

DEBRECENI EGYETEM
KERPELY KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető:

Prof. Dr. Holb Imre
egyetemi tanár, MTA doktora

Témavezető:

Dr. Tóth Szilárd
egyetemi tanár

Társtémavezető:

Dr. Micsinai Adrienn
projektmenedzsment igazgató

**Különböző növényi vetőmagvak genetikai homogenitás vizsgálata
tömegspektroszkópiai technológiával**

Készítette:

Bojté Csilla
doktorjelölt

DEBRECEN

2022

Különböző növényi vetőmagvak genetikai homogenitás vizsgálata tömegspektroszkópai technológiával

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Növénytermesztési és kertészeti tudományágban

Írta: Bojté Csilla, okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem **Kerpely Kálmán Doktori Iskolája**
(Növénytermesztési programja) keretében

Témavezető: Dr. Tóth Szilárd, egyetemi tanár

Társtémavezető: Dr. Micsinai Adrienn, projektmenedzser igazgató

Az értekezés bírálói:

név	tud. fokozat	aláírás
Prof. Dr. Marton L. Csaba	PhD	_____
Prof. Dr. Jolánkai Márton	PhD	_____

A bírálóbizottság:

név	tud. fokozat	aláírás
elnök: _____	_____	_____
tagok: _____	_____	_____
_____	_____	_____
titkár: _____	_____	_____

Az értekezés védésének időpontja: _____

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	4
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	6
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
3.1. Hazai búza-, kukorica-, szója- és napraforgó vetőmag igények alakulása 2016-2020. év között vizsgálva.....	8
3.2. MALDI-TOF eredete.....	10
3.3. A MALDI-TOF MS készülék működési elve.....	10
3.4. A MALDI-TOF MS és MALDI-TOF- TOF MS technológia alkalmazása.....	10
3.4.1. Élelmiszerek vizsgálata MALDI-TOF MS technológiával.....	11
3.5. Spektroszkópiai technikák.....	12
3.6. Növényi vizsgálatok MALDI-TOF módszerrel.....	14
3.6.1. MALDI-TOF gabona vizsgálat módszere.....	14
3.6.2. MALDI-TOF szójabab vizsgálat módszere.....	19
3.6.3. MALDI-TOF kukorica vizsgálat módszere.....	23
3.6.4. MALDI-TOF Napraforgó vizsgálat módszere.....	27
3.7. Új technológiák alkalmazása a MALDI-TOF vizsgálatokban.....	29
3.8. Aszálytűrés vizsgálata MALDI-TOF analízissel.....	30
3.9. Peroxidázok kimutatása MALDI-TOF MS készülékkel.....	32
3.10. Kórokozók kimutatása MALDI-TOF MS módszerrel.....	32
3.11. Proteomanalízis MALDI-TOF MS módszerrel.....	34
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	35
4.1. Munkaoldatok, kalibrációs oldatok.....	36
4.1.1. Kalibráló Standard.....	37
4.1.2. Az extrakciós módszer optimalizálása.....	38
4.1.3. Extrakciós munka oldatok.....	39
4.2. Eluáló oldat.....	40
4.3. Mátrix oldatok.....	40
4.4. Minta előkészítés.....	40
4.4.1. Mintatartó lemezek előkészítése.....	40
4.5. Kalibráló Standard oldat.....	41
4.6. Minták fizikai előkészítése.....	42
4.7. Extrakciós eljárások.....	42
4.7.1. Hexános puffer extraktumok felvitelének lépései.....	42
4.7.2. Extrakció vizes NaCl pufferrel extraktumok felvitelének lépései.....	43

4.7.3. Extrakció savas NaCl pufferrel extraktumok felvitelének lépései	44
4.7.4. Extrakció 2-propanolos pufferrel extraktumok felvitelének lépései	44
4.7.5. Extrakció 1-propanolos pufferrel extraktumok felvitelének lépései	45
4.7.6. 60%-os etanolos puffer extraktumok felvitelének lépései.....	45
4.8. Mérés.....	47
4.8.1. Saját method fájlok automatizált méréshez	48
4.9. Alkalmazott módszerek	48
4.9.1. SPSS	48
5. EREDMÉNYEK.....	50
5.1. A MALDI-TOF vizsgálatok eredményeinek értékelése	50
5.2. Az extraháló szerek kiválasztása spektrumok alapján, a vizsgált növényfajoknál	52
5.3. Az extrahálószer hatása a tömegspektrumokra.....	55
5.4. Az M/Z értékek vizsgálati eredményei a napraforgó kaszat minták esetében.....	64
5.4.1. Napraforgó kaszatok esetében mért M/Z értékek eredményei	64
5.4.2. A búza minták esetében mért M/Z értékek eredményei	68
5.4.3. A szója minták esetében mért M/Z értékek eredményei	71
5.4.4. A kukorica minták esetében mért M/Z értékek eredményei.....	74
5.5. Darált és darálatlan minták mérési eredménye.....	77
5.6. Az extrahálószer és az M/Z érték közötti korreláció, Pearson-féle analízissel vizsgálva	81
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	83
7. ÖSSZEFOGLALÁS	85
8. SUMMARY.....	86
9. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	87
10. GYAKORLATBAN HASZNOSÍTHATÓ EREDMÉNYEK.....	88
11. IRODALOMJEGYZÉK.....	89
12. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK.....	107
13. ÁBRÁK JEGYZÉKE	110
14. TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE	112
15. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	114
16. NYILATKOZATOK.....	115
17. MELLÉKLETEK.....	116

