	9,76
* Összes esszenci- ális ami- nosav	31,02	39,52	38,97	35,13

22. táblázat

Az Mv 550 SC Wx kukoricafajta fehérjefrakcióinak
aminosav-összetétele (g/16 gN)

Aminosav	Albumin	Globulin	Zein	Glutelin
Asp	11,86	12,40	5,88	10,01
Thr *	4,38	4,83	3,34	3,40
Ser	3,81	4,88	5,14	4,58
Glu	12,29	14,28	19,97	11,71
Pro	7,49	3,76	8,85	5,82
Gly	8,19	5,19	2,01	5,22
Ala	6,07	4,83	9,45	6,26
Cys *	5,79	5,51	1,59	2,94
Val *	3,11	3,45	3,48	4,66
Met *	1,70	1,75	1,62	1,42
Ile *	1,70	2,37	2,00	3,46
Leu *	3,24	4,39	15,01	8,29
Tyr *	2,26	2,95	4,45	5,00
Phe *	3,67	2,06	4,75	3,94
Lys *	5,93	6,71	2,11	8,07
His	4,38	3,91	2,05	3,12
Trp *	1,13	0,54	0,86	1,28
Arg	13,00	16,20	7,44	10,82
*Összes esszenci- ális ami- nosav	32,91	34,56	39,21	42,66

23. táblázat

Az SC 6390 HL o2 mutáns kukoricafajta fehérje-
frakcióinak aminosav-összetétele (g/16 gN)

Aminosav	Albumin	Globulin	Zein	Glutelin
Asp	9,64	8,75	7,60	9,60
Thr *	5,00	3,66	4,54	3,19
Ser	3,62	5,75	8,09	4,19
Glu	19,94	14,20	14,26	12,79
Pro	12,19	4,81	11,94	4,76
Gly	7,09	6,29	2,01	4,69
Ala	3,11	9,33	9,40	6,45
Cys *	3,62	4,33	1,18	2,14
Val *	2,70	3,50	3,11	4,36
Met *	1,38	1,85	0,92	1,93
Ile *	1,84	2,73	2,78	3,14
Leu *	1,73	6,10	12,74	9,60
Tyr *	2,35	2,78	4,14	4,36
Phe *	1,22	2,76	5,13	4,67
Lys *	8,41	7,06	1,59	5,91
His	3,26	5,38	2,03	3,41
Trp *	0,82	0,96	0,83	1,76
Arg	12,08	9,76	7,71	13,05
*Összes esszenci- ális ami- nosav	29,07	35,73	36,96	41,06

24. táblázat

Az Mv SC Ideál, csemegekukorica fehérje-
frakcióinak aminosav-összetétele (g/16 gN)

Aminosav	Albumin	Globulin	Zein	Glutelin
Asp	11,80	8,39	6,55	9,11
Thr *	5,90	3,41	4,52	2,37
Ser	5,51	4,53	7,10	4,96
Glu	9,96	12,33	16,28	15,85
Pro	4,83	2,24	13,88	10,67
Gly	8,90	5,47	1,91	4,09
Ala	6,09	7,15	8,69	6,76
Cys *	3,39	1,50	0,95	1,24
Val *	2,71	4,22	2,79	4,91
Met *	0,68	2,11	0,81	1,69
Ile *	2,03	4,20	2,07	2,39
Leu *	3,58	11,42	14,52	10,34
Tyr *	5,13	6,87	4,09	5,52
Phe *	4,45	8,29	4,66	4,91
Lys *	4,93	3,79	1,63	3,51
His	4,74	2,44	1,76	2,53
Trp *	1,06	0,53	0,61	1,03
Arg	14,21	11,11	7,18	8,12
* Összes esszenci- ális ami- nosav	33,86	46,34	36,65	37,91

25. táblázat

A Brillant kukoricafajta fehérjefrakcióinak
aminosav-összetétele (g/16 gN)

Aminosav	Albumin	Globulin	Zein	Glutelin
Asp	17,00	14,57	8,45	11,07
Thr *	3,76	5,39	7,12	6,08
Ser	3,00	5,62	10,87	5,44
Glu	12,11	17,25	16,28	12,27
Pro	7,14	3,42	8,08	7,88
Gly	8,08	6,47	1,48	6,80
Ala	5,35	6,28	8,38	6,37
Cys *	3,10	3,52	0,64	0,83
Val *	2,44	4,08	3,09	4,82
Met *	0,75	1,55	2,00	2,25
Ile *	1,97	2,34	2,28	3,22
Leu *	3,57	3,89	12,38	8,81
Tyr *	3,19	2,95	4,48	2,98
Phe *	2,54	1,97	5,07	3,21
Lys *	6,57	6,14	1,56	4,69
His	4,23	3,18	2,04	4,84
Trp *	1,50	0,84	0,47	0,77
Arg	13,70	10,54	5,33	7,67
* Összes esszenci- ális ami- nosav	29,39	32,67	39,09	37,06

26. táblázat

A kukoricafajták fehérjefrakcióinak aminosav-összetételi rangsor táblázata

	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Trp	Arg
I.	A ₆ G ₁ Z G ⁺ ₁	A ₆ G ₁ Z G ⁺ ₁	A ₁ G ₁ Z G ⁺ ₇	A ₁ G ₁ Z G ⁺ ₅	A ₁ G ₁ Z G ⁺ ₇	A ₇ G ₁ Z G ⁺ ₁	A ₁ G ₈ Z G ⁺ ₈	A ₂ G ₆ Z G ⁺ ₈	A ₁ G ₃ Z G ⁺ ₁	A ₂ G ₂ Z G ⁺ ₆	A ₁ G ₃ Z G ⁺ ₁	A ₁ G ₈ Z G ⁺ ₈	A ₁ G ₆ Z G ⁺ ₁	A ₁ G ₁ Z G ⁺ ₄	A ₄ G ₃ Z G ⁺ ₁	A ₃ G ₃ Z G ⁺ ₂	A ₅ G ₁ Z G ⁺ ₂	A ₂ G ₅ Z G ⁺ ₁
II.	A ₂ G ₃ Z G ⁺ ₃	A ₁ G ₂ Z G ⁺ ₄	A ₁ G ₅ Z G ⁺ ₁	A ₃ G ₂ Z G ⁺ ₃	A ₂ G ₂ Z G ⁺ ₁	A ₁ G ₃ Z G ⁺ ₄	A ₃ G ₃ Z G ⁺ ₅	A ₆ G ₂ Z G ⁺ ₁	A ₁ G ₃ Z G ⁺ ₅	A ₁ G ₂ Z G ⁺ ₁	A ₂ G ₂ Z G ⁺ ₅	A ₁ G ₁ Z G ⁺ ₇	A ₁ G ₁ Z G ⁺ ₅	A ₁ G ₃ Z G ⁺ ₃	A ₃ G ₅ Z G ⁺ ₁	A ₁ G ₃ Z G ⁺ ₄	A ₂ G ₄ Z G ⁺ ₂	A ₅ G ₂ Z G ⁺ ₁
III.	A ₄ G ₄ Z G ⁺ ₁	A ₄ G ₄ Z G ⁺ ₁	A ₂ G ₅ Z G ⁺ ₃	A ₂ G ₃ Z G ⁺ ₃	A ₅ G ₁ Z G ⁺ ₂	A ₅ G ₅ Z G ⁺ ₃	A ₃ G ₂ Z G ⁺ ₃	A ₁ G ₈ Z G ⁺ ₈	A ₅ G ₅ Z G ⁺ ₃	A ₂ G ₃ Z G ⁺ ₃	A ₄ G ₄ Z G ⁺ ₃	A ₇ G ₇ Z G ⁺ ₁	A ₁ G ₅ Z G ⁺ ₁	A ₃ G ₄ Z G ⁺ ₁	A ₁ G ₇ Z G ⁺ ₇	A ₄ G ₂ Z G ⁺ ₂	A ₁ G ₄ Z G ⁺ ₄	A ₁ G ₁ Z G ⁺ ₁
IV.	A ₁ G ₁ Z G ⁺ ₇	A ₁ G ₁ Z G ⁺ ₂	A ₅ G ₂ Z G ⁺ ₁	A ₂ G ₂ Z G ⁺ ₄	A ₇ G ₇ Z G ⁺ ₁	A ₁ G ₈ Z G ⁺ ₈	A ₅ G ₃ Z G ⁺ ₈	A ₁ G ₈ Z G ⁺ ₈	A ₄ G ₄ Z G ⁺ ₃	A ₈ G ₈ Z G ⁺ ₁	A ₈ G ₈ Z G ⁺ ₁	A ₆ G ₁ Z G ⁺ ₁	A ₅ G ₃ Z G ⁺ ₁	A ₁ G ₃ Z G ⁺ ₈	A ₁ G ₈ Z G ⁺ ₈	A ₁ G ₃ Z G ⁺ ₄	A ₁ G ₃ Z G ⁺ ₄	A ₁ G ₁ Z G ⁺ ₇

I., II., III., IV.: A csökkenő aminosav koncentráció; 1-8.: A 8 mintából az adott frakcióban az adott aminosav hányszor szerepel az adott rangsorral; A: albumin, G: globulin, Z: zein, G⁺: glutelin

A 26. táblázat minősítési rendszere alapján az albumin gazdagabb a következő aminosavakban: Asp, Thr, Gly, Cys, Trp, Lys, Arg és szegényebb a Ser, Ala, Val, Ile, Leu, Tyr, Phe tartalmat illetően.

A globulin gazdagabb ciszteinben, lizinben, argininben és szegényebb prolinban, leucinban és fenilalaninban.

A zein gazdagabb a következő aminosavakban: Ser, Glu, Pro, Ala, Leu, Phe és szegényebb az Asp, Gly, Cys, Lys, His, Trp, Arg tartalmat illetően.

A glutelin gazdagabb a következő aminosavakban: Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe és szegényebb treoninban, glutaminsavban, ciszteinben és lizinben.

A nehezen oldódó zein és glutelin frakciókban sok a hidrofób jellegű aminosav (Ala, Val, Ile, Leu, Phe), míg a könnyebben oldódó frakciókban kevés.

Az egyes frakciók esszenciális aminosavtartalmát vizsgálva megállapítható, hogy az albumin össz-esszenciális aminosavtartalma (29-33%) a legkisebb és általában a zein (37-39%), valamint a glutelin (35-42%) frakcióké a legnagyobb. A globulin frakció össz-esszenciális aminosavtartalma (32-46%) a legváltozékonyabb.

Sharobeem és társai /1987/, az általam is vizsgált Magyarországon termesztett kukoricafajták fehérjefrakcióinak mennyiségi eloszlása és a fehérjetartalom közötti összefüggést vizsgálva megállapították, hogy az albumin és a globulin frakciók korrelációja a fehérjetartalommal pozitív, a glutelin frakcióé negatív, a zeintartalom pedig nem függ az összfehérje mennyiségétől.

A kukoricafehérje vizsgálatok során kapott eredményekből összegzésül a következő megállapítások tehetők:

Az aminosav-összetétel alapján kimutatható, hogy a gabona-nemesítés egyik fontos célkitűzésének, a fehérjetartalom növelésének megvalósítása, a legtöbb esetben nem járt együtt a biológiai érték növekedésével. A fehérjetartalmon belül ugyanis elsősorban a nem esszenciális aminosavak aránya nőtt meg. Ez azzal magyarázható, hogy a fehérje többlet olyan fehérjék formájában jelenik meg, melyek aminosav-összetétele táplálkozástani szempontból kedvezőtlenebb. Ennek figyelembevételével, a nemesítési gyakorlatban olyan megoldásokat célszerű előtérbe helyezni, melyek a különböző fehérjék arányát változtatja meg, s alakítja kedvezően az esszenciális aminosavtartalom változását. E gondolat megvalósításának egyik példája az opaque-2 mutánsok létrehozása, ahol a Lys mennyisége szempontjából kedvezőtlenebb tartalék fehérje (zein) szintézisének csökkentésével a szokásosnál lényegesen nagyobb Lys tartalom biztosítható. A nagy Lys tartalom ellenére, azonban ezek a fajták egyáltalán nem tekinthetők kiemelkedő biológiai értékűeknek. Az opaque-2 mutánsokban a Lys mennyiségének növekedése mellett jelentősen csökkent más esszenciális aminosavak (Leu, Thr, Phe) mennyisége. Ez mutatja, hogy a biológiai érték javulása csak az esszenciális aminosav-összetétel harmonikus megváltoztatása révén érhető el.

4.2. A búza szárazságtűrésének vizsgálatával kapcsolatos eredmények

A szárazságtűrés biokémiai és genetikai vizsgálatát búza szövettenyészetekkel végeztem. Szövettenyészetek esetén a kísérletek évszaktól függetlenül, fitotronban, szabályozott körülmények között folytathatók.

4.2.1. A búzafajták vizsgálatának eredményei

A szárazságra érzékeny Cappelle Desprez, a gyengén toleráns Chinese Spring és a rezisztens Saberbeg és Plainsman búzafajták kalluszainak adaptálódását vizsgáltam a 9%, 13% és 17% mannit által okozott ozmotikus stresszhez. A kísérleti táptalajra való áttöltést követően 2, 10, illetve 21 nap után végeztem a különböző vizsgálatokat.

4.2.1.1. A búzafajták kalluszainak szárazanyagtartalma

A szárazanyagtartalom a kezelési idő növelésével és a szárazságérzékenység fokozódásával nőtt, mind a négy genotípus esetén.

A 21 napos kezelés után (27. táblázat) a kontrollhoz képest, a 9% mannit tartalmú táptalajon jelentős volt a fajták szárazanyagtartalmának változása közötti különbség. A Cappelle Desprez esetén négyszeresére, a Chinese Spring esetén háromszorosára, a Saberbeg és Plainsman esetén kétszeresére nőtt a szárazanyagtartalom.

E. nagyarányú növekedés azonban csak kis részben ered a kallusz hasznos anyagainak felhalmozódásából, nagyobb részben a csökkent víztartalom miatt megváltozott tápanyagfelvételi körülmények eredményeképpen, a szervesen sók fokozott felvételéből származik.

27. táblázat

A különböző mannit koncentrációk hatása a búzakallusok szárazanyagtartalmára, 21 napos tenyésztés után

Mannit %	Fajták			
	Cappelle Desprez %	Chinese Spring %	Saberbeg %	Plainsman %
0	6,9	6,3	9,4	9,1
9	25,6 ^x	19,4 ^x	19,3 ^x	20,3 ^x
13	22,7 ^x	26,1 ^x	-	22,7 ^x
17	25,3 ^x	28,6 ^x	34,1 ^x	29,6 ^x

x = a kontrolltól való eltérés szignifikáns (P = 0,05)

4.2.1.2. A búzafajták kalluszainak növekedési rátája

A kallusok növekedése (28. táblázat) már két nappal a mannitos táptalajra való áttöltés után csökkent, bár ez a csökkenés csak a Cappelle Desprez fajtánál volt szignifikáns a 13% mannit hatására. Tíz nap múltán, a három vizsgált fajta esetében (Cappelle Desprez, Chinese Spring és Saberbeg) szignifikáns volt a növekedés csökkenése. A 21 napos kezelés elteltével mind a négy fajta (kivéve a Plainsmant 9%-nál) növekedése szignifikánsan csökkent a mannit hatására.

A mannit koncentrációjának növelése, a vízfelvétel erősödése révén a kallusok növekedése szempontjából egyre kedvezőtlenebb körülményeket teremtett.

28. táblázat

A különböző mannit koncentrációk hatása a búzakalluszok
növekedésére 2, 10 és 21 napos tenyésztés után

Fajták	Mannit %	Kezelési idő (nap)		
		2	10	21
Cappelle Desprez	0	133,8	122,8	52,7
	9	97,9	12,3 ^{xx}	14,1 ^{xx}
	13	33,8 ^{xx}	13,5 ^{xx}	21,8 ^{xx}
	17	-	-	-
Chinese Spring	0	103,2 ^a	45,3	34,1
	9	-	-	14,8 ^{xx}
	13	72,2	25,4 ^{xx}	14,2 ^{xx}
	17	-	-	11,1 ^{xx}
Saberbeg	0	129,7	81,6	42,8
	9	-	-	33,4 ^{xx}
	13	52,3	34,6 ^{xx}	20,1 ^{xx}
	17	-	-	18,5 ^{xx}
Plainsman	0	-	-	35,5
	9	-	-	26,9
	13	-	-	20,8
	17	-	-	15,3 ^{xx}

a = Minden feltüntetett adat 10^3 -szorososa a számított értékek.

xx = A kontrolltól való eltérés szignifikáns. (P=0,05).

- = A kalluszok befertőződése miatt nincs mérési adat.

A relatív növekedési ráták alapján a Cappelle Desprez és a Chinese Spring mondható a legérzékenyebbnek, de ezek az adatok önmagukban nem elegendők az egyes fajták megkülönböztetésére.