1. BEVEZETÉS

Az emberiség növekedésével és a felgyorsult világunkban nagy kihívást jelent a szükségletek kiszolgálása bármilyen területen. A mezőgazdasági ágazaton belüli igények teljesítése a minőségi élelmiszer és takarmány szempontjából meghatározó szerepet kap társadalmunkban. A biztos és sikeres hozam alapvető feltétele a jó minőségű és genetikailag homogén vetőmag előállítása.

Az ön- és az idegentermékenyülés meghatározására, a fajtatisztaság vizsgálatára, a fajtaazonosításra és a fajtavédelemre egyaránt alkalmazhatunk izoenzim analíziseket (HAJÓSNÉ, 1999). Az izoenzim analíziseket inkább a fajtaelismerés és a szabadalmaztatás céljából alkalmazzák.

Napjainkban a kukoricahibridek és napraforgóhibrideket fajtatisztaságának vizsgálatára az elfogadott módszer az izoelektromos fókuszálással végzett gélelektroforézis. Ezzel a módszerrel a kukoricában található zein tartalékfehérjéket magvanként extrahálják és ultravékony poliakrilamid gélenzétválasztják (UTL-IEF módszer). Az ultravékony gélek használata gazdaságosabb és magasabb feszültséggel elvégezhető, segítségével a vizsgálat rövidebb ideig tart és a festési eljárás gyorsabb, mint a hagyományos gélek alkalmazásakor.

Az izoenzim alapú fajtaazonosításkor a vizsgált fajta fehérjemintázatát hasonlítják össze a hiteles fajta fehérjemintázatával, míg hibrid genetikai tisztaságának meghatározásakor a szülők fehérjemintázatát hasonlítják össze a hibrid fehérjemintázatával. A gélkromatogramokon láthatón fehérje sávok mintázata az adott fajtára vagy beltenyésztett vonalra jellemző. A szülőkben mindig ki kell jelölni azokat a sávokat, marker fehérjéket, amelyek a hibridben öröklődnek. Általában a hibrid tisztasága értékelhető az apában megtalálható egy vagy több zein markersáv segítségével, amelyhiányzik az anyából. Ezek a sávok felhasználhatók a hibridek fajtaazonosításakor is. A markersávok jelenléte vagy hiánya jelzi a hibrid tisztaságát, segítségével kimutatható az önbeporzott vagy az idegen beporzású szemek aránya.

Magyarországon csak őszi búzából 114.570 tonna vetőmag-alapanyagot állítottak elő a 2020. termelési évre, ami 6,5%-os emelkedést jelent 2018. évhez képest. Kukoricából 2019-ben 100.934 tonnát fémzároltak, amely a 2020. év vetőmag-szükséglet mintegy 4 szeresét adta a hazai termeléshez, a többit 75%-ot exportálták a gazdálkodók.

Napraforgó esetében 8723 tonnát fémzároltak 2019-ben, ami teljes mértékben biztosította a 2020. évi igényeknek megfelelő minőségi vetőmagot, illetve még felesleges vetőmag mennyiség is maradt – mintegy 40% - amely exportra is kerülhetett vagy a 2021. évi termesztés alapját képezte. Szójából 7200-7500 tonna vetőmagot fémzároltak 2019-ben, amely teljes egészében biztosította a hazai 2020. évi termeléshez szükséges alapanyag mennyiséget (HTTP1).

Ezekből a tételekből jól látható, hogy főként kukoricából szorulunk behozatalra, amelynél kiemelten fontos a GMO mentesség, amelyet hazánk 1991. január 1.-e óta preferál és a Géntechnológiai Eljárásokat Véleményező Bizottság segítségével akadályozza meg, hogy hazánkban számtalan génmódosított növény jelenjen meg a termelésben és végfelhasználásban. A gyakorlatban azonban nem mindig tapasztalható lojalitás, amely sok esetben okoz problémákat a termelésben. A későn detektált, szennyezett vetőmagból előállított növényállományt a törvényeink alapján meg kell semmisíteni, illetve ellenőrizni szükséges a szomszédos kultúra mentességét is. A gyakorlatban azonban nem mindig tapasztalható lojalitás, amely sok esetben okoz problémákat a termelésben. Egy magminta genetikai tisztaságát az mutatja meg, hogy a minta hány százaléka nem fertőzött más fajta vagy faj magjaival, vagy genetikai anyagával. Ez a probléma sarkalt arra, hogy egy olyan meglévő technológiához fejlesszek módszereket, amelyek gyorsítják, pontosítják ezen eljárásokat és azzal, hogy bármikor megismételhetők a mérések, valamint a mérésekhez tartozó adatbázist könnyedén elektronikusan eltárolva több év múlva is visszanezhetők egy-egy fajra/ fajtára bontva az eredmények, segítik a minőségi alapanyag előállítását hazánkban.

Az 1980-as évek közepe óta fejlesztett MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) ionizációs technika lehetőséget nyújt olyan módszerek kialakítására, amely az agrártudományi kutatások színvonalát is jelentősen növeli. Több tucatnyi különböző vetőmag tételt kaptam különböző növényi fajokból, hibrideket és szülői vonalakat is. A fajta tulajdonosok nem járultak hozzá, hogy a tételek fajta nevét feltüntessem a dolgozatomban. Minden növény fajtából csak 10 tételt tudtam bemutatni az összes, azaz a 40 db tétel közül, mivel ezek képanyaga jelentősen növeli a dolgozatomban terjedelmét.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A MALDI-TOF tömegspektrométer célkészülék a mikrobiológia minták gyors azonosításra szolgál fehérje alapon. A több mint 113 évre tekint vissza a tömegspektrometria, amely az elmúlt évtizedben hatalmas fejlődésen ment keresztül. Az új mérnöki fejlesztéseknek köszönhetően rendkívül gyors pontos és egyszerű a készülékek használata.

Ph.D. (doktori) értekezésem a Budapesti WESSLING Hungary Kft.-nél készült, ahol a cég tulajdonában lévő MALDI-TOF MS készülékén kaptam lehetőséget a módszerek fejlesztésére és minták előkészítésre, valamint mérésére. A nemzetközileg elismert magyar cég csoport tagja már korábban elkezdte a fejlesztést a kukorica vetőmagok vizsgálatára, amely sikeres és biztos alapot adott a további munkám elkezdésére és annak sikeres befejezésre.

Szakmai és emberi segítségükkel 4 gazdaságilag fontos ipari növény vetőmagjainak genetikai tisztaságát sikerült vizsgálnom és módszert fejlesztem azokra. A kukorica vizsgálatok eredményei adták azt a bázist, amelyből a további vizsgálatokat folytattam a MALDI-TOF MS készülék és szoftveres háttérrel napraforgóra, szójára és búza vetőmagokra.

Kutatásaim főbb célkitűzései a következők voltak:

1. MALDI-TOF MS technológia kidolgozása búza, kukorica, napraforgó és szója fajták fajtatisztaságának/homogenitásának meghatározására a magok tartalékfehérjéinek összetétele alapján.
2. Különböző extraháló szerek alkalmazása a magok tartalékfehérjéinek kivonására, a tömegspektrum szempontjából optimális oldószer kiválasztása növényfajonként.
 - NaCl-os (semleges és savas), valamint 60%-os etanolos puffer eljárás
 - 1-, illetve 2-propanolos puffer eljárás
 - SA mátrix oldat és a HCCA mátrix oldatok jelentősége; eltérés és különbségek
 - Hexános előkezelés a napraforgó és a szója esetében.
 - A magminták extraktumainak eltarthatósága a tömegspektrum változása nélkül.
 - Mintaelőkészítési eljárások fejlesztése.
 - Az extrahálószer és az M/Z érték közötti korreláció vizsgálat.

3. MALDI-TOF MS készülék paramétereinek optimalizálása:

- Mérési paraméterek optimalizálásával automata gyors mérési lehetőség kialakítása (AutoXrun)

Kapott eredményekre mérési módszer (method), azaz értékelő fájlok tervezése.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Hazai búza-, kukorica-, szója- és napraforgó vetőmag igények alakulása 2016-2020. év között vizsgálva

Fontos szántóföldi növényünk a búza, amely a 2017. – és 2020. évi enyhe csökkenést leszámítva stabilan egy millió hektár fölött szerepel a hazai vetésforgóban. Vetőmag igénye a piaci kínálatban szereplő fajták genetikai potenciálját is tükrözi, hisz míg 2016-ban 1.044.314 ha volt a vetésterület 241.665 tonna vetőmagot használtak fel szemben a 2018-as évvel, mikor 259.157 tonna vetőmagot alkalmaztak 1.026.151 ha-on (1. táblázat) (HTTP3).

Hasonló tendencia figyelhető meg a szója vetőmag esetében is, mikor 5.463 tonna vetőmagot használtak fel a gazdák 61.029 ha-on, míg a 2020. évi 2359 hektárral alacsonyabb vetésterületre mindösszesen 63 tonnával alkalmaztak kevesebbet (2. táblázat) (HTTP1).