4.2.1.3. A búzafajták kalluszainak szabad aminosavtartalma

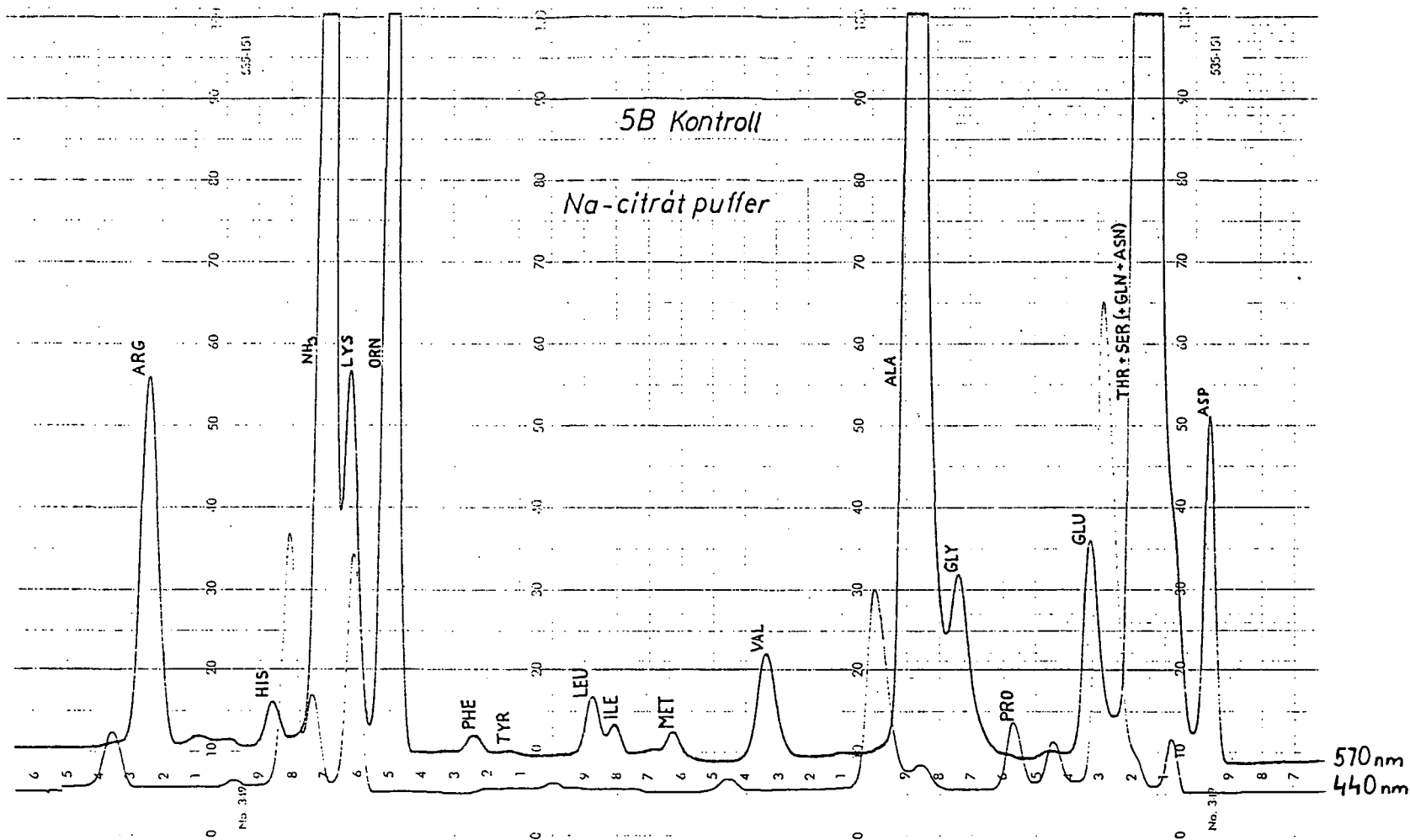
Az ozmotikus adaptációban a citoplazmában felhalmozódó kismolekulájú szerves vegyületek is szerepet játszanak.

Megvizsgáltam, hogy a mannitos kezelés befolyásolja-e a különböző búzafajtákból indukált kalluszok szabad aminosavtartalmát.

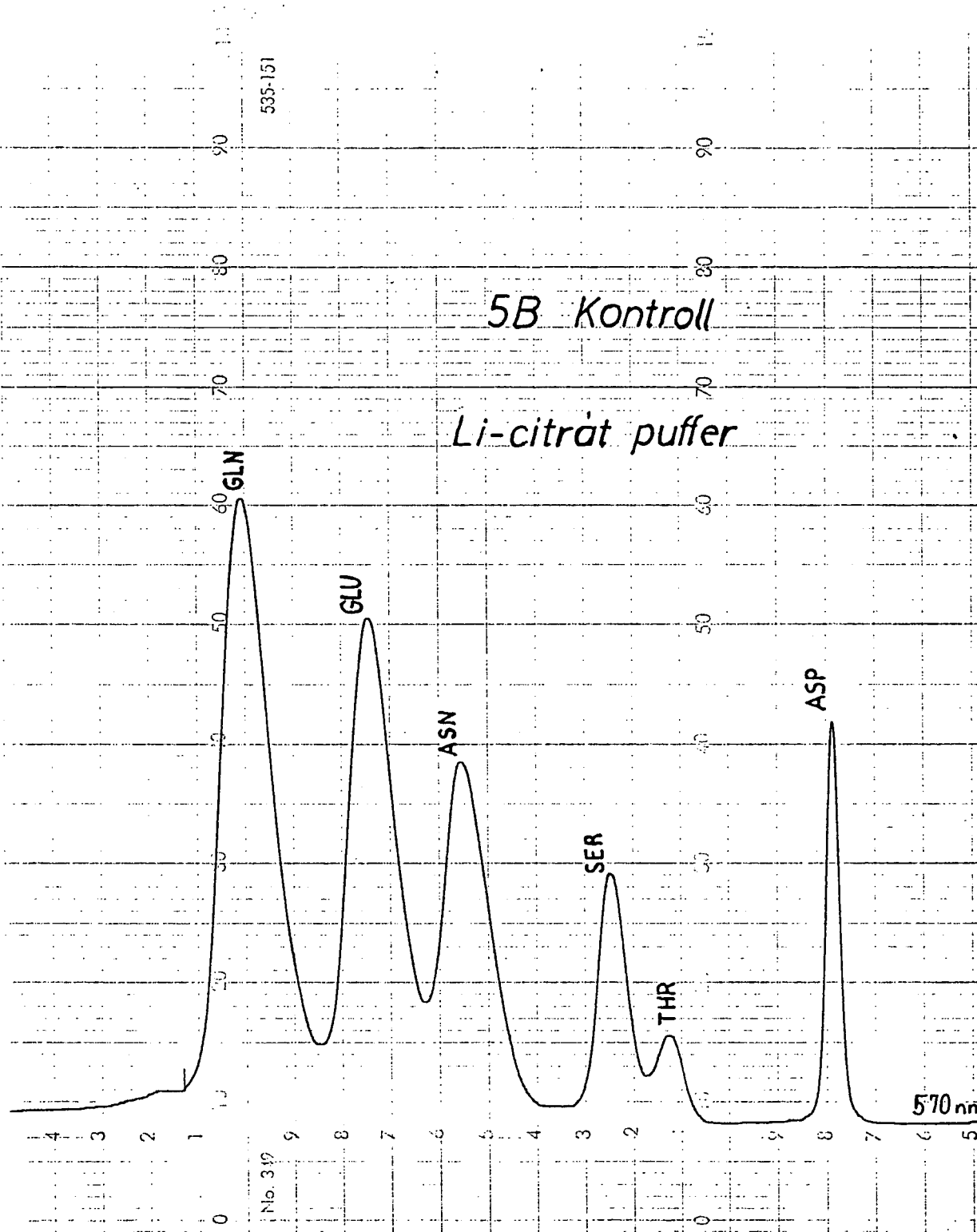
A szabad aminosavak meghatározására használt Na-citrátos puffer esetén, az aszparagin és a glutamin nem választható el a többi aminosavtól, amint ez a 3. ábrán látható. A Na-citrát puffer helyett Li-citrát puffert (pH = 3,2) alkalmazva, 40 °C-on a kérdéses meghatározás elvégezhető (4. ábra).

A négy búzafajta összes szabad aminosav mennyiségének változását a 29. táblázatban foglaltam össze. A Cappelle Desprez fajta összes szabad aminosavtartalma mind az idő, mind a növekvő mannit koncentráció függvényében nőtt. A Chinese Spring esetén az aminosavak mennyisége csak a mannit koncentráció függvényében nőtt. A Saberbeg fajtánál nagyon enyhe növekedést mutatott, míg a Plainsman fajta összes szabad aminosavtartalma alig változott a kezelés hatására.

Az összes szabad aminosavtartalomban bekövetkezett változások alapján a fajták megkülönböztethetők a kontrollhoz viszonyított növekedési arányok alapján. A két érzékenyebb fajta össz szabad aminosavtartalma a 21 napos kezelési idő után, 13% mannitot tartalmazó táptalajon közel háromszorosára, a Saberbeg fajtánál másfélszeresére nőtt, a Plainsman fajtánál gyakorlatilag nem változott.



3. ábra: Az aminosavanalízis kromatogramja



4. ábra: Az aminosavanalízis kromatogramja

29. táblázat

A búzafajták kalluszainak összes szabad aminosav-
tartalma (mg/g) az idő és a mannit koncentráció
függvényében

Fajták	Mannit %	Kezelési idő (nap)		
		2	10	21
Cappelle Desprez	0	2,84	2,76	2,28
	9	2,97	7,96	5,67
	13	3,91	7,72	6,03
	17	-	-	5,97
Chinese Spring	0	3,68	2,73	2,53
	9	-	-	5,06
	13	6,35	5,63	7,22
	17	-	-	6,80
Saberbeg	0	4,23	3,79	2,79
	9	-	-	4,19
	13	4,47	5,57	4,53
	17	-	-	5,63
Plainsman	0	-	-	5,03
	9	-	-	4,37
	13	-	-	5,48
	17	-	-	5,47

A kontroll kalluszok szabad aminosav-összetételét összehasonlítva a következő megállapítások tehetők. (5. ábra A, B és 6. ábra).

A Cappelle Desprez kalluszaiban a savas aminosavak koncentrációja nagyobb, míg a neutrális és bázikus aminosavak mennyisége kisebb a többi fajtához viszonyítva.

A Cappelle Desprez kalluszok szabad aminosav-összetétele a többi fajtáéhoz képest eltérő módon változott meg a mannit hatására. A Cappelle Desprez fajtánál az Asn, Glu, Gln, Pro, Ala, Lys és Arg koncentrációja nagymértékben nőtt, míg a Chinese Spring esetén az emelkedés mértéke kisebb volt. A két rezisztens fajtánál a felsorolt amino-

savak többségének (Pro és Arg kivételével) koncentrációja csökkent.

A legnagyobb különbségeket a kontrollhoz képest a Pro mennyiségében tapasztaltam. A Cappelle Desprez kalluszaiban a prolin koncentráció 16-szorosára, a Chinese Spring kalluszaiban 8-szorosára, a Saberbeg kalluszaiban 5-szörösére, a Plainsman kalluszaiban másfélszeresére nőtt.

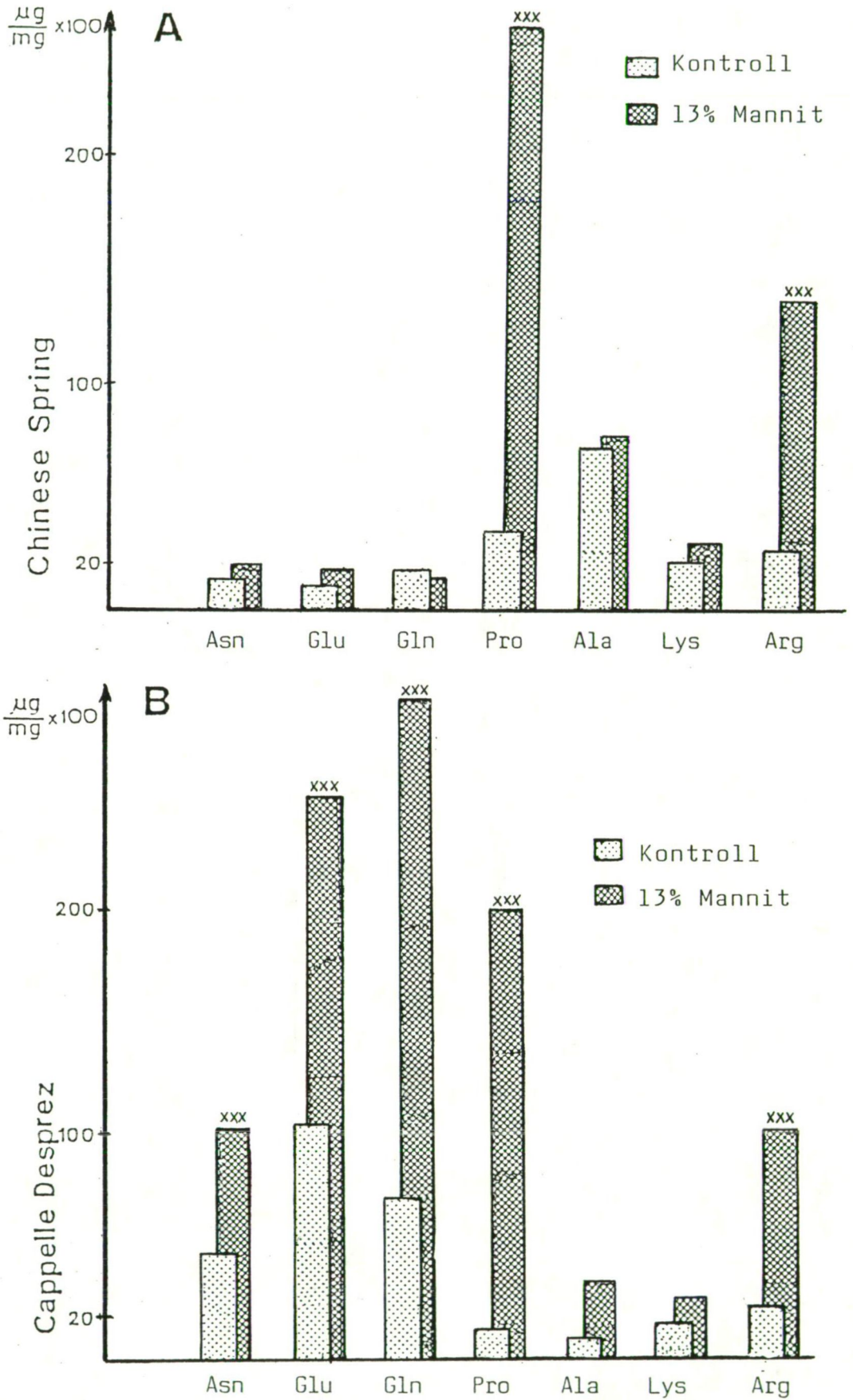
Az arginin mennyisége a prolinhoz hasonló módon változott a kezelés hatására. Mindkét aminosav koncentrációja a mannit kezelés időtartamának növelésével is arányosan emelkedett.

A Pro mennyiségének nagyarányú növekedése azonban nem tekinthető az ozmotikus stressz specifikus jelzőjének, mivel általános tapasztalat szerint a Pro felhalmozódása sokféle stressz (só, fagy stb.) hatására bekövetkezik /Kaldy és Freyman, 1984/.

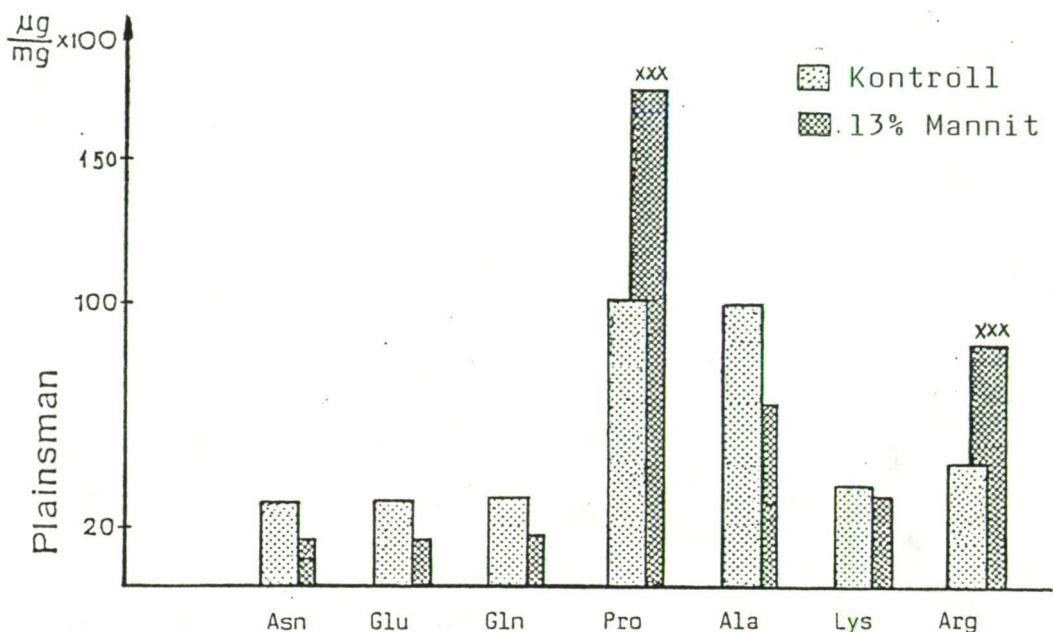
Az ozmotikus stressz hatására elsősorban az ún. glutaminsav családhoz (Gln, Arg, Pro), illetve az aszparaginsav családhoz (Asn, Lys) tartozó aminosavak mennyiségében következett be változás.

Az egyes fajták megkülönböztethetők egyrészt a szabad aminosav-összetétel alapján, másrészt a bekövetkező változások mértéke szerint.

Az arginin (putreszcin, spermin, spermidin) és a lizin (kadaverin) néhány poliamin prekursora, ezért megvizsgáltam a kalluszkok poliamintartalmának változását a szárazságstressz függvényében.



5. ábra: A mannit hatása a Chinese Spring (A) és a Cappelle Desprez (B) kallusok szabad aminosavtartalmára 21 napos tenyésztés után
xxx : 0,1%-os szinten szignifikáns az eltérés



6. ábra: A mannit hatása a Plainsman fajta kalluszának szabad aminosavtartalmára 21 napos tenyésztés után
xxx: 0,1%-os szinten szignifikáns az eltérés

4.2.1.4. A búzafajták kalluszainak szabad poliamintartalma

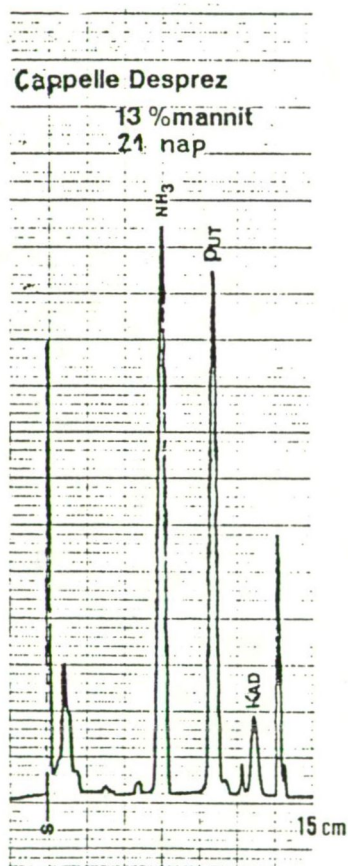
A poliaminokat (putreszcin /PUT/, spermin /SPM/, spermidin /SPD/, kadaverin /KAD/) danzil származékuk alapján, túlnyomásos rétegekromatográfiával (OPLC) határoztam meg. E módszer előnye a klasszikus rétegekromatográfiával szemben, hogy szabályozott körülményei miatt, a reprodukálhatóbb eredményeket lényegesen rövidebb, kb. ötödannyi idő alatt szolgáltatja.

A kromatográfiás meghatározás optimális körülményeinek beállítását standard poliaminok elemzésével végeztem. A kísérlet menete megfelel a 3.3.7.4. pontban leírtaknak.

Az R_f értékek alakulását a 30. táblázat tartalmazza. Egy minta jellegzetes denzitogramja a 7. ábrán látható.