A kukorica fajták és hibridek évről évre jobb genetikai potenciállal rendelkeznek, ami a vetőmag felhasználásban is érződik, annak ellenére, hogy sokszor akár több, mint 88 ezer hektárral is csökken egy-egy évben a vetésterülete (3. táblázat) (HTTP2).

A napraforgó vetésterülete a kukoricához hasonló mértékben változott hazánkban (82. 000 hektár), míg a vetőmag felhasználása területarányosnak mondható, köszönhető ez a két legeredményesebb termesztéstechnológiának (Clear-filed, IMI technológia) és a hozzájuk nemesített fajtáknak/hibrideknek (4. táblázat) (HTTP2).

1. táblázat: Búza vetésterületek és vetőmag felhasználás alakulása hazánkban a vizsgált időszakban (2016-2020. év)

Búza	2016	2017	2018	2019	2020
Vetésterület (ha)	1.044.314	966.400	1.026.151	1.015.640	936.624
Vetőmag felhasználás (tonna)	241.665	258.916	259.157	237.500	223.750

2. táblázat: Szója vetésterületek és vetőmag felhasználás alakulása hazánkban a vizsgált időszakban (2016-2020. év)

Szója	2016	2017	2018	2019	2020
Vetésterület (ha)	61.029	75.667	62.118	58.227	58.670
Vetőmag felhasználás (tonna)	5.463	6.954	5.671	5.400	5.400

3. táblázat: Kukorica vetésterületek és vetőmag felhasználás alakulása hazánkban a vizsgált időszakban (2016-2020. év)

Kukorica	2016	2017	2018	2019	2020
Vetésterület (ha)	1.011.563	988.823	839.080	1.027.592	981.006
Vetőmag felhasználás (tonna)	32.881	31.903	30.619	28.800	29.555

4. táblázat: Napraforgó vetésterületek és vetőmag felhasználás alakulása hazánkban a vizsgált időszakban (2016-2020. év)

Napraforgó	2016	2017	2018	2019	2020
Vetésterület (ha)	629.675	694.543	616.951	564.112.	612.565
Vetőmag felhasználás (tonna)	6.323	7.042	6.279	5.740	6.173

3.2. MALDI-TOF eredete

J. J. Thomson, akit a tömegspektroszkópia atyának is tekintenek, vizsgálatai során arra a következtetésre jutott, hogy az ionizációt követően az elektromos térben gyorsított pozitív töltésű gázionok eltérő röppályán haladnak a mágneses térben, majd eltérő helyen csapódnak a detektorba. Ezáltal lehetőséget teremtve a mintából keletkező ionok molekulatömeg/töltés (m/z) alapján történő elválasztására (HTTTP4).

Az 1980-as években újabb ionizációs technikákat fejlesztettek ki: Fast Atom Bombardment, FAB; Plazmadeszorpciós, PD-; lézerdeszorpciós, LDI-ionizáció. A biopolimerek vizsgálata szempontjából a legfontosabb módszer a lézerdeszorpciós ionizáció feltalálása volt. KARAS és HILLENKAMP 1988-ban megalkotta a MALDI rendszert, az újonnan kifejlesztett MALDI forrást a repülési idő analizátorhoz (time-of-flight, TOF) kapcsolták (KARAS és HILLENKAMP, 1988).

Ez a készülék már alkalmas volt 10 kDa molekulatömegű minták analízisére is. KOICHI TANAKA számolt be először (1987) a lézerdeszorpciós ionizáció alkalmazásáról, amiért 2002-ben Nobel-díjat kapott (ZIMMERMANN, 2015).

3.3. A MALDI-TOF MS készülék működési elve

A tömegspektrometria a szerkezeti vizsgálatok hatékony módszere, amelyben a vizsgálandó molekulákat gázfázisba juttatják, ionizálják és nagyfeszültségű elektromos térrel gyorsítják. Az ionokat tömegük és töltésük alapján mágneses, elektrosztatikus vagy rádiófrekvenciás mezővel választják el és mérik. A biológiailag aktív molekulák (fehérjék, enzimek) vizsgálatának egyik legfontosabb vizsgálati módszere a MALDI-TOF technológián alapul.

3.4. A MALDI-TOF MS és MALDI-TOF- TOF MS technológia alkalmazása

Napjainkban minden tudomány területén alkalmazzák az Orvostudománytól egészen az Agrártudományi területekig.