30. táblázat
Az OPLC-s kifejlesztés során kapott R_f értékek

Futtató elegy	Kloroform-triethylamin (10:1,5)			
Poliaminok	PUT	KAD	SPM	SPD
R_f érték	0,49	0,67	0,90	0,93



7. ábra: A danzil-poliaminok OPLC-s kifejlesztésének denzitogramja

A kalluszok spermin- és spermidintartalma olyan kicsi volt, hogy mennyiségi értékelésük nem volt megbízható, ezért csak a putreszcinre és kadaverinre vonatkozó adatokat tárgyalom.

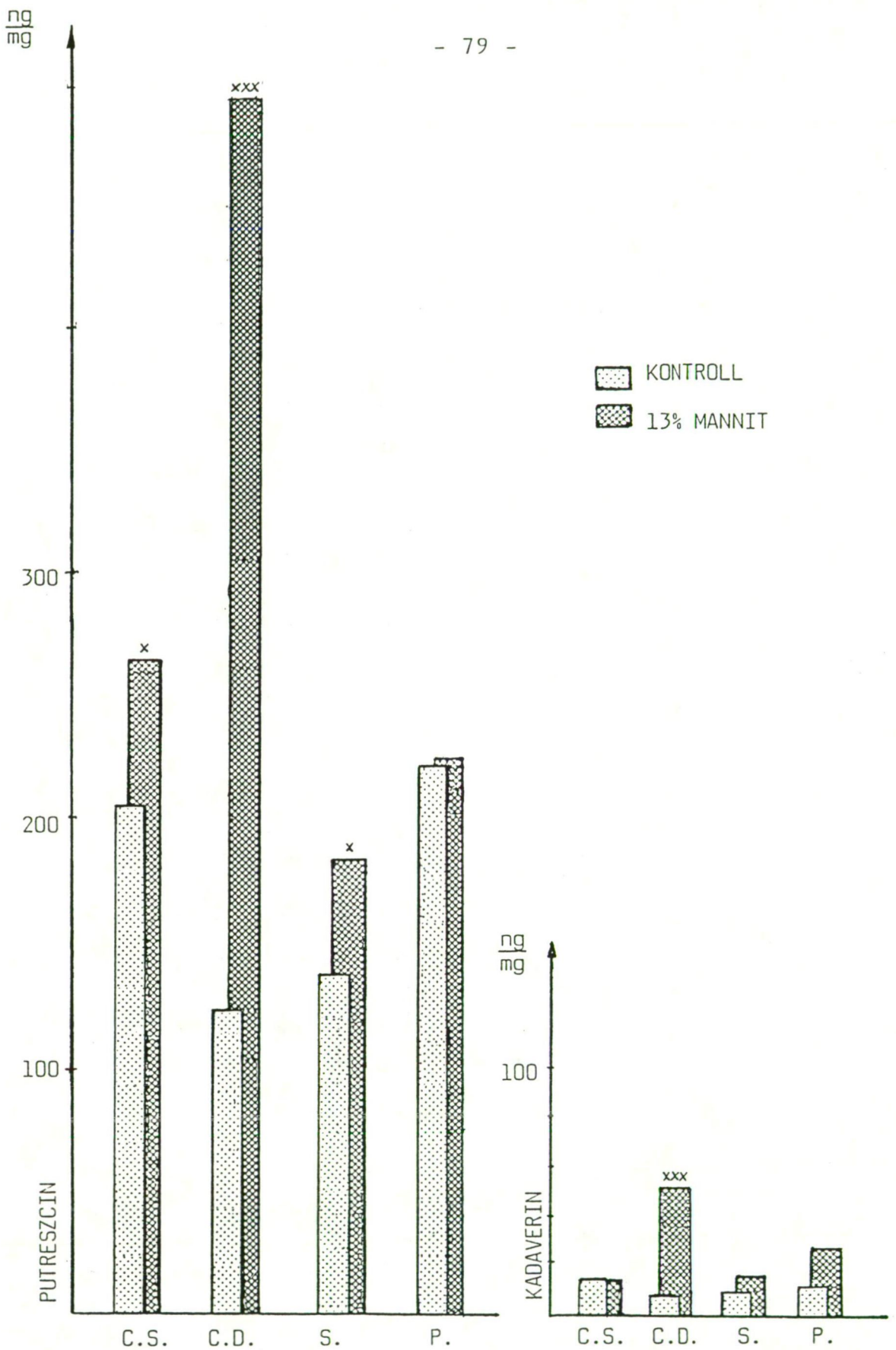
A kalluszok egy nagyságrenddel több putreszcint tartalmaztak, mind kadaverint (8. ábra). A mannit hatására csak a Cappelle Desprez putreszcintartalma nőtt szignifikánsan. A Chinese Spring és a Saberbeg kalluszaiban kismértékű növekedés volt tapasztalható. A kadaverintartalom is a szárazságra érzékeny fajtánál növekedett.

A poliamintartalom növekedés két hatás eredménye lehet. Egyrészt származhat a poliaminok de novo szintéziséből, másrészt a növekedés oka a kötött-szabad poliamin arány megváltozása lehet. Ennek tisztázásához a továbbiakban szükséges a kötött poliaminok mennyiségének meghatározása.

4.2.1.5. A búzafajták kalluszainak extrahálható fehérjetartalma

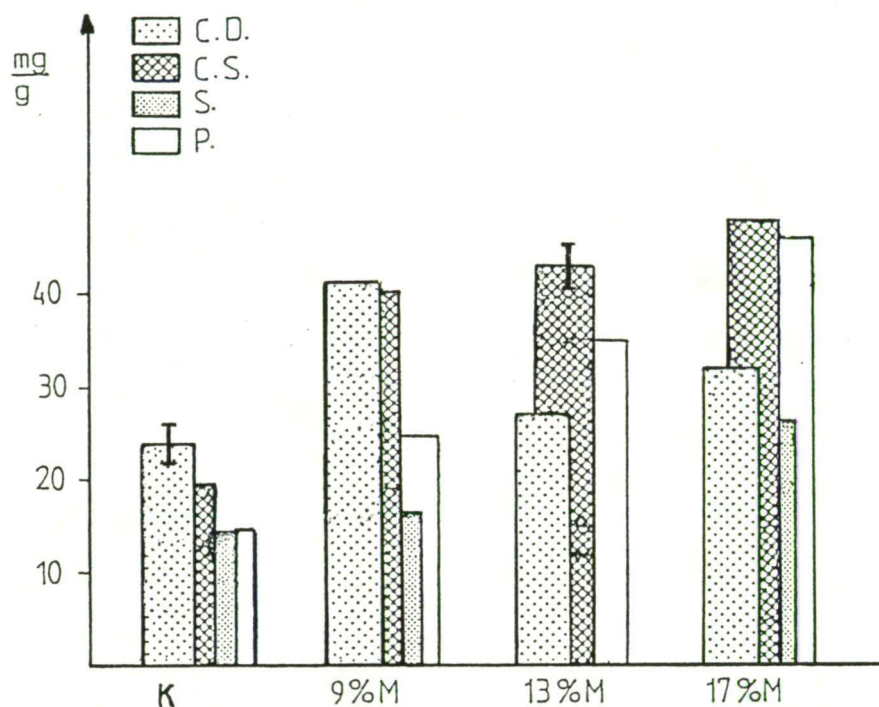
Hosszan tartó szárazság okozta vízvesztés zavart okozhat a fehérjék bioszintézisében, ezért megvizsgáltam, hogy az ozmotikus stressz milyen változást idézett elő a kalluszok extrahálható fehérjetartalmában.

A mannit hatására az extrahálható fehérjetartalom (9. ábra) kismértékben növekedett a rezisztens Plainsman és Saberbeg fajta kalluszaiban. A másik két fajtánál (Chinese Spring, Cappelle Desprez), a 9% mannitot tartalmazó táptalajon fejlődött kalluszok extrahálható fehérjetartalma közel kétszeresére nőtt a kontrollhoz képest. A nagyobb mannit koncentrációk esetén a változás fajtánként különbözött. Ebből az adatsorból azonban nem lehet egyértelműen a szintetizált fehérjetartalomra következtetni, mivel az



8. ábra: A mannit hatása a különböző búzafajták putreszcín és kadaverin tartalmára 21 napos tenyésztés után
C.D.: Cappelle Desprez, C.S.: Chinese Spring, S.: Saberbeg, P.: Plainsman, xxx: 0,1%-os szinten szignifikáns az eltérés, x: 5%-os szinten szignifikáns az eltérés

extrahálhatóság a feltételek megváltozásától (pl. a sejtmembránok állapotától) is függ. A mért fehérjetartalom változások korrekt értékelésére csak egy teljes nitrogén-mérleg (összes nitrogén, szabad aminosav, polipeptid, nukleinsav) feállítása után kerülhet sor.



9. ábra: A mannit hatása a különböző búzafajták kalluszainak extrahálható fehérjetartalmára, 21 napos kezelés után

C.D. = Cappelle Desprez K = kontroll
C.S. = Chinese Spring M = mannit
S. = Saberbeg
P. = Plainsman

4.2.1.6. A proteolitikus enzimaktivitás vizsgálatok eredménye

A fehérjék mobilizálásáért felelős endo- és exopeptidázok aktivitásának vizsgálatával magyarázatot találhatunk a fehérjetartalomban bekövetkezett változásokra.

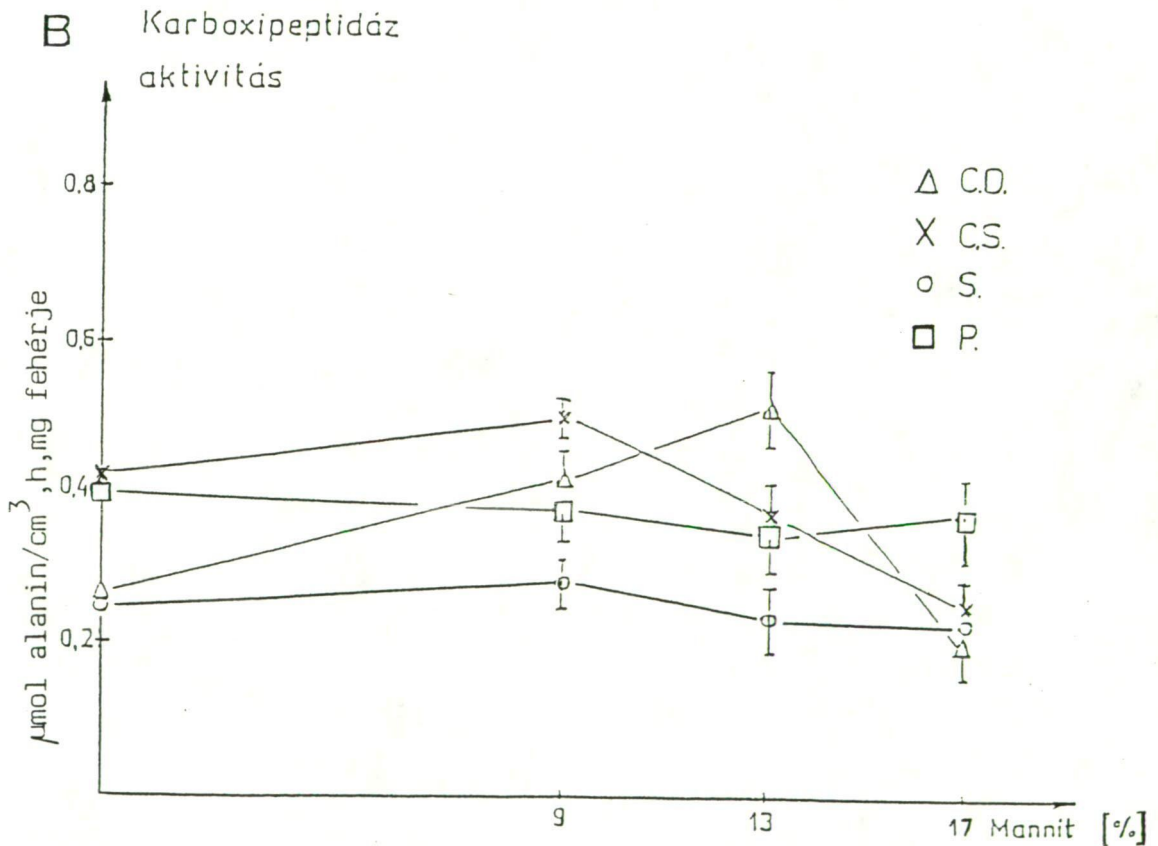
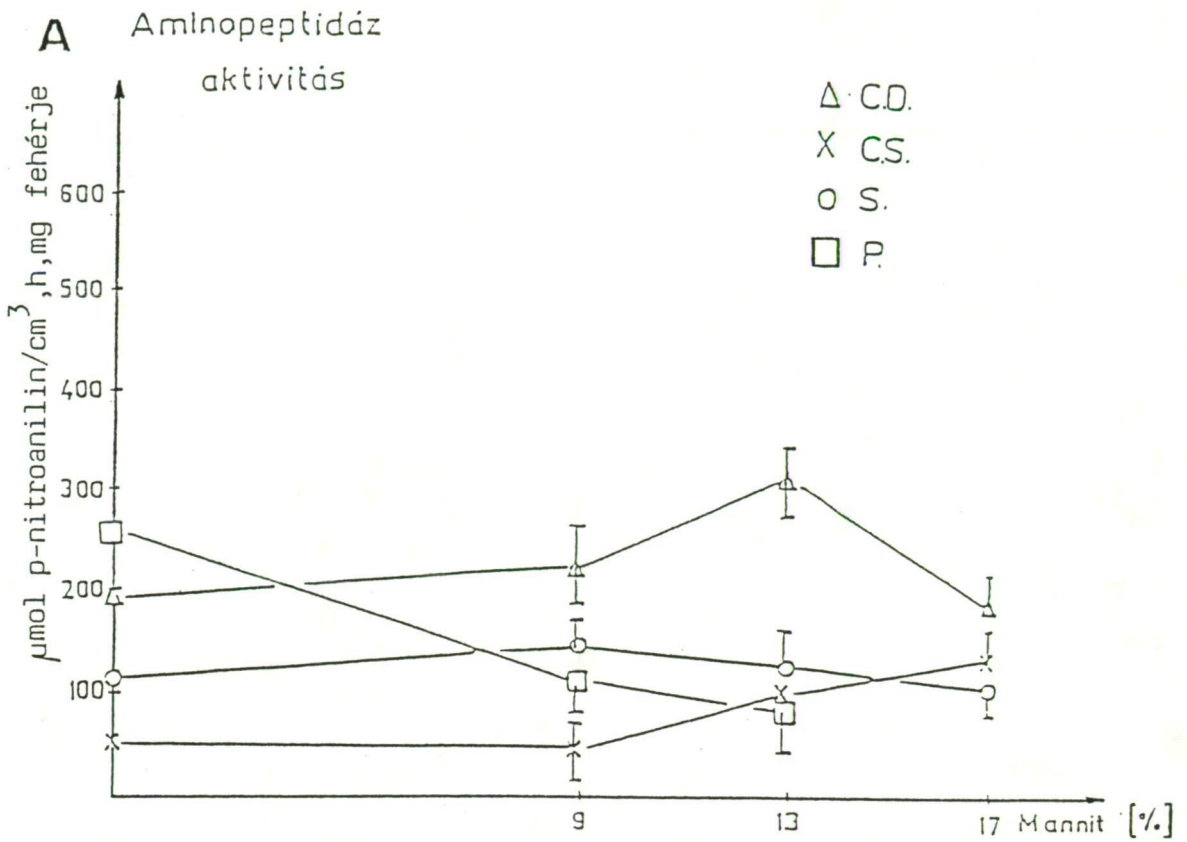
Az egyes búzafajták kontroll kalluszainak aminopeptidáz aktivitásai lényegesen különböztek egymástól (10. ábra A). Az aminopeptidáz aktivitás a Plainsman fajtánál volt a legnagyobb, ezt követte a Cappelle Desprez, a Saberbeg és a Chinese Spring fajtánál mért érték. Kis mannit (9%) koncentrációnál a specifikus aminopeptidáz aktivitás változatlan maradt, illetve a Plainsman fajta esetén csökkent. A 13% mannit hatására a Cappelle Desprez aminopeptidáz aktivitása szignifikánsan nőtt. Ez a tendencia 10 napos kezelés után kifejezettebb volt (ekkor még a 17% mannitos kezelés hatására is nőtt az aktivitás), mint 21 nap elteltével. A Chinese Spring enzimaktivitása enyhén nőtt.

A Saberbeg és a Plainsman fajták kalluszainak karboxipeptidáz aktivitása nem változott meg a mannit hatására (10. ábra B). A Cappelle Desprez karboxipeptidáz aktivitása jelentősen megnőtt 9% és 13% mannit jelenlétében. A legmagasabb (17%) mannit koncentráció hatására a Chinese Spring és a Cappelle Desprez fajták karboxipeptidáz aktivitása nagymértékben csökkent.

A kalluszokban az endopeptidáz aktivitás nagyon alacsony volt. Az endopeptidáz aktivitás nem változott lényegesen a mannitos kezelés hatására egyetlen vizsgált búzafajtánál sem.

Összegzésül a 4 búzafajta kalluszainak vizsgálata alapján a következő megállapítások tehetők:

A mannit által előidézett ozmotikus stressz hatására a legjellegzetesebb változások a szárazságra érzékeny Cappelle Desprez kalluszaiban következtek be.



10. ábra: A mannit hatása a búzafajták kalluszainak aminopeptidáz (A) és karboxipeptidáz (B) aktivitására 21 napos tenyésztés után
 Δ : Cappelle Desprez, X: Chinese Spring, O: Saberbeg, \square : Plainsman, a függőleges vonalak a középértékek szórását jelölik.

A legnagyobb száraztömeg növekedés, a növekedés csökkenése, a szabad aminosavtartalom növekedés ennél a fajtánál tapasztalható.

A szárazságtűrő búzafajták (Saberbeg, Plainsman) szabad aminosavtartalma csak kismértékben növekedett az ozmotikus stressz során. Ugyanezeknél a fajtáknál az extrahálható fehérjetartalom enyhén emelkedett, s ezzel párhuzamosan az amino- és karboxipeptidáz aktivitások alig változtak, illetve csökkentek az ozmotikum koncentrációjának függvényében.

Az érzékeny Cappelle Desprez kalluszaiban mért extrahálható fehérjetartalom (13% M) a fehérje mobilizálódásának következménye lehet, amit az egyidejűleg tapasztalt megnövekedett aminopeptidáz és karboxipeptidáz aktivitás alátámaszthat.

A fehérjeszintézis intenzitása és a szabad aminosavszint közötti kapcsolatot az is befolyásolja, hogy a sejt egyidejűleg különböző készletekben (poolokban, kompartmentekben) tarthatja ugyanazon vegyületeket. Így az aminosavak nem teljes mennyisége egyformán hozzáférhető a fehérjeszintézis számára. Emiatt a szabad aminosavak nagymértékű felszaporodása sok esetben nem jár együtt a fehérjeszintézis intenzitásának megnövekedésével, illetve az intenzív fehérjeszintézis mellett gyakran nem észlelhető a szabad aminosavak mennyiségének jelentős csökkenése.

A poliaminok (putreszcin, kadaverin) felhalmozódása a vizsgált búzafajták kalluszaiban a mannitos kezelés hatására genotípustól függ. Annak megválaszolása, hogy a növekedés eredete poliamin bioszintézis vagy a kötött és szabad poliaminok átalakulása, további vizsgálatokat igényel.

Az egyes búzafajták szárazságtűrésének vizsgálatára alkalmasnak bizonyult az in vitro rendszer. A vizsgált genotípusok három kategóriába sorolhatók: érzékeny (Cappelle Desprez), kevésbé érzékeny vagy közepesen rezisztens (Chinese Spring) és rezisztens (Saberbeg és Plainsman). A fenti minősítést jól tükrözte a vizsgált fajták kalluszainak viselkedése. Az egyes búzafajták közötti különbségek megállapítására a 13% mannitot tartalmazó táptalaj bizonyult a legmegfelelőbbnek, bár néhány esetben a 9% mannit érzékenyebb volt a két érzékeny fajta közötti különbségtételre.

Az összefüggések genetikai eredetének tisztázására a Chinese Spring - Cappelle Desprez szubsztitúciós sorozatot vizsgáltam a búzafajtáknál alkalmazott szempontok szerint.

4.2.2. A szubsztitúciós sorozat vizsgálatával kapott eredmények

A szárazságtűrés citogenetikai vizsgálatának legfontosabb módszere a szubsztitúciós analízis. Ha megfelelő különbség van a recipiens és a donor fajta tulajdonságai között, akkor a változások alapján a kromoszóma csere hatása megbízhatóan kimutatható.

A vizsgált Chinese Spring - Cappelle Desprez kromoszóma szubsztitúciós sorozatából a 2A és 2B vonalak hiányoztak.

4.2.2.1. A szubsztitúciós sorozat szárazanyagtartalma és növekedési rátája

A szárazanyagtartalom meghatározás eredményeit a 31. táblázat tartalmazza.

A szubsztitúciós sorozat vonalainál a búzafajták esetén mért eredményekhez hasonlóan, szignifikánsan nőtt a szárazanyagtartalom a kezelés hatására. Az egyes vonalak között a különbség azonban nem volt szignifikáns.

A növekedési rátákat a 32. táblázatban foglaltam össze.

31. táblázat

A Cappelle Desprez, Chinese Spring búzafajta, valamint a szubsztitúciós sorozat kalluszainak szárazanyagtartalma 21 napos tenyésztés után, mannit mentes (K) és 13% mannitot (M) tartalmazó táptalajokon

Minta	Kezelés	
	K (%)	13%M(%)
Cappelle Desprez	6,9	22,7
Chinese Spring	6,3	26,1
1A	7,0	22,4
3A	6,1	21,5
4A	7,5	23,0
5A	7,6	30,8
6A	7,3	22,1
7A	5,9	24,7
1B	7,4	21,8
3B	8,9	22,5
4B	8,9	25,1
5B	8,4	23,1
6B	6,4	26,4
7B	7,4	23,2
1D	7,7	21,5
2D	7,7	23,9
3D	8,8	22,6
4D	7,4	26,6
5D	9,5	36,0
6D	7,2	26,8
7D	10,2	22,6

A, B, D = genom; 1-7 = kromoszóma

32. táblázat

A Cappelle Desprez, a Chinese Spring, valamint a szubsztitúciós sorozat kalluszainak növekedési rátái, 21 napos tenyésztés után, mannit mentes (K) és 13% mannitot (M) tartalmazó táptalajokon

Minta	Kezelés	
	K (%)	13% M(%)
Cappelle Desprez	52,7 ^a	21,8
Chinese Spring	34,1	14,2
1A	38,7	12,9
3A	38,2	13,4
4A	47,0	16,6
5A	56,8 ⁺	22,5 ⁺
6A	43,2	20,3
7A	57,2 ⁺	19,1 ⁺
1B	42,7	11,0
3B	37,8	12,7
4B	44,4	1,48
5B	42,0	16,2
6B	41,2	19,1
7B	42,9	13,3
1D	23,6	11,0
2D	35,5	17,4
3D	49,3	18,9
4D	55,2 ⁺	22,3 ⁺
5D	51,7	14,4
6D	31,7	19,6
7D	44,4	16,7

A, B, D = genom; 1-7 = kromoszóma

a = valamennyi adat 10^3 -szorososa a számított értéknek

+ = a kiindulási fajtához képest szignifikáns (P = 0,05) eltérés

A szubsztitúciós sorozat növekedési rátái szignifikánsan csökkentek a kezelés hatására. Az egyes vonalakban, az 5A, 7A, 4D kivételével, a változás nem volt szignifikáns. Az említett vonalaknál mért adatok a Cappelle Desprez szülőfajtához hasonlítottak.

4.2.2.2. A szubsztitúciós sorozat szabad aminosavtartalma

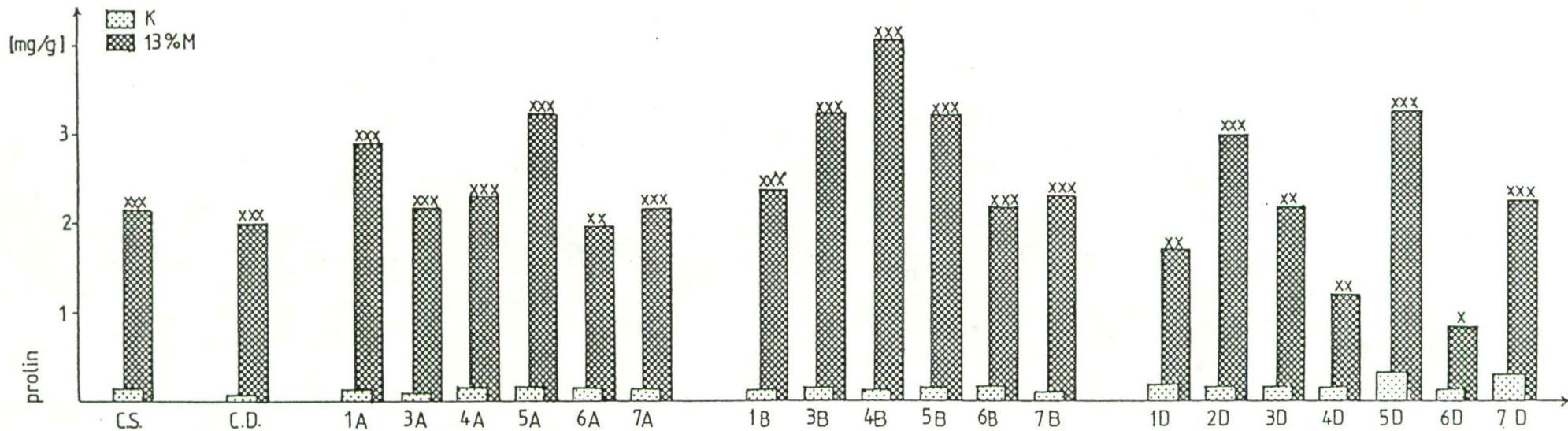
A szubsztitúciós sorozat összes szabad aminosavtartalma nőtt a mannitos kezelés hatására. A kontroll kallusok átlagos össz szabad aminosavtartalma $4,9 \mu\text{g}/\text{mg}$, a 13% mannittal kezelt kallusoké $8,2 \mu\text{g}/\text{mg}$. Az 1A ($9 \mu\text{g}/\text{mg}$), 5A ($11,7 \mu\text{g}/\text{mg}$), 3B ($9,5 \mu\text{g}/\text{mg}$), 4B ($11,9 \mu\text{g}/\text{mg}$) 5B ($10 \mu\text{g}/\text{mg}$) vonalaknál a kezelés hatására az össz szabad aminosavak mennyisége lényegesen nagyobb volt az átlagosnál.

Az egyes aminosavakat tekintve a legnagyobb mértékben a prolin tartalom növekedett a mannitos kezelés hatására. Valamennyi vonalnál szignifikáns volt az eltérés a kontrollhoz képest (11. ábra). A prolin abszolút mennyisége a két szülőfajtát is beleértve, az 1A, 5A, 3B, 4B, 5B, 2D és 5D vonalak esetén volt a legnagyobb.

A szubsztitúciós vonalak kontroll mintáinak jellemzője, az aszparagint (12. ábra) és a glutamint illetően, hogy a Cappelle Desprez kontrollhoz hasonlítanak, azaz a Chinese Spring kontrollhoz képest mennyiségük nagyobb. Már önmagában a kromoszóma csere, e két vegyület esetén az érzékenyebb fajta tulajdonságának érvényre jutását eredményezte.

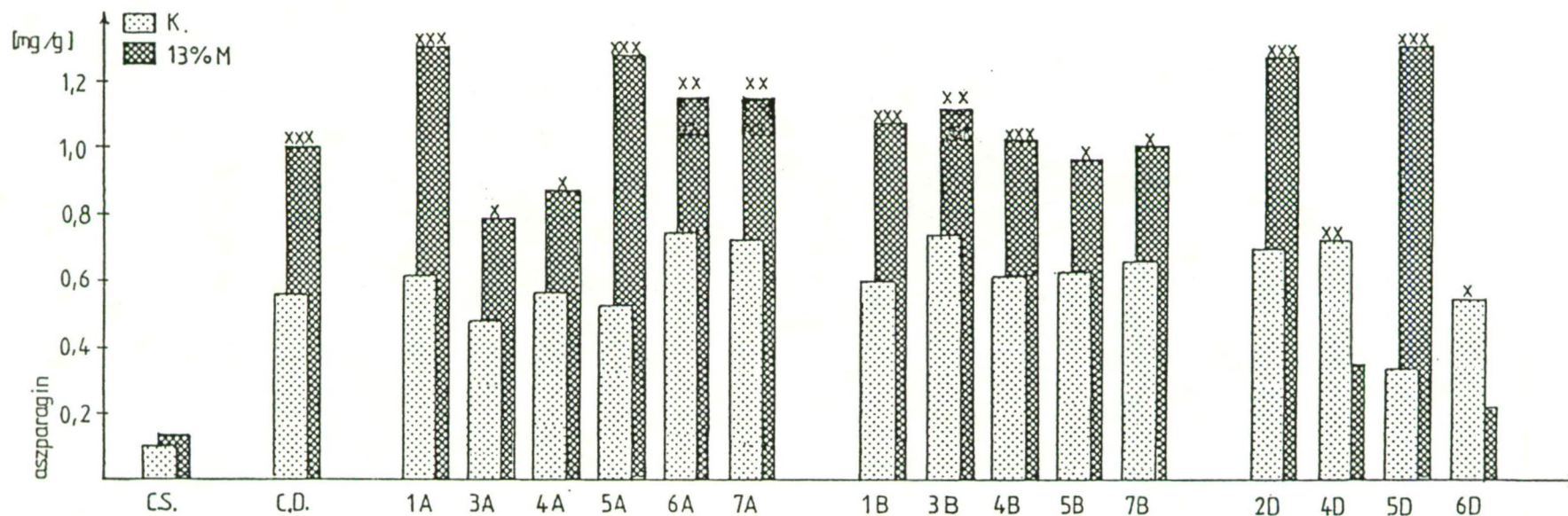
A mannitos kezelés hatására az 1A, 5A, 2D, 5D vonalak aszparaginttartalma meghaladta a Cappelle Desprez fajtánál mért értéket.

A többi, a szülőfajták vizsgálatánál kiemelt aminosavak (Arg, Lys, Gln) mennyiségének változásai, a szubsztitúciós sorozatban, a két szülő értékváltozásai közé estek.



xxx = 0,1%-os, xx = 1%-os, x = 5%-os szinten szignifikáns az eltérés

11. ábra: A szabad prolintartalom változása 21 napos kezelés után
 C.S.: Chinese Spring, C.D.: Cappelle Desprez, 1-7 : kromoszóma,
 A,B,D: genom, K: kontroll, M: mannit



xxx = 0,1%-os, xx = 1%-os, x = 5%-os szinten szignifikáns az eltérés

12. ábra: A szabad aszparagintartalom változása 21 napos kezelés után
 C.S.: Chinese Spring, C.D.: Cappel Desprez, 1-7: kromoszóma,
 A,B,D: genom, K: kontroll, M: mannit

Főkomponens analizissel megvizsgáltam az összes szabad aminosav együttes változását.

A szubsztitúciós sorozat összes szabad aminosavait, mint vektorokat tekintve, a korrelációs mátrix saját értéke alapján megállapítható, hogy az első négy főkomponens a rendszer teljes varianciájának 66%-át írja le.

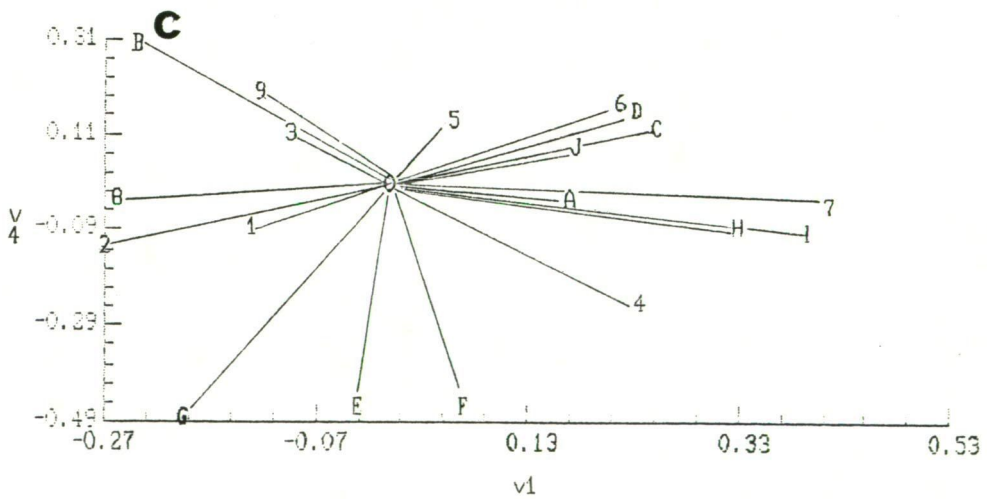
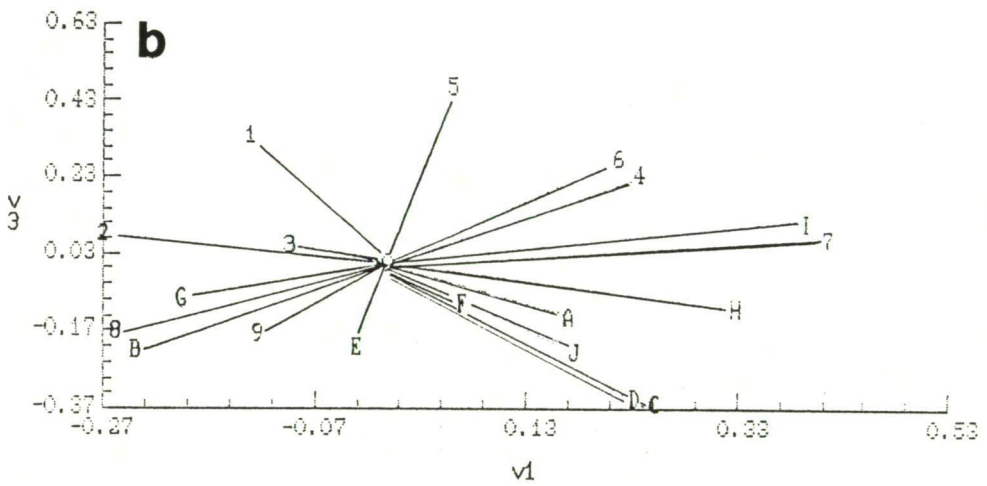
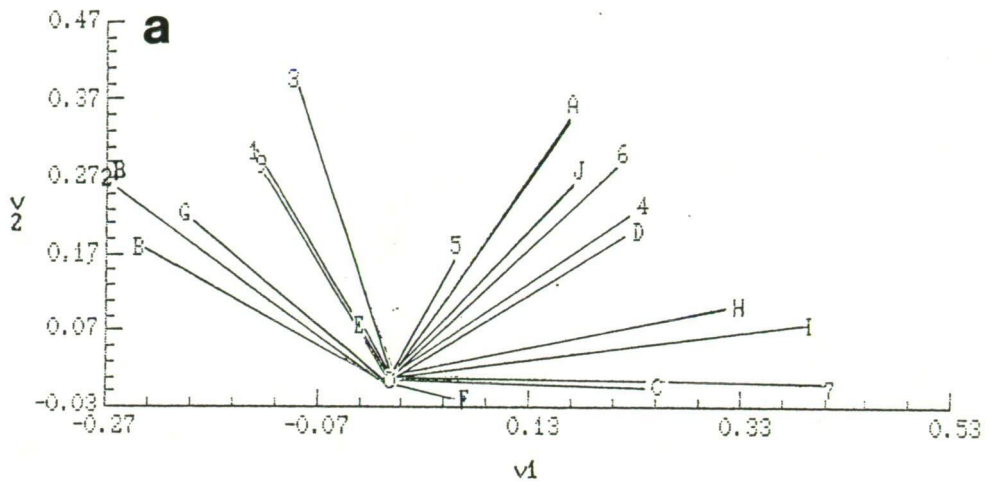
A 13. ábrán látható, hogy az adott változó milyen hosszal, mely irányba mutat azaz, hogy melyik aminosav, melyik főkomponens kiszámításában, milyen súllyal szerepel. Az I. főkomponensben (13. ábra a) a Pro, Arg, His, Ile vesz részt legnagyobb súllyal. A II. főkomponensben (13. ábra a) a Ser, Asp, Ala, Val, Orn, Gln, Asn, Leu, a III. főkomponensben (13. ábra b) a Glu, a IV. főkomponensben (13. ábra c) a Lys, Tyr, Phe, Met szerepel nagyobb súllyal.

A 13% mannitos kezelés hatása leginkább az I. főkomponensben mutatkozik (14. ábra). Ez azt jelenti, hogy a mannit hatására elsősorban azoknak az aminosavaknak a mennyisége változik meg, melyek az I. főkomponensben játszanak nagyobb szerepet.