3.4.1. Élelmiszerek vizsgálata MALDI-TOF MS technológiával

A leggyakoribb csalások felderítéséhez kapcsolódó élelmiszeripari termékek kémiai elemzése a mátrixok összetettsége és a legtöbb folyamat ismeretlensége miatt összetett feladat. Sőt, a csalások egyre kifinomultabbak, ami még sürgetőbbé teszi az élelmiszer-ellenőrzés megbízható, gyors, költséghatékony új analitikai módszereinek kidolgozását. Az évek során a MALDI-TOF MS bebizonyította, hogy képes megfelelni ennek az igénynek, többek között egy sor tagadhatatlan belső előnynek köszönhetően, beleértve a könnyű használatot, a gyors adatgyűjtést és az értékes információk megszerzésének képességét, még az egyszerű előkezelési eljárásoknak alávett összetett mintákból is. Ezeket a funkciókat kényelmesen kihasználták az élelmiszer-csalás területén számos mátrixban, beleértve a tejet és tejtermékeket, olajokat, halat és tenger gyümölcseit, húst, gyümölcsöt, zöldséget és néhány más kategóriát (LÁSZTITY, 1981; HALÁSZ et al., 2007, JAGADEESH et al., 2017, ZAPATA et al., 2009).

A jelen áttekintés átfogó áttekintést nyújt a meglévő MALDI-alapú alkalmazásokról az élelmiszerek minőségének értékelésére és a hamisítások kimutatására (ZAMBONIN, 2021).

Az Európai Bizottság szerint a leggyakoribb csalás a hamisítás, amely élelmiszerekben többféleképpen fordulhat elő: „egy tápanyag, összetevő, élelmiszer vagy élelmiszer egy részének kicserélése egy alacsonyabb értékűre” (helyettesítés), „nagy értékű összetevő keverése alacsonyabb értékű összetevővel” (hígítás), „ismeretlen és nem bejelentett vegyületek hozzáadása az élelmiszerekhez minőségi tulajdonságaik javítása érdekében” (nem jóváhagyott javítás), és „az alacsony értékű összetevő elrejtése” élelmiszer-összetevők vagy termékek minősége” (elrejtés). Az élelmiszer-csalás más formákat is ölthet, ideértve a hibás címkézést, a csomagoláson gazdasági haszonszerzés céljából való hamis állítások folyamatát, a hamisítást a szellemi tulajdonjogok megsértése esetén, valamint a szürke piacot, amely a termékek jogosulatlan értékesítési csatornáira utal (HAYNES et al., 2019).

A fenti megfontolások alapján egy adott élelmiszer kémiai elemzése számos okból elvégezhető, mint például a hamisítás egyedi meghatározása, a hitelesítés és a nyomon követhetőség, a földrajzi eredet megerősítése, a toxicitás felmérése és sok más okból. Az élelmiszerminták elemzése tehát döntő kihívást jelent az analitikai kémia számára, és számos tudós foglalkozik megbízható, gyors, költséghatékony analitikai eljárások kifejlesztésével az élelmiszer-csalásokkal kapcsolatos analitikai problémák megoldására (TÖRÖK et al., 2014).

Az élelmiszer-alapú mátrixok összetettek, és a kémiai összetételek széles skálája jellemzi, ami befolyásolja a kémiai analitikai mérések teljesítményét, miközben a manipuláció természete gyakran ismeretlen, ami még bonyolultabbá teszi az elemzést (HTTP5). Ráadásul a megtévesztés észlelésére szolgáló technológiák fejlődésével egyre kifinomultabbá válnak, mivel a csaló beszállítók is alkalmazkodnak ahhoz, hogy új módszereket találjanak az ellenőrzések megkerülésére (ZAMBONIN, 2021).

A célzott és nem célzott analitikai megközelítéseket főként élelmiszer-ellenőrzéseknél alkalmazzák. A célzott, általában munkaigényes és időigényes elemzés a szennyező anyagok ismeretén alapul, és a csalás markereit képviselő vegyület egy vagy néhány osztályának kimutatására összpontosít. Mivel a legtöbb esetben a csalás típusa ismeretlen, gyakran nem célzott elemzésre van szükség. Ez a megközelítés a teljes élelmiszerminta kémiai profiljának gyors műszeres megszerzésén alapul, általában spektrumokkal, aminek egyedi ujjlenyomatot kell szolgáltatnia referenciaként a gyanús mintákhoz, gyakran kemometriai adatkezelés segítségével (MCGRATH et al., 2011; CAVANNA et al., 2018; GAO et al., 2019, RODIONOVA és POMERANTSEV, 2020).