Variancia analizissel ellenőrizve megállapítható, hogy a mannitos kezelés, a genom és a kromoszóma hatása is szignifikáns az I. főkomponens tekintetében.

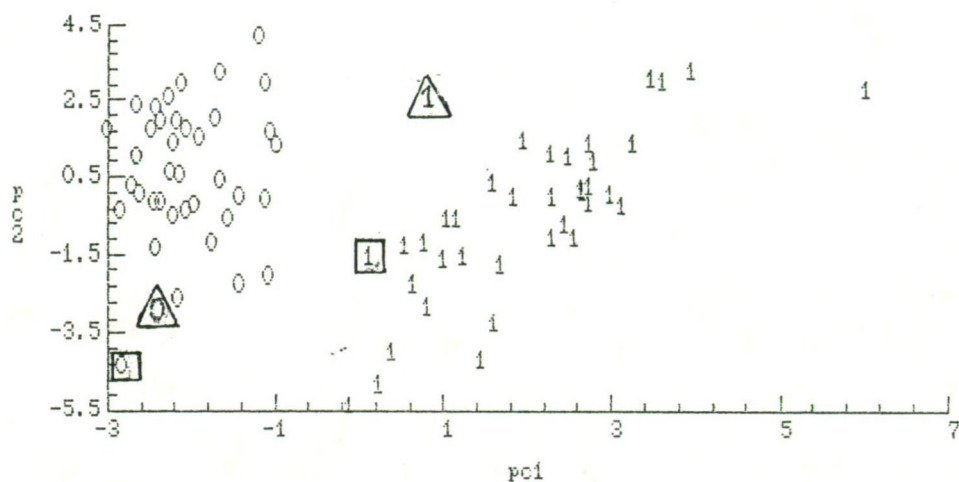
A kezelés hatására (15. ábra a) az I. főkomponensben nagyobb súllyal szereplő aminosavak mennyisége növekszik (Pro, Arg).

Genomok szerint vizsgálva (15. ábra b) a két szülő fajta nem különbözik egymástól. A kromoszóma csere az A és B genomok esetén a donor szülő fajta (Cappelle Desprez) szintjét is meghaladja.



- 1 Asp
- 2 Thr
- 3 Ser
- 4 Asn
- 5 Glu
- 6 Gln
- 7 Pro
- 8 Gly
- 9 Ala
- A Val
- B Met
- C Ile
- D Leu
- E Tyr
- F Phe
- G Lys
- H His
- I Arg
- J Orn

13. ábra: Az eredeti változók (aminosavak) vetülete a főkomponensek síkjában (v1-v4)



14. ábra: Az eredeti minták ábrázolása az első két főkomponens síkjában

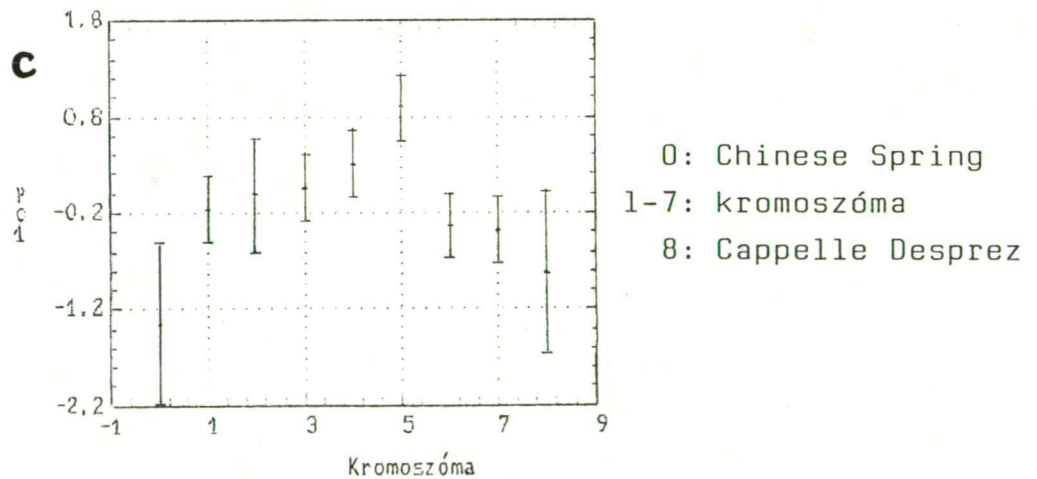
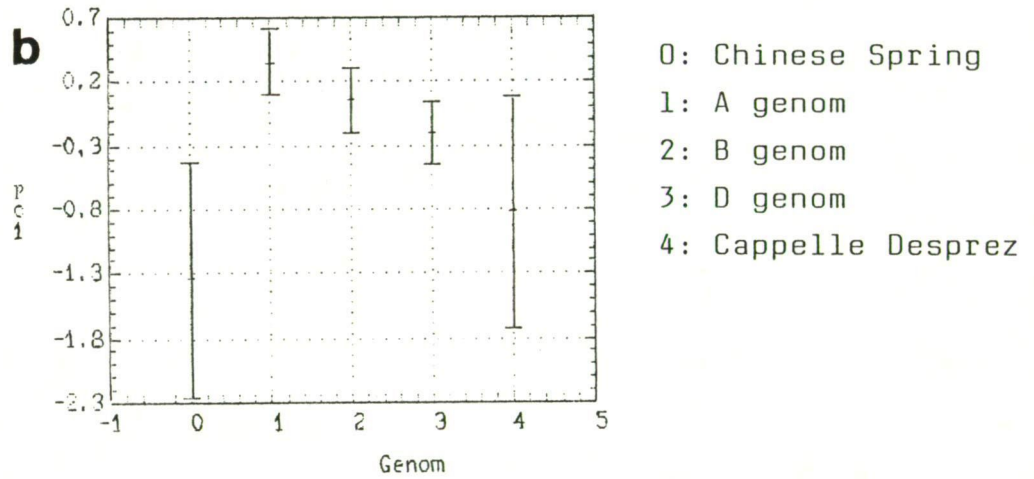
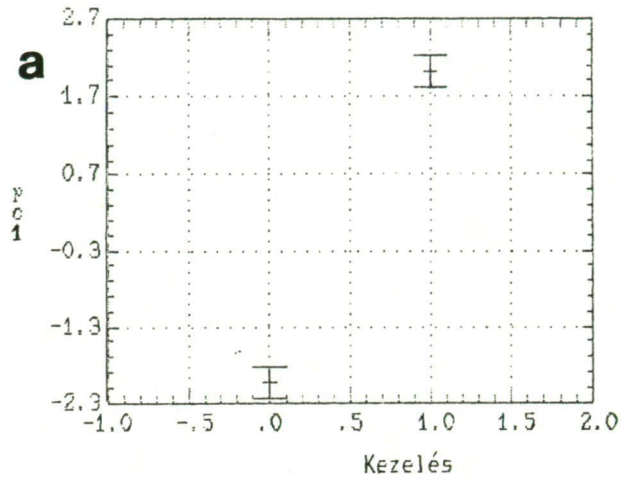
0 = kontroll 1 = 13% kezelt minta

△ : Cappelle Desprez, □ : Chinese Spring

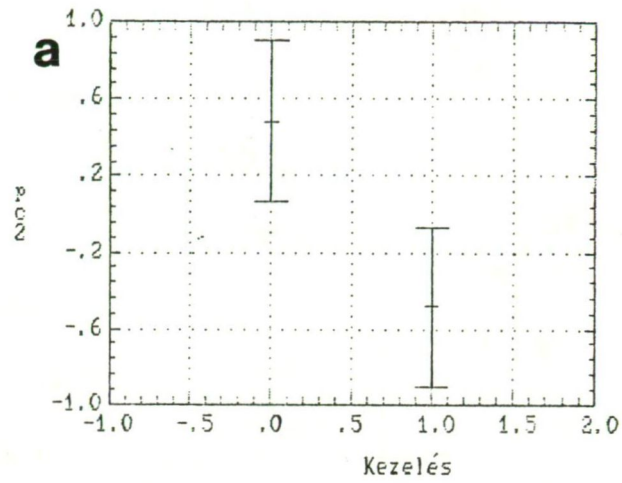
A kromoszóma hatás vizsgálat (15. ábra c) alapján látható, hogy az 5-ös kromoszóma kiugróan magas értéket ad. Az 1,2,3, és 4-es kromoszómák cseréjével is növekedés következik be.

A kezelés hatása a II. főkomponensben (16. ábra a) is jelentkezik, de ebben az esetben, az itt nagyobb súllyal szereplő aminosavak mennyiségében főként csökkenés következik be.

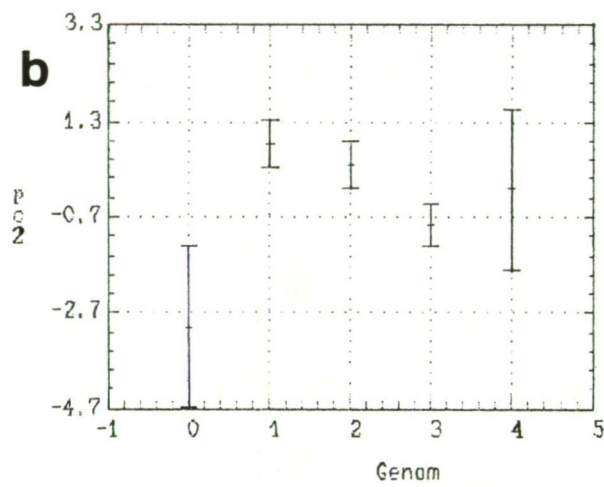
A genom hatása (16. ábra b) felemeli a II. főkomponenst a donor fajta szintjére, azaz az egyes vonalak a Cappelle Desprez szülő fajtához hasonlítanak (Asn, Glu). Az A és B genom hatása erősebb, mint a D genomé.



15. ábra (a,b,c): Variancia analízis az I. főkomponensben a kezelés, a genom és a kromoszóma hatás vizsgálatára (95% konfidencia intervallum)



0: Kontroll
1: 13% Mannit



0: Chinese Spring
1: A genom
2: B genom
3: D genom
4: Cappelle Desprez

16. ábra (a,b): Variancia analízis a II. főkomponensben a kezelés és a genom hatás vizsgálatára (95% konfidencia intervallum)

4.2.2.3. A szubsztitúciós sorozat poliamintartalma

A szubsztitúciós sorozat szabad putreszcintartalma növekedett a mannitos kezelés hatására, a kontroll mintákhoz képest (17. ábra). Az egyes vonalaknál mért értékek általában a Chinese Spring szülőhöz hasonlítanak. Kivétel a 3A és 5A vonal, ahol a növekedés mértéke a Cappelle Desprez szülő fajtánál mért értékhez közelít.

A kadaverintartalom kismértékű növekedésében nem volt jelentős eltérés az egyes vonalakban a kezelés hatására. Kivételként az 5A és 5D vonal emelhető ki, ahol a növekedés a Cappelle Desprez szülőhöz hasonlít.

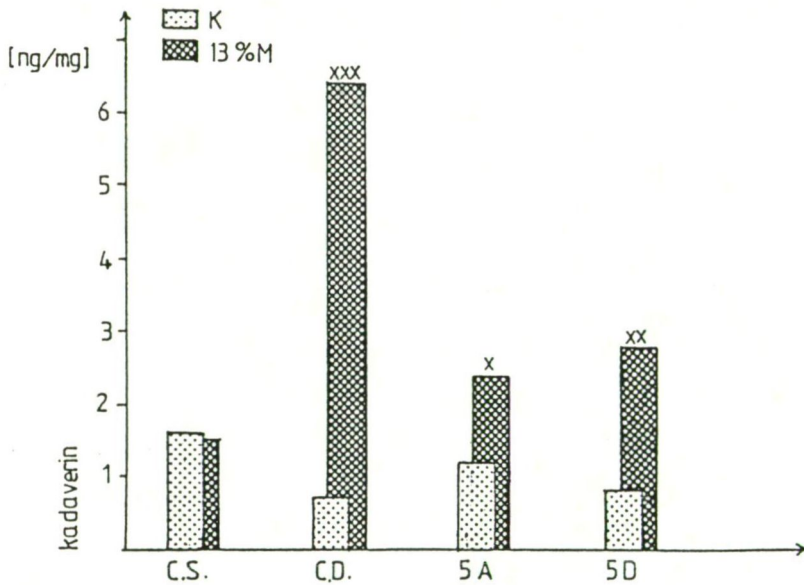
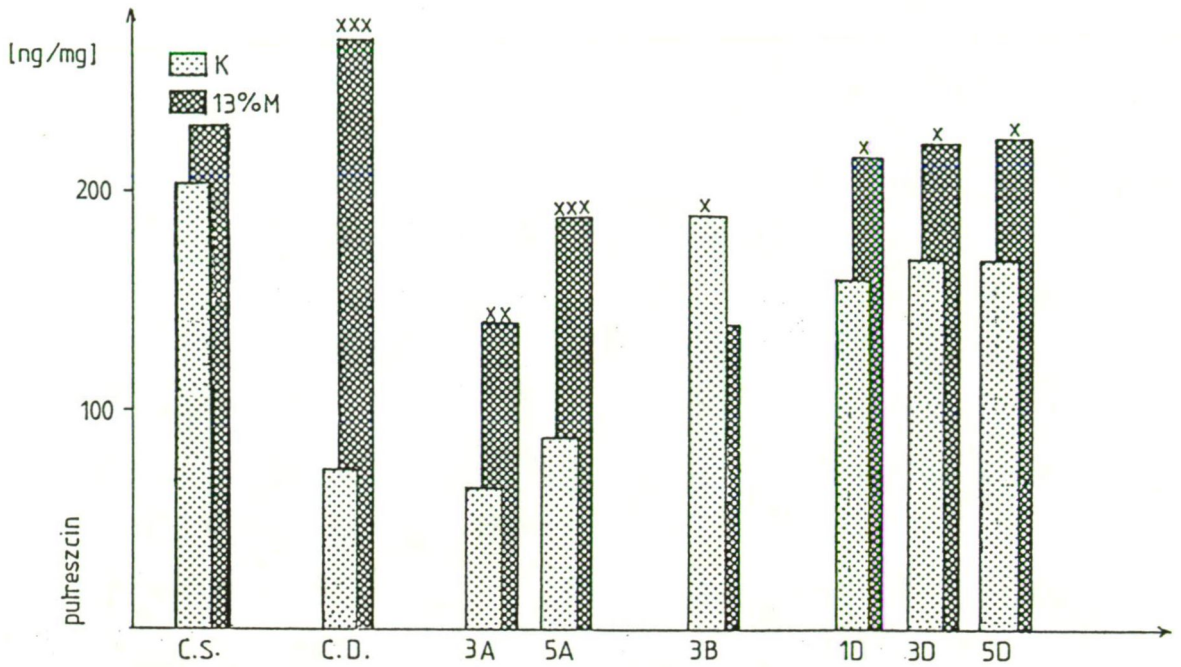
Variancia analizissel megvizsgáltam, hogy a kezelés, a genom és a kromoszóma hatása szignifikáns-e a poliaminok mennyiségére vonatkozóan.

A kezelés hatása mindkét poliamin esetén szignifikáns, (18. ábra a , 19. ábra a), mind a két esetben a mannitos kezelés növekedést okoz.

A genomok közül a D genom tagjai térnek el legkevésbé a Chinese Spring szülőtől a putreszcintartalmat illetően (18. ábra b), míg a kadaverin esetén az A genom tagjai a Cappelle Desprez fajta szintjéhez közelítenek (19. ábra b.).

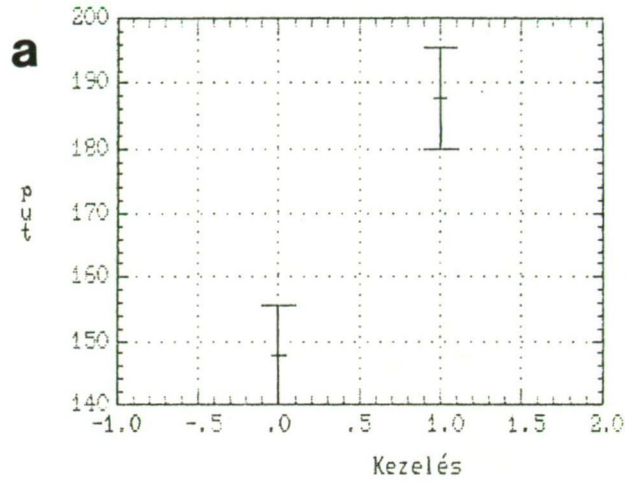
A kromoszóma hatást vizsgálva, csökkenés figyelhető meg a két szülőfajtahoz képest a putreszcintartalomban (18. ábra c).

A kadaverint illetően az egyes vonalak nem különböznek a Chinese Spring szülő fajtától (19. ábra c.). Kivéve az 5-ös kromoszómát, melynek a szintje eléri a Cappelle Desprez fajta szintjét.

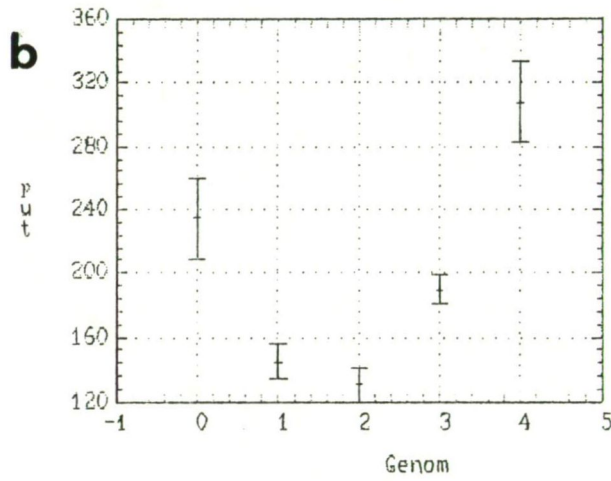


xxx: 0,1 %-os ,xx: 1 %-os , x: 5%-os szinten szignifikáns az eltérés, K: kontroll, M: mannit, C.S.: Chinese Spring, C.D.: Cappelle Desprez, 1-5: kromoszóma, A,B,D: genom

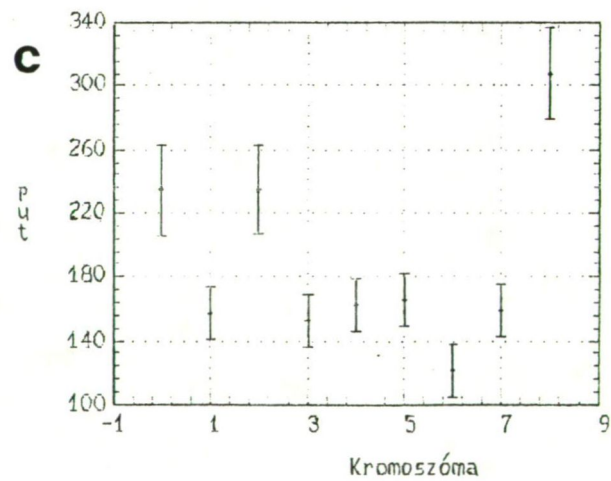
17. ábra: A szabad poliamintartalom változása 21 napos kezelés után



0: Kontroll
1: 13% Mannit

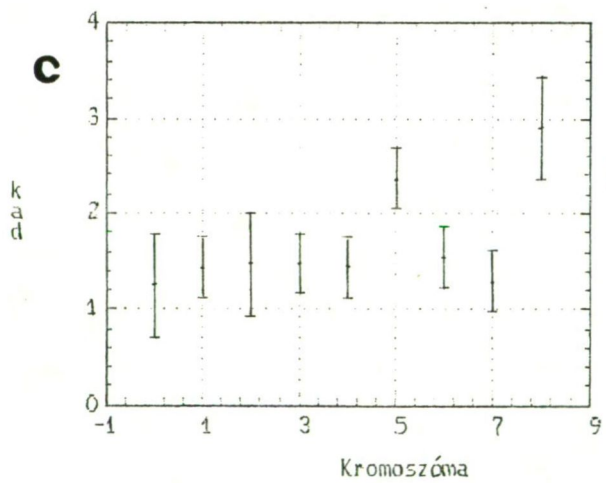
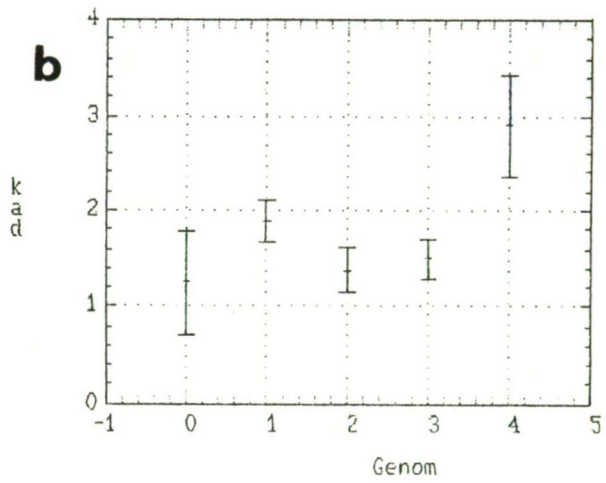
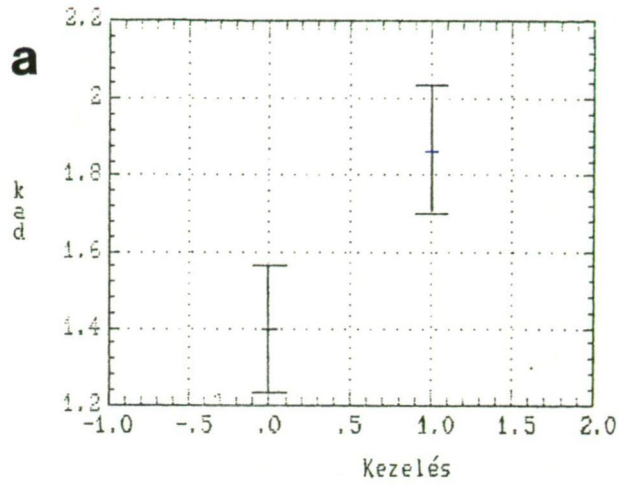


0: Chinese Spring
1: A genom
2: B genom
3: D genom
4: Cappelle Despre



0: Chinese Spring
1-7: kromoszóma
8: Cappelle Despre

18. ábra (a,b,c): Variancia analízis a kezelés, a genom és a kromoszóma hatás vizsgálatára, a putreszcintartalmat illetően (95% konfidencia intervallum)



19. ábra (a,b,c): Variancia analízis a kezelés, a genom és a kromoszóma hatás vizsgálatára, a k a d tartalommal illetően (95% konfidencia intervallum)

4.2.2.4. A szubsztitúciós sorozat extrahálható fehérjetartalma

A szubsztitúciós sorozat extrahálható fehérjetartalma (20. ábra) a vonalak többségénél növekedett. Csökkenés a 7A, 7B, 3D vonalak esetén tapasztalható. Ennek magyarázata a megnövekedett proteolitikus enzimaktivitásokban keresendő.

4.2.2.5. A proteolitikus enzimaktivitás mérések eredményei

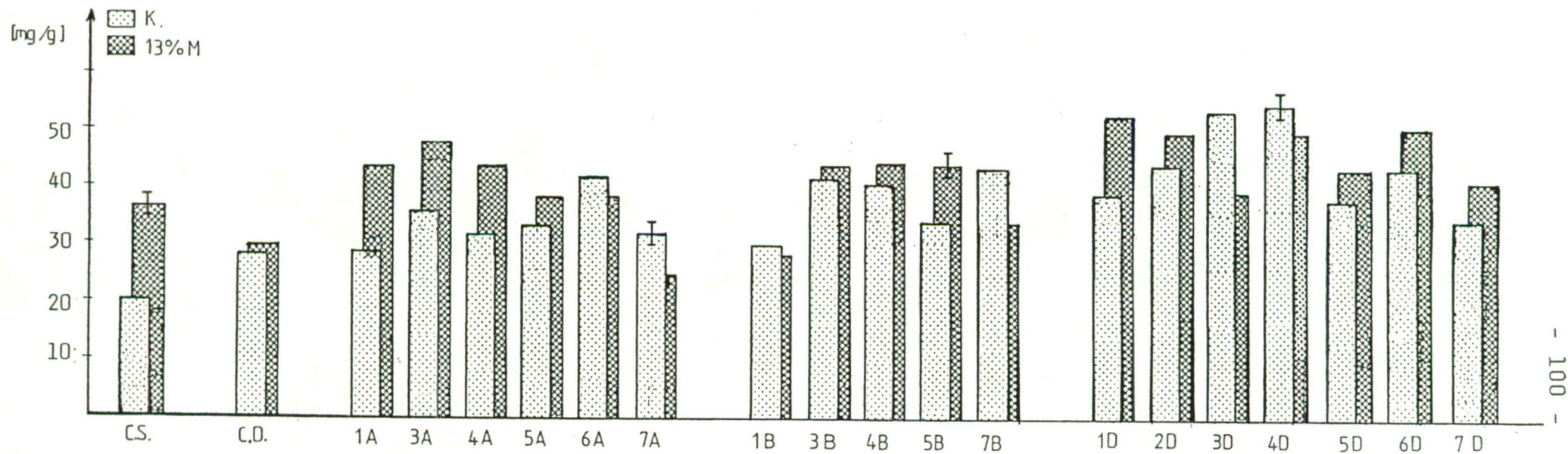
Az aminopeptidáz aktivitás (21. ábra) értékei a két szülő fajtánál mért értékek között változtak. Négy vonal emelhető ki a 7A, 5B, 7B, 3D, melyeknél az ozmotikus sokk hatására megnövekedett enzimaktivitások a Cappelle Desprez fajtánál mért értékhez hasonlóak.

A karboxipeptidáz aktivitás értékek az aminopeptidáz aktivitásokhoz hasonlóan változtak. Ebben az esetben a 13% mannittal kezelt 7A vonalnál mért aktivitás növekedés mértéke hasonlított a Cappelle Desprez szülőnél mért adathoz.

A szubsztitúciós sorozat vizsgálatával kapcsolatos eredményeket összefoglalva megállapítható, hogy a vizsgált paraméterekben bekövetkezett változások a szülő fajták esetén tapasztalt tendenciákat mutatták.

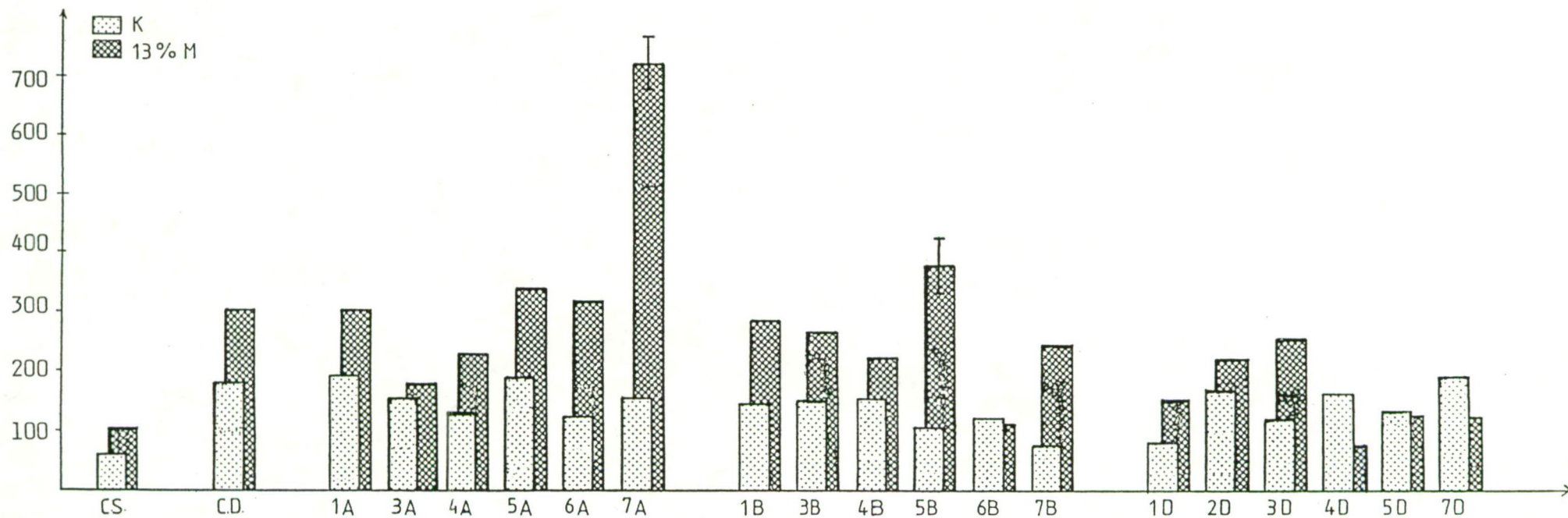
Néhány esetben kimutatható, hogy a kromoszóma csere hatására a donor Cappelle Desprez tulajdonságai jutottak érvényre.

A szabad aminosav-összetétel alapján az A és B genomok tagjai, az 1A, 5A, 3B, 4B, 5B vonalak, valamint a 2D és 5D emelhető ki.



20. ábra: A szubsztitúciós sorozat extrahálható fehérjetartalmának változása a 13% mannit hatására, 21 napos kezelés után
 C.S. = Chinese Spring, C.D. = Cappelle Desprez, K = Kontroll, M = Mannit,
 1-7 = kromoszóma, A,B,D = genom

$\mu\text{mol p-nitroanilin}$
 $\text{cm}^3 \cdot \text{óra} \cdot \text{g fehérje}$



21. ábra: Az aminopeptidáz aktivitás változása a 13% mannit hatására, 21 napos kezelés után a szubsztitúciós sorozat kalluszaiban
 C.S. = Chinese Spring, C.D. = Cappelle Desprez, K = Kontroll, 1-7 = kromoszóma, A,B,D = genom

A szabad poliamintartalom (putreszcin, kadaverin) alapján az 5A vonal, az extrahálható fehérjetartalom, valamint a proteolitikus enzimaktivitás mérések eredményei szerint a 7A vonal adatai hasonlítanak leginkább a Cappelle Desprez szülőhöz.

A vizsgálatok összességét tekintve a szárazságérzékenység kialakulásában három kromoszóma (5A, 7A, 5D) szerepe valószínűsíthető. E kromoszómák szárazságtűrésben betöltött szerepének pontos tisztázásához a szubsztitúciós sorozat további elemzése szükséges.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A gabonafélék nagy jelentősége a táplálkozásban és takarmányozásban, továbbra is napirenden tartja biokémiájukkal kapcsolatos kutatásokat, melyek célja a táplálkozástani szempontból egyre értékesebb, jó terméshozamú és ellenállóképességű fajták létrehozásának elősegítése. A táplálkozástani minőség elsősorban a fehérjetartalom alapján jellemezhető. A fehérjék tulajdonságait, biológiai értékét az alkotó aminosavak minősége, mennyisége és hozzáférhetősége határozza meg.

A gabonafélék közül a búza széleskörű biokémiai vizsgálatának eredményeképpen alapos ismeretekkel rendelkezünk a búzafehérjékre vonatkozóan.

A kukoricafehérjék vizsgálatára azonban kevesebb figyelmet fordítottak. Szükséges e területen a kutatások meggyorsítása, hogy a búzáéhoz hasonló kukorica minősítő rendszer mielőbb kidolgozásra kerülhessen, a technológiai feldolgozás, illetve a nemesítés segítésére.

A jó beltartalmi minőségű gabonafajták előállítására mellett fontos gyakorlati szempont a megfelelő termő- és ellenállóképesség biztosítása is. A fajták termésbiztonságát kialakító tulajdonságok egyik meghatározója a stresszrezisztencia. Magyarország éghajlatát, évi átlagos csapadék mennyiségét figyelembe véve, nagy szerep jut a szárazságtűrő gabonafajták nemesítésének és termesztésének. E munkának fontos előfeltétele a szárazságstressz hatására létrejövő biokémiai folyamatok tisztázása, melyhez jól felhasználható az aminosavak és származékaik vizsgálatával kapott eredmények.

Értekezésemben összefoglalt kutatások céljait az említett két témakörhöz kapcsolódó, megoldásra váró feladatok határozták meg.

A kísérleti munka elvégzéséhez több esetben szükség volt az analitikai módszerek továbbfejlesztésére, illetve új eljárások kidolgozására.

Legfontosabb metodikai eredményeim a következők:

- A cisztein meghatározására szolgáló oxidációs hidrolizisek összehasonlításának eredményeképpen megállapítottam, hogy a klasszikus perhangyasavas oxidáció helyettesíthető a dimetil-szulfoxidos eljárással. A dimetil-szulfoxidot 2,5%-ban a hidrolizáló 6 mol/dm^3 sósavhoz adva, egy lépésben elvégezhető a mintaelőkészítés (az oxidáció és a hidrolizis). A hidrolizist 110°C -on elegendő 22 órán át végezni.

- Új túlnyomásos-rétegkromatográfiás (OPLC) módszert dolgoztam ki az aminosavak ioncserés réteglapon történő meghatározására. Az IONPRES-6 finomszemcsés ioncserés réteglapon a legjobb elválasztás 40°C -on, 35 cm-es kifejlesztés esetén, Na-citrát pufferrel (pH = 3,15) kapható. Az analízis idő 59 min.

- A poliaminok meghatározására OPLC-s módszert dolgoztam ki finomszemcsés (HPTLC) szilikagél réteglapon, kloroform-triethylamin (10:1,5) futtató elegy segítségével. A poliaminok danzilszármazékainak meghatározása 15 min alatt elvégezhető.

A kukoricafehérjékre vonatkozó ismeretek bővítéséhez négy országban termesztett, 25 kukoricafajtát vizsgáltam. Az aminosav-összetétel alapján megállapítható jellegzetességeket kerestem, a fehérjetartalom és a táplálkozástani minőség vonatkozásában.

A kukoricafajták vizsgálatával kapott legfontosabb eredmények a következők:

- Megállapítottam, hogy a vizsgált kukoricafajták fehérjetartalom alapján három - átlagos (9-10%), nagy (10-12%), igen nagy (12-14%) - csoportra oszthatók.

- A kukoricafehérjék aminosav-összetételében limitáló szerepe van a kis lizin- és triptofántartalomnak. Kivételt képeznek az opaque-2 mutánsok, ahol a Lys helyett az Ile mennyisége a limitáló.

- Az aminosav-összetétel alapján két jellegzetesnek mondható összefüggés mutatható ki, az egyik a lizintartalom és a leucin/izoleucin arány közötti negatív korreláció. A másik a glutaminsav/prolin arány nagysága és a kukoricaszem alaki (sima, lófogú) megjelenése közötti összefüggés. Ennek alapján a sima szemű kukoricáknál ez az arány nagy (4-7), a lófogúak esetén pedig kicsi (1-3).

- Megállapítottam, hogy az esszenciális és nem esszenciális aminosavak aránya a legtöbb esetben nem változott kedvezően a fehérjetartalom növekedésével. A fehérjetöbblet ugyanis a táplálkozástani szempontból kedvezőtlenebb aminosav-összetételű fehérjék formájában jelent meg.

- Az opaque-2 mutánsok példája alapján az a következtetés vonható le, hogy nem elegendő egyetlen fontos aminosav (Lys) mennyiségének a növelése, mert a biológiai érték javulás csak valamennyi esszenciális aminosav kedvező arányváltozása útján érhető el.

A szárazságtűrés biokémiai folyamatainak tisztázására in vitro szövettenyészetekben vizsgáltam a búza adaptálódó képességét mannit által indukált ozmotikus stresszhez. Arra kerestem a választ, hogy a szárazságtűrés tekintetében eltérő búzafajták szövettenyészetei között van-e különbség az ozmotikus stresszt illetően? Alkalmass-e a lejátszódó folyamatok nyomonkövetésére a fehérje-, aminosav-, poliamintartalom, illetve a proteolitikus enzimaktivitások meghatározása? Valamint azt vizsgáltam, hogy a szubsztituciós sorozat elemzése révén kiválaszthatók-e a szárazságtűrésért felelős kromoszómák?

A legfontosabb eredmények a következőkben foglalhatók össze:

- Megállapítottam, hogy a szárazságtűrés vizsgálatára alkalmasnak bizonyult az in vitro rendszer. Az eredmények alapján a búzafajták a szárazságtűrés szempontjából három kategóriába sorolhatók: érzékeny (Cappelle Desprez), közepesen rezisztens (Chinese Spring) és rezisztens (Saberbeg, Plainsman).

- A táptalaj növekvő mannit koncentrációjának hatására csökkent a kalluszk növekedése, nőtt a szárazanyagtartalom és néhány szabad aminosav (Pro, Arg, Lys, Asn, Gln) mennyisége, valamint a poliamintartalom (putreszcin, kadaverin). A legnagyobb változásokat a szárazságra érzékeny Cappelle Desprez és a közepesen rezisztens Chinese Spring kalluszainál tapasztaltam.