3.5. Spektroszkópiai technikák

A mátrix-asszisztált lézeres deszorpciós/ionizációs repülési idő tömegspektrometriás profilalkotás (MALDI-TOF MS profilozás) egy feltörekvő megközelítés, amely a biológiai mintákban közvetlenül kimutatott molekulákból származó ionok gyors és nagy áteresztőképességű szűrésén alapul, beleértve az ép sejteket és a nyers kivonatokat. (ALBRETSSEN, 2011). Bár a MALDI-TOF MS profilalkotás az egyik legígéretesebb tömegspektrometriás technika, csak a legintenzívebb, kis molekulatömegű (jellemzően $< m/z$ 20 000) molekulaionokat detektálja, és nem teszi lehetővé a közvetlen fehérjeazonosítást. A MALDI-TOF MS profilalkotás általában nagyszámú biomarker kimutatásához vezet, és normál vagy megváltozott körülmények között rögzíti a sejtek, szövetek és biológiai folyadékok ujjlenyomatait (BUGYI et al., 2012; STÁJER et al., 2020). A MALDI-TOF MS profilalkotás kezdetben a klinikailag releváns orvosi alkalmazások osztályozására irányult, beleértve a rák (SIDRANSKY et al. 2003) és a patogén mikroorganizmusok (ILINA et al., 2009) diagnosztikáját. Az utóbbi időben sokoldalú eszköznek bizonyult példátlan számú biológiai alkalmazáshoz.

Klinikai bakteriális (EIGNER et al. 2009) és mikobakteriális (OSWALD-RICHTER et al., 2012) izolátumok, különböző patogén talajgombák (LOPES et al., 2014), élesztőgombák (AGUSTINI, 2014) és vírusok (CALDERARO et al., 2014) csak néhány olyan példa a biológiai rendszerek közül, amelyeket MALDI-TOF MS profilalkotással azonosítottak és csoportosítottak. Ezen túlmenően élelmiszerek és növényi magok minőségellenőrzésére is alkalmazták, beleértve a mézet (WANG et al., 2009) és a csokoládét (BONATTO és SILVA, 2014).

Érdekes módon több szerző is kimutatta, hogy a MALDI-TOF MS profilalkotás még a baktériumtörzs szintű azonosításban is képes felbontást mutatni (WIESER et al., 2012; SANDRIN-GOLDSTEIN, 2013). A MALDI-TOF MS profilalkotást a *Staphylococcus aureus* meticillinrezisztens törzseinek kimutatására is alkalmazták (SPARBIER et al., 2013). Nemrég Bonatto és Silva számolt be ennek a technikának a használatáról fém nanorészecskék vizsgálatával kapcsolatban stressznek kitett élesztőkultúrák differenciálására, bemutatva, hogy ennek a módszernek a mikroorganizmus-fajok azonosításán túl további alkalmazásai is lehetnek. Metha és Silva tovább tesztelték a MALDI-TOF MS profilozást baktérium- és növénymintákra, valamint sikeresen megkülönböztették a specifikus biológiai feltételeket (METHA és SILVA, 2015).

Különböző tömegspektrometriai (MS) technikák és ionizációs megközelítések, beleértve a mátrix-asszisztált lézeres deszorpciós ionizációs repülési időt (MALDI-TOF), az elektropermetet (ESI), a környezeti tömegspektrometriát (AMS) és a nagy felbontású tömegspektrometriát (HRMS), szintén széles körben alkalmazták ugyanerre a célra, és folyamatos fejlődésük lehetővé tette számos új módszertan kifejlesztését az élelmiszer-minőség és -biztonság ellenőrzésére (RODRIGUEZ-SAONA és ALLENDORF, 2011; ROSSI et al., 2015; SØRENSEN et al., 2016; MCGRATH et al., 2011; SOBOLEV et al., 2019; POWER et al., 2020; HASSOUN et al., 2020; VALAND et al., 2020; COZZOLINO és DE GIULIO, 2011; KAUFMANN, 2012; CASTRO-PUYANA és HERRERO, 2013; BLACK et al., 2016).

A MALDI MS egy impulzusos lézersugár használaton alapul, amely eltalálja a mintát, amelyet a hatalmas feleslegben jelenlévő úgynevezett „mátrix” társzókristályai és az analit alkotnak. A lézere energiát a mátrix elnyeli, amely elpárolog, és érintetlen analit molekulákat szállít a gőzfázisba.

A folyamat során a mátrixból ionok (főleg H⁺ és Na⁺) szabadulnak fel, ami töltéssel rendelkező analit molekulák képződéséhez vezet. Ezenkívül anionok előállíthatók H⁺ vagy Na⁺ analitból történő elvonásával is (CAVANNA et al., 2018; MORISASA et al., 2019; CREYDT és FISCHER, 2020; STACHNIUK et al., 2021).

Az elektromos térben történő gyorsítás és a töltött rácson való áthaladás után az ionokat TOF tömeganalizátorban választják el m/z arányuk alapján (a kis tömegű ionok rövidebb idő alatt érkeznek a detektorba, mint a nagy tömegű ionok). A TOF analizátorok „lineáris” geometriáját használják nagy molekulatömegű molekulák elemzésére. Kisebb molekulák elemezhetőek egy „reflektron” konfigurációval, amely képes kiegyensúlyozni a különböző kezdeti értékeket az ionok sebességét a párologtatási folyamat során, ami a felbontás következetes javulásához vezet. A MALDI tömegspektrométerek képesek gyorsan spektrumot, profilt és/vagy ujjlenyomatokat generálni élelmiszer-mátrixokból, gyakran egyszerű előkészítéssel vagy egyáltalán nem kell mintát készíteni. A munkák nagy része az élelmiszerek minőségének értékelésére és a hamisítások felderítésére irányult, a földrajzi eredet vizsgálatára pedig csak néhány alkalmazás irányult (ZAMBONIN, 2021).