A szárazságtűrő fajták extrahálható fehérjetartalma kis mértékben növekedett. A Cappelle Desprez fajtánál a változatlan fehérjetartalommal párhuzamosan növekedett az exopeptidázok aktivitása.

- A szárazságtűrés genetikai eredetének tisztázásához a Chinese Spring - Cappelle Desprez szubsztitúciós sorozat kalluszait vizsgálva általánosan megállapítható, hogy a vizsgált paraméterekben bekövetkezett változások a szülő fajtáknál tapasztalt tendenciákat mutatták. Néhány esetben kimutatható, hogy a kromoszóma csere hatására a donor Cappelle Desprez tulajdonságai jutottak érvényre. Ezek alapján a szárazságérzékenység kialakulásában az 5A, 7A és 5D kromoszómák szerepe valószínűsíthető. A fenti kromoszómák szárazságtűrésben betöltött szerepének pontos tisztázásához a szubsztitúciós sorozat további elemzése szükséges.

6. IRODALOM

- Akeson, W.R., Stahmann, M.A. /1964/: A pepsin pancreatin index protein quality evaluation
J. Nutr., 83, 257-261.
- Altman, A., Arzee, T., Cohen, Y., Friedman, R., Levin, N., Or, N., Schwartz, M. /1986/: Polyamines in plants: "hormonal" role in differentiation and stress,
In: Proc. of Int. Conf. on Polyamines in Life Stress, Japan, 115-116.
- Bagni, N. /1966/: Aliphatic amines and a growth factor of coconut milk stimulate cellular proliferation of *Helianthus tuberosus* (Jerusalem Artichoke) in vitro
Experientia (Basel), 22, 732-736.
- Barber, S., Benedito de Barber, C. /1985/: Chemical and biological data of rice proteins for nutrition and feeding,
In: Amino acid composition and biological value of cereal proteins, Lásztity, R. and Hidvégi, M. (eds.)
D.Reidel Publ. Co., Dordrecht, Boston, Lancaster, Akadémiai Kiadó, Budapest, 481-494.
- Bardócz, S., Karsai, T. /1981/: Determination of polyamines by ion-exchange thin-layer chromatography and video-densitometry
J. Chromatogr., 223, 198-201.
- Bardócz, S., Karsai, T., Elődi, P. /1985/: A new technique for the determination of polyamines: Overpressured Ion-exchange thin-layer chromatography.
Chromatographia, 20 (1), 23-24.
- Baudet, J., Mossé, J., Landry, J., Moureaux, T. /1966/: Etude sur les proteines du maïs I.: composition en acides aminés des fractions azotées du grain
Ann. Physive. Veg., 8, 321-329.

- Bender, A.E. /1973/: Chemical scores and availability of amino acids, In: Proteins in human nutrition, Porter, J.W.G. and Rolls, B.A. (eds.) Academic Press, New York, 167-178.
- Benson, J.R., Hare, P.E. /1975/: o-Phthalaldehyde Fluorogenic Detection of primary Amines in the picomole Range. Comparison with Fluorescamine and Ninhydrin Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 72, 619-622.
- Békés, F., Hidvégi, M., Zsigmond, A., Lásztity, R. /1984/: Studies on the evaluation of the in vitro biological value of food proteins Acta Alimentaria, 13(2), 135-158.
- Block, R.J., Mitchell, H.H. /1946/: The correlation of the amino acid composition of proteins with their nutritive value Nutr. Abs. and Rev., 16(2), 249-278.
- Bodwell, C.E., Satterlee, C.D., Hackler, L.R. /1980/: Protein digestibility of the same protein preparations by human and rat assays and by in vitro enzymic digestion methods Amer. J. Clin. Nutr., 33, 677-686.
- Boggess, S.F., Stewart, C.R., Aspinall, D., Paleg, L.G. /1976/: Effect of water stress on proline synthesis from radioactive precursors J. Plant Physiol., 58, 398-401.
- Bontemps, J., Laschert, J., Dandrifosse, G. /1984/: Analysis of dansyl derivatives of di- and polyamines in mouse brain, human serum and duodenal biopsy specimens by high-performance liquid chromatography on a standard reserved-phase column J. Chromatogr., 311, 59-67.

- Bressani, R., Mertz, E.T. /1958/: Studies on corn proteins.
IV.: Protein and Amino Acid Content of Different
corn Varieties
Cereal Chem., 35, 227-235.
- Chen, S.T., Chion, S.H., Chu, Y.H., Wang, K.T. /1987/:
Rapid hydrolysis of proteins and peptides by
means of microwave technology and its application
to amino acid analysis
Int. J. Peptide Protein Res., 30, 572-576.
- Chowdhury, S.R., Choudhuri, M.A. /1985/: Hydrogen Peroxide
metabolism as an index of water stress tolerance in
jute
Physiol. Plant., 65, 476-480.
- Cong, N.T., Tyihák, E., Vajda, M., Mincsovcics, E. /1982/:
Separation of 2,4-Dinitrophenyl-amino acids by
Overpressured Thin-Layer Chromatography
J. High Resol. Chromatogr., 5, 511-512.
- Dai, Y.R., Kaur-Sawhney, R., Galston, A.W. /1982/:
Promotion by gibberellic acid of polyamine bio-
synthesis in internodes of light-grown dwarf peas
J. Plant Physiol., 69, 103-105.
- Dako, D.Y. /1985/: Cereal utilization in West Africa, In:
Amino acid composition and biological value of
cereal proteins, Lásztity, R. and Hidvégi, M. (eds.)
D. Reidel Publ. Co., Dordrecht, Boston, Lancaster,
Akadémiai Kiadó, Budapest, 27-43.
- Dévényi, T., Báti, J., Fábrián, F. /1971a/: Detection and
Determination of Tryptophan by Ion exchange
Chromatography
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., 6, 133-138.

- Dévényi, T., Hazai, I., Ferenczi, S., Báti, J. /1971b/:
Thin-Layer ion exchange chromatography on
resincoated chromatoplates V.: One-dimensional
separation of amino acids
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., 6,
385-388.
- Drawert, F., Reuther, K.H. /1963/: Phenol als Inhibitor
der Huminbildung bei der Proteinhydrolyse
Angew. Chemie., 75, 169.
- Eggum, B.O. /1968/: Aminosyrekoncentration og proteinkvali-
tet, Stougaards Forlag, København.
- Eggum, B.O., Villegas, E.M., Vasal, S.K. /1979/: Progress
in protein quality of maize
J. Sci. Food Agric., 30, 1148-1153.
- Einarsson, S., Josefsson, B., Lagerkvist, S. /1983/:
Determination of amino acids with 9-fluorenyl-
methyl chloroformate and reserved phase high-perfor-
mance liquid chromatography
J. Chromatogr., 282, 609-618.
- El-Kady, A., Lásztity, R. /1981/: Kukoricafehérjék vizsgálá-
lata II.: A kukoricafehérjék makrofrakciói
Gabonaipar, 28, 134-136.
- El-Kady, A., Hidvégi, M., Lásztity, R., Simonné Sarkadi L.
/1983/: Kukoricafehérjék vizsgálata V.: A kukoricafehérjék
emészthetősége és biológiai értéke
Gabonaipar, 30(3), 107-113.
- Elkin, R.G., Wasynczuk, A.M. /1987/: Amino acid analysis of
feedstuff hydrolysates by precolumn derivatization
with phenylisothiocyanate and reversed-phase high-
performance liquid chromatography
Cereal Chem., 64, 226-229.

- FAO /1970/: Amino Acid content of foods and biological data
on proteins.
FAO, Rome
- FAO/WHO/UNU /1984/: Protein and energy requirements
FAO, Rome
- Fatér,Zs., Mincsovcics,E. /1984/: Separation of Phenyl-
thio-hydantóin amino acids by OPLC
J. Chromatogr., 298, 534-538.
- Fienberg,A.A., Choi,J.H., Lubich,W.P., Sung,Z.R. /1984/:
Developmental regulation of polyamine metabolism
in growth and differentiation of carrot culture
Planta, 162, 532-539.
- Fisher,R.A. /1921/: Some remarks on the methods formulated
in a recent article on the quantitative analysis
of plant growth
Ann. Appl. Biol., 7, 367-372.
- Flores,H.E., Galston,A.W. /1982/: Polyamines and Plant
stress: Activation of putrescine biosynthesis by
osmotic shock
Science, 217, 1259-1261.
- Flores,H.E., Galston,A.W. /1984a/: Osmotic stress induced
polyamine accumulation in cereal leaves I.:
Physiological parameters of the response
J. Plant Physiol., 75, 102-109.
- Flores,H.E., Galston,A.W. /1984b/: Osmotic stress induced
polyamine accumulation in cereal leaves II.:
Relation to amino acid pools
J. Plant Physiol., 75, 110-113.

- Friedman, M., Finley, J.W. /1971/: Methods of tryptophan and analysis
J. Agr. Food Chem., 19, 626-631.
- Fujihara, S., Nakashima, T., Kurogochi, Y. /1983/:
Determination of polyamines in human blood by electron-capture gas-liquid chromatography
J. Chromatogr., 227, 53-60.
- Galiba, G., Simon-Sarkadi, L., Békés, F., Erdei, L. /1986/:
Genotype specific changes in amino acid and polyamine of wheat tissue culture induced by osmotic stress, In: Somaclonal variations and crop improvement, Semal, J. (ed.), M. Nijhoff Publ. Co., Dordrecht, Boston, Lancaster, Gembloux, 170-176.
- Galiba, G., Simon-Sarkadi, L., Salgó, A., Kocsy, G. /1989/:
Genotype dependent adaptation of wheat varieties to water stress in vitro
J. Plant Physiol., 134, 730-735.
- Galston, A.W. /1983/: Polyamines as modulators of plant developments, BioScience, 33(6), 382-388.
- Geervani, P. /1985/: The influence of home processing on the quality of cereal and millet proteins,
In: Amino acid composition and biological value of cereal proteins, Lásztity, R. and Hidvégi, M. (eds.), D.Reidel Publ. Co., Dordrecht, Boston, Lancaster, Akadémiai Kiadó, Budapest, 495-519.
- Gehrke, C.W., Zumwalt, K.W., Kuo, K. /1971/: Quantitative Amino Acid Analysis by Gas-Liquid Chromatography
J. Agr. Food Chem., 19, 605-618.
- Gehrke, C.W., Kuo, K.C., Kaiser, F.E., Zumwalt, R.W. /1987/:
Analysis of Amino Acids by Gas Chromatography as the N-Trifluoroacetyl n-Butyl Esters
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70(1), 160-170.

- Gerstenkorn,P., Zwingelberg,H. /1976/: Industrielle
Verarbeitungs-eigenschaften deutscher Maisauf-
wüchse.
Mühle und Mischfuttertechn., 113, 574-577.
- Guiochon,G., Siouffi,A., Engelhard,H., Halász,I. /1978/:
Study of the Performances of Thin-Layer Chroma-
tography I.: A Phenomenological Approach
J. Chromatogr. Sci., 16, 152-157.
- Hackler,L.R. /1977/: In vitro indices: Relationships
to estimating protein value for the human, In:
Evaluation of proteins for humans, Bodwell,C.E.
(ed.) AVI. Publ. Co. Inc. Westport, Conn., 55-67.
- Hackler,L.R. /1985/: Cereal proteins in human nutrition,
In: Amino acid composition and biological value of
cereal proteins, Lásztity,R. and Hidvégi,M. (eds.)
D.Reidel Publ. Co., Dordrecht, Boston, Lancaster,
Akadémiai Kiadó, Budapest, 81-104.
- Hamilton,P.B. /1963/: Ion Exchange Chromatography of Amino
Acids. A single Column, high Resolving, Fully
automatic Procedure
Anal. Chem., 35, 2055-2060.
- Hanson,A.D., Nelsen,C.E., Everson,E.A. /1977/: Evaluation
of free proline accumulation as an index of drought
resistance using two contrasting barley cultivars
Crop Science, 17, 720-726.
- Heby,O. /1981/: Role of polyamines in the control of cell
proliferation and differentiation.
Differentiation, 19, 1-20.

- Hegedűs, M., Kralovánszky, U.P., Mátrai, T. /1981/:
A takarmányfehérjék minősítése
Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
- Hekschné Hajdú, É. /1978/: Kukoricafehérjék vizsgálata
Diplomamunka, Budapesti Műszaki Egyetem, Biokémiai
és Élelmiszertechnológiai Tanszék, Budapest.
- Henion, J.D., Nosanchuk, J.S., Bilder, B.M. /1981/:
Capillary gas chromatographic-mass spectrometric
determination of histamine in tuna fish causing
scombroid poisoning
J. Chromatogr., 213, 475-480.
- Hidvégi, M., Békés, F. /1985/: Mathematical modeling of
protein nutritional quality from amino acid
composition, In: Amino acid composition and biological
value of cereal proteins, Lásztity, R. and
Hidvégi, M. (eds.), D. Reidel, Publ. Co., Dordrecht,
Boston, Lancaster, Akadémiai Kiadó, Budapest,
205-286.
- Hirs, C.H.W. /1967/: Determination of Cystine as Cysteic
Acid, In: Methods in Enzymology XI, Hirs, C.H.W.
(ed.), 59-62.
- Holz, F. /1972/: Automatische Bestimmung von Tryptophan
in Proteinen und proteinhaltigen Pflanzenprodukten
mit Dimethylaminozimtaldehyd
Landw. Forsch., 27, 96-109.
- Hsu, H.W., Vavak, D.L., Satterlee, L.D., Miller, G.A. /1977/:
A multienzyme technique for estimating protein
digestibility
J. Food Sci., 42(5), 1269-1273.

- Hsu, H.W., Sutton, N.E., Banjo, M.O., Satterlee, L.D., Kendrick, J.G. /1978/: The C-PER and T-PER assays for protein quality
Food Technol., 32(12), 69-73.
- Hubbard, J.D., Finney, K.F. /1976/: Quick evaporation of protein hydrolysates for amino acid assay
J. Food Sci., 41, 1229-1230.
- Hugli, T.E., Moore, S. /1972/: Determination of the tryptophan content of proteins by ion-exchange chromatography of alkaline hydrolysates
J. Biol. Chem., 247 (9), 2828-2834.
- Ihekoronye, A.I. /1985/: Quantitative Gas-liquid Chromatography of Amino Acids in Enzymic Hydrolysates of Food proteins
J. Sci. Food Agric., 36, 1004-1012.
- Jones, B.N., Gilligan, J.P. /1983/: o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reserved - phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids
J. Chromatogr., 266, 471-482.
- Jong, C.de, Hughes, G.J., Wieringen, E.van, Wilson, K.J. /1982/: Amino acid analyses by high-performance liquid chromatography. An evaluation of the usefulness of pre-column DNS derivatization
J. Chromatogr., 241, 345-359.
- Juhász, B., Szelényi-Galántai, M., Jécsai, J., Somssich, I. /1985/: Comparative study of yield and biological value of different corn varieties, In: Amino acid composition and biological value of cereal proteins, Lásztity, R., and Hidvégi, M.(eds.), D. Reidel Publ. Co.; Dordrecht, Boston, Lancaster, Akadémiai Kiadó, Budapest, 521-527.

- Kaldy, M.S., Kerelink, G.R. /1984/: A dual column System using lithium buffers for the analysis of free amino acids commonly found in plant extracts
Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 17 (3), 168-171.
- Kaldy, M.S., Freyman, S. /1984/: Free amino acids in unhardened and cold-hardened winter wheat crowns
J. Plant Nutrition, 7(7), 1103-1111.
- Kannangara, R., Seetharama, N., Durley, R.C., Simpson, G.M. /1983/: Drought resistance of Sorghum bicolor 6.: Changes in endogenous growth regulators of plants grown on an irrigation gradient.
Can. J. Plant Sci., 63, 147-155.
- Kaur-Sawhney, R., Flores, H.E., Galston, A.W. /1980/: Polyamine induced DNA Synthesis and mitosis in oat leaf protoplasts
J. Plant Physiol., 65, 368-371.
- Karamanos, A.J., Drossopoulos, J.B., Niavis, C.A. /1983/: Free proline accumulation during development of two wheat cultivars with water stress
J. Agric. sci., Camb., 100, 429-439.
- Kaur-Sawhney, R., Shih, L., Cegielska, T., Galston, A.W. /1982/: Inhibition of protease activity by polyamines. Relevance for control of leaf senescence
FEBS Lett., 145(2), 345-349.
- Kárpáti, G., Saeed, B.M. /1985/: The role of cereal and plant proteins in the world food supply, In: Amino acid composition and biological value of cereal proteins, Lásztity, R. and Hidvégi, M. (eds.), D. Reidel Publ. Co., Dordrecht, Boston, Lancaster, Akadémiai Kiadó, Budapest, 45-55.

- Kerese, I. /1975/: Fehérjevizsgálati módszerek
Műszaki Könyvkiadó, Budapest.
- Klebe, J.F., Finkbeiner, H., White, D.M. /1966/:
Silylations with bis-trimethylsilyl-acetamide, a
highly reactive silyl donor
J. Am. Chem. Soc., 88, 3390-3395.
- Knox, R., Kohler, G.O., Palter, R., Walker, H.G. /1970/:
Determination of tryptophan in feeds
Anal. Biochem., 36(1), 136-143.
- Koromilas, A.E., Panagiotidis, C.A., Kyriakidis, D.A. /1985/:
Regulation and function of ornithine and arginine
decarboxylase in germinating barley seeds, In:
Recent progress in polyamine research, Selmeçi, L.
and Brosman, M.E., and Seiler, N. (eds.), Akadémiai
Kiadó, Budapest, 501-508.
- Küsters, E., Allgaier, H., Jung, G., Bayer, E. /1984/:
Resolution of Sulphur-Containing Amino Acids by
Chiral Phase Gas Chromatography
Chromatographia, 18(6), 287-290.
- Landry, J., Moureaux, T. /1970/: Hétérogenéité des glutelines
du grain de maïs: Extraction sélective et composition
en acides aminés des trois fractions isolées
Bull. Soc. Chim. Biol., 52, 1021-1037.
- Lásztity, B. /1975/: A kukoricaszem NPK-tartalmának válto-
zása és a műtrágyák érvényesülése meszes homokban
Agrokémia és Talajtan, 24, 279-290.
- Lásztity, R. /1981/: Gabonafehérjék
Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
- Lásztity, R. /1984/: The Chemistry of Cereal Proteins
CRC Press, Boca Raton, Florida, 131-155.