3.6.Növényi vizsgálatok MALDI-TOF módszerrel

3.6.1. MALDI-TOF gabona vizsgálat módszere

A szárazság egy abiotikus stressz, amely erősen befolyásolja a növények növekedését, fejlődését és termelékenységét. A proteomikai vizsgálatok lehetővé teszik a víz-stressz válasz komplex mechanizmusának azonosítását. A cél ennek a körülménynek a kutatás a búza (*Triticum durum*) proteomváltozásainak elemzése során, stressz körülmények között, súlyos vízhiányos kezelést alkalmazva 7 napig. A stressz által kiváltott proteomváltozásokat a kétdimenziós gélelektroforézis a repülési tömegspektrometria mátrix-asszisztált lézerteszorpciós ionizációs rendszerrel (MALDI-TOF-MS) egyaránt vizsgálhatók. 36 fehérjefolt volt reprodukálható, mely szignifikáns változást mutatott a kontroll és a kezelt minták között. Az azonosítás ésszerű következményei az aszályra adott válaszreakcióban keresendők, ha fehérjéről van szó (DUPONT és ALTENBACH., 2003; CARUSO et al., 2009).

A szárazság ma is releváns probléma az egész világon, különösen a száraz és félszáraz területeken. Valójában a világ felszínének egyharmada száraz, de az Egyesült Államok Nemzeti Légkörkutató Központjának becslése szerint az aszályos szárazföldi területek százaléka megduplázódik a 2000-es évekre vége (JUHÁSZ et al., 2020).

A vízhiánynak óriási gazdasági hatása van, elsősorban a mezőgazdasági termelést érinti. A vízhiánnyal kapcsolatos hatások magukban foglalják növények növekedését és fejlődését, ami körülbelül 50%-os veszteséget okozhat (KREPS et al., 2002).

Általában a növények a kedvezőtlen növekedési feltételek melletti túlélés érdekében tartósítják homeosztázisukat, a káros elemek méregtelenítését végzik, illetve a növekedés helyreállításának számos fiziológiai és molekuláris szintű válaszának kifejlesztéséért felelnek (XING et al., 2002; HASEGAWA et al., 2000, SKYLAS et al., 2000).

A cél egy összehasonlítás elvégzése volt, azaz egy proteomikai megközelítésű vizsgálat, kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézisen (2D-PAGE) és mátrix-asszisztált lézeres deszorpció/ionizációs idő repülési tömegspektrometria (MALDI-TOF MS) segítségével. A szárazsággal összefüggő fehérjék azonosítását a búzában végezték el (*Triticum durum* cv. *Ofanto*). Ennek során súlyos vízhiány kezelést alkalmaztak, valódi éghajlatot szimuláltak, magas hőmérséklet és alacsony csapadék esetén hosszú ideig meghosszabbítva a szárazságot. Ez a kontextus erős változásokat idézett elő fiziológiai és molekuláris szinten, mert a fehérje kifejezési mintákat nem csak a nedvesség, hanem a stressz súlyossága, mértéke és ideje is befolyásolja (BRAY, 1997).

Az eredmények olyan új betekintést nyújtottak, amelyek a jobb megértéséhez vezethetnek. A növények szárazságérzékenységének molekuláris alapja van. Ezért a kapott adatok arra utalhatnak, hogy fontossá vált a szárazságtűrő búzafajták fejlesztése a szárazföldi mezőgazdasági termelés érdekében, továbbá az azonosított fehérjék kulcsszerepet játszanak a glikolízisben és a glükoneogenezisben (JACKSON et al., 1983; SKYLAS et al., 2001).

A nagy molekulatömegű glutenin alegységek (HMW-GS) 60 csíraplazmából állnak. Összesen 30 közös búzafajtát és 30 rokon fajt különítettek el, és az elválasztási sorozat jellemzi/befolyásolja az alkalmazott módszereket, beleértve a nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE), fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfiát (RP-HPLC), nagy teljesítményű kapilláris elektroforézist (HPCE) és mátrix-asszisztált lézeres deszorpció/ionizációs repülési idő tömegspektrometriát (MALDI-TOF-MS). Az összehasonlító elemzés kimutatta, hogy minden módszertannak megvannak a maga előnyei és hátrányai. Az SDS-PAGE fő hátránya az volt, hogy túlbecsülte molekulatömeget és helytelenül azonosított azokat az alacsony felbontása miatt. Azonban előnye volt a műszaki egyszerűség és a berendezések könnyű kezelhetősége; így alkalmas a

nagyszabású és nagy áteresztőképességű HMW-GS szűrés a tenyésztési programokhoz, különösen akkor, ha a glutenin összetétele egyértelmű a tenyész-anyagban.