- Lásztity, R., Törley, D. (szerk.) /1987/: Alkalmazott élelmiszeralitika II.
Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
- Lee, K.S., Drescher, D.G. /1979/: Derivatization of cysteine and cystine for fluorescence amino acid analysis with the o-phthaldialdehyde, 2-mercaptoethanol reagent
J. Biol. Chem., 254(14), 6248-6251.
- Lepri, L., Desideri, P.G., Heimler, D. /1979/: Reserved-phase and soap thin-layer chromatography of aliphatic mono- and polyamines
J. Chromatogr., 173, 119-126.
- Lin, J.K., Lai, C.C. /1982/: Chromophoric determination of putrescine, spermidine and spermine with dabsyl chloride by high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography
J. Chromatogr., 227, 369-377.
- Lipton, S.H., Bodwell, C.E. /1973/: Oxidation of Amino Acids by Dimethyl Sulfoxide
J. Agric. Food Chem., 21, 235-237.
- Lipton, S.H., Bodwell, C.E. /1976/: Specific Oxidation of Methionine to Methionine Sulfoxide by Dimethyl Sulfoxide
J. Agric. Food Chem., 24(1), 26-31.
- Liu, T.Y., Chang, Y.H. /1971/: Hydrolysis of Proteins with p-Toluenesulfonic Acid Determination of Tryptophan
J. Biol. Chem., 246, 2842-2848.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. /1951/: Protein measurement with Folin phenol reagent
J. Biol. Chem., 193, 265-275.

- McKenzie, S.L., Tenaschuk, D. /1974/: Gas-liquid chromatography of N-heptafluorobutyryl isobutyl esters of amino acids
J. Chromatogr., 97, 19-24.
- Mager, J. /1959/: The stabilizing effect of spermine and related polyamines on bacterial protoplasts
Biochem. Biophys. Acta, 36, 529-531.
- Maravalhas, N. /1970/: A new technique of protein hydrolysis and analysis of the amino acids on an autoanalyzer
J. Chromatogr., 50, 413-418.
- Marshall, H.F., Jr. Wallace, G.W., Satterlee, L.D. /1979/: Prediction of protein digestibility by an in vitro procedure using human, porcine and rat pancreatin preparations
Nutr. Rep. Int., 19, 901-913.
- Matsubara, H., Sasaki, R.M. /1969/: High recovery of tryptophan from acid hydrolysates of proteins
Biochem. Biophys. Res. Commun., 35, 175-181.
- Mauron, J. /1970/: Nutritional evaluation of proteins by enzymatic methods, In: Improving plant protein by nuclear techniques
IAEA, Vienna, 303-318.
- Mertz, E.T., Bates, L.S., Nelson, O.E. /1964/: Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm
Science, 145, 279-280.
- Miller, E.L. /1967/: Determination of the tryptophan content of feedingstuffs with particular reference to cereals
J. Sci. Food. Agric., 18, 381-386.

- Moore, S., Spackman, D.H., Stein, W.H. /1958/:
Chromatography of Amino Acids on Sulfonated
Polystyrene Resins
Anal. Chem., 30, 1185-1189.
- Moore, S., Stein, W.H. /1963/: Chromatographic determination
of amino acids by the use of automatic recording
equipment, In: Methods in Enzymology, VI,
Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (eds.),
Academic Press, New York, 819-831.
- Morilla, C.A., Boyer, J.S., Hageman, R.H. /1973/: Nitrate
reductase activity and polyribosomal content of
corn (Zea mays L.) having low leaf water potentials
J. Plant Physiol., 51, 817-824.
- Munns, R., Weir, R. /1981/: Contribution of sugars to
osmotic adjustment in elongating and expanded zones
of wheat leaves during moderate water deficits at
two light levels
Aust. J. Plant Physiol., 8, 93-105.
- Murashige, T., Skoog, F. /1962/: A revised medium for rapid
growth and bioassays with tobacco tissue cultures
J. Plant Physiol., 15, 473-497.
- Nagy, D., Weidlein, W., Hixon, R.M. /1941/: Factors
effecting the solubility of corn proteins
Cereal Chem., 18, 514-523.
- Nakamura, H. /1977/: Thin-layer chromatography of histidine,
histamine and histidyl peptides at picomole level
using a unique fluorogenic reaction with fluoresc-
amine
J. Chromatogr., 131, 215-222.

- Nierle, W. /1985/: Views on the amino acid composition of grain and the influence of processing, In: Amino acid composition and biological value of cereal proteins, Lásztity, R. and Hidvégi, M. (eds.), D. Reidel Publ. Co., Dordrecht, Boston, Lancaster, Akadémiai Kiadó, Budapest, 371-382.
- Örsi, F., Hollósy, J. /1985/: Tápszerek triptofántartalmának változása hőkezelés hatására.
Élelmiszervizsgálati Közlemények, 31(4), 193-202.
- Pandey, D.K. /1982/: Free proline accumulation in response to water stress in wheat seedlings
Current Science, 51(3), 141-143.
- Pataki, G. /1966/: Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure und Peptid-Chemie
Walter de Gruyter und Co. Berlin.
- Paulis, J.W. /1982/: Recent developments in Corn Protein Research
J. Agric. Food Chem., 30, 14-20.
- Pedersen, B., Eggum, B.O. /1981/: Prediction of protein digestibility by in vitro procedures based on two multienzyme systems
J. Anim. Physiol. and Anim. Nutr., 45, 190-200.
- Pedersen, B., Eggum, B.O. /1983/: Prediction of protein digestibility by an in vitro enzymatic pH-stat procedure
J. Anim. Physiol. and Anim. Nutr., 49, 265-277.

- Pegg, A.E., Sertich, G.J., Kameii, T., Erwin, B.G.,
Shirahata, A. /1986/: Regulation of polyamine metabolism
by polyamines, In: Proc. of Int.
Conf. on Polyamines in Life Stress, Japan, 73-74.
- Penke, B., Ferenczi, R., Kovács, K. /1974/: A new acid
hydrolysis method for determining tryptophan in
peptides and proteins
Anal. Biochem., 60, 45-50.
- Pellett, P.L. /1985/: Amino acid scoring systems and their
role in the estimation of the protein quality of
cereals, In: Amino acid composition and biological
value of cereal proteins, Lásztity, R. and Hidvégi,
M.(eds.),
D. Reidel, Publ.Co., Dordrecht, Boston, Lancaster,
Akadémiai Kiadó, Budapest, 183-203.
- Phillips, R.D. /1983/: A scheme for the rapid preparation
of protein hydrolyzates for amino acid analysis
J. Food Science, 48, 284-285.
- Pikaard, C.S., Cherry, J.H. /1984/: Maintenance of normal
or supranormal protein accumulation in developing
ovules of Glycine max L. Merr. during PEG induced
water stress
J. Plant Physiol., 75, 176-180.
- Pisano, J.J., Bronzert, T.J. /1969/: Analysis of Amino
Acids phenylthiohydantoins by gas chromatography
J. Biol. Chem., 244, 5597-6007.
- Plétser, J. /1973/: Climatic model for Phytotron studies
Acta Agron. Hung., 22, 67-80.
- Priez, K.A., Morris, L. /1960/: Modified Procedure for the
Automatic Analysis of Amino Acids
Anal. Biochem., 1, 187-192.

- Rao,D.R., Patel,G., Nishimuta,J.F. /1980/: Comparison of protein quality of corn, triticale and wheat
Nutr. Rep. Int., 21, 923-929.
- Remo,R., Bertani,A. /1989/: Effect of Decreasing Oxygen Concentration on Polyamine Metabolism in Rice and Wheat Shoots
J. Plant Physiol., 135, 375-377.
- Rending,V., Jimenez,J. /1978/: Nitrogen nutrition as a regulator of biosynthesis of storage proteins in maize (Zea mays L.) grain, In: Nitrogen in the Environment
Acad. Press , 253-278.
- Rich,N., Satterlee,L.D., Smith,J.L. /1980/: A comparison of in vivo apparent protein digestibility in man and rat to in vitro protein digestibility as determined using human and rat pancreatins and commercially available proteases
Nutr. Rep. Int., 21, 285-300.
- Ripphahn,J., Halpaap,H. /1977/: Performances, data, and results with various chromatographic system and various detection patterns in high performance thin-layer chromatography
Chromatographia, 10, 613-623.
- Roach,D., Gehrke,C.W. /1970/: The hydrolysis of proteins
J. Chromatogr., 52, 393-404.
- Robutti,J.L., Hosney,R.C., Deyoe,C.W. /1974/: Modified opaque-2 corn endosperms I.: Protein distribution and amino acid composition
Cereal Chem., 51, 163-172.

- Rosier, J., Peteghem, C. van /1988/: A screening method for the simultaneous determination of putrescine, cadaverine, histamine, spermidine and spermine in fish by means of high pressure liquid chromatography of their 5-dimethylaminonaphthalene-1-sulphonyl derivatives
Z. Lebensm. Unters. Forsch., 186, 25-28.
- Rutz, H. /1977/: Untersuchungen über Schätzwerte züchterischer parameter von technologischen Merkmalen des Maiskornes (Zea mays, L.)
Diss., Univ. Hohenheim, 72.
- Salgó, A., Ganzler, K., Jécsai, J. /1985/: Simple enzymic methods for prediction of plant protein digestibility, In: Amino Acid composition and biological value of cereal proteins, Lásztity, R. and Hidvégi, M. (eds.), D. Reidel Publ. Co., Dordrecht, Boston, Lancaster, Akadémiai Kiadó, Budapest, 311-323.
- Salgó, A., Feller, U. /1987/: Rapid micro methods for the determination of exo- and endopeptidase activities in plant extracts
Microchemical J., 35, 12-21.
- Satterlee, L.D., Kendrick, J.G., Jewell, D.K., Brown, W.D. /1981/: Estimating apparent protein digestibility from in vitro assays, In: Protein quality in humans: assessment and in vitro estimation, Bodwell, C.E., Adkins, J.S., Hopkins, D.T. (eds.)
AVI. Publ. Co Inc., Westport, C.T., 316-339.
- Saunders, R.M., Connor, M.A., Booth, A.N., Bickoff, E.M., Koehler, G.O. /1973/: Measurement of digestibility of alfalfa protein concentrates by in vivo and in vitro methods
J. Nutr., 103, 530-535.

- Sears, R.G., Deckard, E.L. /1982/: Tissue culture variability in wheat: Callus induction and plant regeneration
Crop.Sci., 22, 546-550.
- Seiler, N. /1977/: Chromatography of biogenic amines: generally applicable separation and detection methods
J. Chromatogr., 143, 221-246.
- Sharobeem, S.F., Lásztity, R., Hidvégi, M., Salgó, A., Simon-Sarkadi, L. /1985/: Amino acid content and in vitro protein quality of different corn varieties, In: Amino acid composition and biological value of cereal proteins, Lásztity, R. and Hidvégi, M. (eds.), D.Reidel Publ. Co., Dordrecht, Boston, Lancaster, Akadémiai Kiadó, Budapest, 421-437.
- Sharobeem, S.F., Hidvégi, M., Lásztity, R. /1987/: Kukoricafehérjék vizsgálata II.: A fehérjék makrofrakciói
Élelmiszervizsgáló Közlemények, 33(3), 156-169.
- Shaw, G.G., Al-Deen, J.H.S., Elworthy, P.M. /1980/: The construction and performance of a low cost automated HPLC system for polyamine assay
J. Chromatogr. Sci., 18, 166-170.
- Simon-Sarkadi, L., Fatér, S., Kiss, I., Sharobeem, S.F. /1984/: Investigation of amino acids in maize protein by Overpressured Layer Chromatography, In: Proc. of Int. Symposium on TLC with special Emphasis on Overpressured Layer Chromatography (OPLC), Szeged, Hungary, Tyihák, E. (ed.), Publ. Labor MIM, Hungary, 316-323.

- Simonné-Sarkadi, L., Szerző, Zs. /1985/: Cisztein meghatározási módszerek tanulmányozása
Élelmiszervizsgálati Közlemények, 31(4), 203-207.
- Simonné-Sarkadi, L. /1986/: A túlnyomásos rétegekromatográfia alkalmazásának lehetőségei a táplálékfehérjék aminosav-összetételének tanulmányozásában
Műszaki Doktori Értekezés, BME.
- Simon -Sarkadi, L., Galiba, G. /1988/: Determination of putrescine and cadaverine in wheat callus by Overpressured Layer Chromatography (OPLC)
J. Planar Chromatogr., 1(4), 362-364.
- Simpson, R.J., Neuberger, M.R., Liu, T.Y. /1976/: Complete amino acid analysis of proteins from a single hydrolysate
J. Biol. Chem., 251, 1936-1940.
- Slocum, R.D., Flores, H.E., Galston, A.W., Weinstein, L.H. /1989/: Improved Method for HPLC Analysis of Polyamines, Agmatine and Aromatic Monoamines in Plant Tissue
J. Plant. Physiol., 89, 512-517.
- Smith, T.A., Sinclair, C. /1967/: The effect of acid feeding on amine formation in barley
Ann.Bot., London, 31, 103-111.
- Smith, T.A. /1973/: Amine levels in mineral deficient *Hordeum vulgare* leaves
Phytochem., 12, 2093-2100.
- Sosulski, F.W., Sarwar, G. /1985/: Prediction of protein nutritive value of cereal-legume blends using rat bioassays and amino acid scores, In: Amino acid composition and biological value of cereal proteins, Lásztity, R. and Hidvégi, M.(eds.), D.Reidel Publ.Co., Dordrecht, Boston, Lancaster, Akadémiai Kiadó, Budapest, 287-294.

- Spencer, R.L., Wold, F. /1969/: A new convenient method for estimation of total cystine-cysteine in proteins
Anal. Biochem., 32 (1), 185-190.
- Spitz, H.D. /1973/: A new approach for sample preparation of protein hydrolysates for amino acid analysis
Anal. Biochem., 56, 66-73.
- Steinhart, H., Sandmann, J. /1977/: Determination of tryptophane in plasma with a spectrofluorometer System
Anal. Chem., 49(7), 950-953.
- Stewart, C.R. /1973/: The effect of wilting on proline metabolism in excised bean leaves in the dark
J. Plant Physiol., 51, 508-511.
- Stewart, C.R., Hanson, A.D. /1980/: Proline accumulation as a metabolic response to water stress, In: Adaption of Plants to Water and High Temperature Stress, Turner, N.C. and Kramer, P.J. (eds.), Wiley-Interscience, New York, 173-189.
- Stewart, C.R. /1980/: The mechanism of ABA induced proline accumulation in barley leaves
J. Plant Physiol., 66, 230-233.
- Subramanyam, M., Deyoe, C.W., Harbers, L.H. /1980/:
Corn and sorghum 1.: Relationship of grain maturity to nutritional composition
Nutr. Rep. Int., 22, 657-666.
- Sugiura, T., Hayashi, T., Kawai, S., Ohno, T. /1975/:
High speed liquid chromatographic determination of putrescine, spermidine and spermine
J. Chromatogr., 110, 385-388.

- Suresh, M.R., Ramakrishna, S., Adiga, P.R. /1978/:
Regulation of arginine decarboxylase and
putrescine levels in *Cucumis sativus* cotyledons
Pytochemistry, 17, 57-63.
- Sváb, J. /1979/: *Többváltozós módszerek a biometriában.*
Mezőgazdasági Kiadó, Budapest
- Tkachuk, R., Irvine, G.N. /1969/: Amino acid composition
of cereals and oilseed meals
Cereal Chem., 46, 206-218.
- Tsen, C.C. /1985/: Amino acid composition and biological
value of cereal germs, In: Amino acid composition
and biological value of cereal proteins, Lásztity,
R. and Hidvégi, M. (eds.), D. Reidel Publ. Co.,
Dordrecht, Boston, Lancaster, Akadémiai Kiadó,
Budapest, 453-466.
- Tsugita, A., Scheffler, J.J. /1982/: A rapid method for and
hydrolysis of protein with a mixture of trifluoro-
acetic acid and hydrochloric acid
Eur. J. Biochem., 124, 585-588.
- Turner, N.C., Jones, M.M. /1980/: Turgor maintenance by
osmotic adjustment. A review and evaluation, In:
*Adaptation of Plants to Water and High Temperature
Stress*, Turner, N.C. and Kramer, P.J. (eds.),
Wilney-Interscience, New York, 87-103.
- Tyihák, E. /1979/: *A rétegekromatográfia zsebkönyve*
Műszaki Könyvkiadó, Budapest
- Tyihák, E., Mincsovcics, E., Kalász, H. /1979/: *New Planar
Chromatographic Technique: Overpressured Thin-
Layer Chromatography*
J. Chromatogr., 174, 75-81.

- Tyihák, E., Mincsovics, E., Kalász, H., Nagy, J. /1981/:
Optimization of Operating Parameters in Over-
pressured Thin-Layer Chromatography
J. Chromatogr., 211, 45-51.
- Tyihák, E., Mincsovics, E. /1988/: Forced-Flow Planar
Liquid Chromatographic Techniques
J. Planar Chromatogr., 1, 6-19.
- Udenfriend, S., Stein, S., Boehlen, P., Dairman, W.,
Leimgruber, W., Weigle, M. /1972/: Fluorescamine
Reagent for Assay of Amino Acids, Peptides Proteins
and Primary Amines in the Picomole Range
Science, 178, 871-872.
- Varga, J., Örsi, F., Hegedűs, J., Virág, J., Lásztity, R.
/1977/: Automatikus analízis az élelmiszer-vizsgálatokban
III.: Gabonák fehérjetartalmának vizsgálata
Élelmezési Ipar, 31, 181-185.
- Walger-Kunze, B. /1985/: In vivo methods in the evaluation
of the nutritional quality of cereal proteins,
In: Amino acid composition and biological value
of cereal proteins, Lásztity, R. and Hidvégi, M.
(eds.), D. Reidel Publ. Co., Dordrecht, Boston,
Lancaster, Akadémiai Kiadó, Budapest, 131-162.
- Wall, J.S., James, C., Donaldson, G.L. /1975/: Corn proteins.
Chemical and physical changes during drying of
grain
Cereal Chem., 52, 779-790.
- Zeleny, L. /1935/: The distribution of Nitrogen in the
seed of mays at different stages of maturity
Cereal Chem., 12, 536-542.

Zomzely,C., Marco,G., Emery,E. /1962/: Gas Chromatography
of the n-butyl-N-trifluoroacetyl derivatives of
Amino Acids
Anal.Chem., 34, 1414-1417.

Zumwalt,R.W., Absheer,J.S., Kaiser,F.E., Gehrke,C.W.
/1987a/: Acid hydrolysis of protein for chromatographic
analysis of amino acids
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70(1), 147-151.

Zumwalt,R.W., Kuo,K.C.T., Gehrke,C.W. (eds.) /1987b/:
Amino acid analysis by gas chromatography
University of Missouri-Columbia, Columbia
Missouri, Publ. CRC Press, Inc. Boca Raton F.L.