A MALDI-TOF-MS (ZHANG et al., 2008) használata egyértelműen sok technikai előnnyel jár, a négy értékelt módszer között a legfejlettebb, jellemzője a nagy áteresztőképesség, nagy felbontás, és pontosság; ez azonban magas felszerelési költséggel járt, ami sok tenyésztést végző vállalatot megakadályozott abban, hogy a hozzájussanak a technológiához (GAO et al., 2010).

A búzaglutén fehérjék részletes jellemzését és azonosítását a kanadai kemény vörös tavaszi búza Teal fajtánál végezték el. RP-HPLC a minta szétválasztásakor 35 frakcióra csökkentette a spektrális komplexitást; ezt követte a MALDI-TOF tömegspektrometria (MS), amely hat vagy kevesebb feloldott fehérje jelenlétét mutatta ki a 20 kDa feletti komponensek mindegyik RP-HPLC-frakciójában, így összesen 93 MS-feloldott csúcsot kaptak. A hiányos búza DNS-adatbázisok miatt sok búzaglutén fehérjét nem lehetett azonosítani. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az RP-HPLC kombinációja, valamint az MS és az MS/MS technikák ígéretes megközelítés nyújthatnak a búzaglutén fehérjék jellemzéséhez (QIAN et al., 2008).

A búzában található glutén (tároló) fehérjék felelősek az egyedi viszkozelasztikus tulajdonságok átadásáért, amelyek lehetővé teszik a kovász előállítását a kenyér, tészta, és tésztához kapcsolódó termékek esetében. Az érintett fehérje fő csoportjai közé tartoznak a monomerek (gliadinek) és a láncközi diszulfidkötésből álló polimer (gluteninek), ezen belül az alacsony molekulatömegű (LMW) és nagy molekulatömegű (HMW) glutenin alegységek (MACRITCHIE, 1992).

A búzatároló fehérjék proteomikai elemzésével kapcsolatban számos nehézség merült fel, beleértve a korlátozott számú elérhető adatbázist, a korlátozott számú maradékanyagokat (különösen az LMW glutenin alegységeiben), a homológ fehérjék halmazainak jelenlétéből adódó komplexitást, valamint az ismétlődő fehérjék motívumainak jelenlétét. A korábbi tanulmányok megállapították, hogy a MALDI-TOF MS képes megadni a búza gliadinek és glutenin alegységeinek pontos számát (GODOVAC-ZIMMERMANN és BROWN., 2001). A tisztított HMW alegységek MALDI-MS-vizsgálata a cDNS-ükkel összhangban lévő molekulatömeg-meghatározást eredményezett származtatott aminosavszekvencia esetében.

Az eredmények azt mutatták, hogy az RP-HPLC MALDI tömegspektrometriával (MS) kombinálva képes hatékonyan felmérni a búza gluténfehérjéinek összetettségét, és észszerűen pontos tömegfeladatokat biztosít.

Elemzéssel kombinálva a MALDI-TOF által végzett triptikus emésztések esetében ez a megközelítés is lehetőséget mutat specifikus HMW és az LMW glutenin alegységek azonosítására, amelyek a búzafeldolgozás minőségének elsődleges meghatározói. Az MS/MS mérésekből származó szekvencia adatok felhasználása nagyon értékes lehet, és esetenként elengedhetetlen, hogy javítsa a magabiztosságot a fehérje beosztásában. Ez a megközelítés jelenleg gátolja a gluténfehérjét a gluténhez rendelkezésre álló DNS-szekvenciák hiánya miatt, továbbá a fehérje arginin és a lizin tartalma viszonylag alacsony szintű ezekben a fehérjékben. Főleg nagy peptidek termelődnek, és a szekvenciák közötti szoros hasonlóságért felelnek ezen alegységek csoportjai.

A mátrix-asszisztált lézer deszorpciós ionizációs módszernél (MALDI-TOF) tömegspektrometriát alkalmaztak (MS) a búzával kapcsolatos baktérium-izolátumok sokféleségének felmérésére. Nem sterilen termesztett búzanövények esetében üvegházi körülmények között vermikulitot használtak a baktériumok izolálására. A taxonómiai azonosítás és a filogenetikai rekonstrukció a 16S rRNS génszekvenciákon alapult; *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* és *Curtobacterium* jelenléte volt megfigyelhető.

A szekvenciaelemzések összehangban voltak a tömegspektrum-profilból származó klaszterizációval. Ezenkívül a MALDI-TOF teljes sejttömeg-profilozást tett lehetővé az izolátumok finomabb megkülönböztetésének céljából, ami arra utal, hogy ez a technika képes a baktériumizolátumok törzsszintű differenciálására (STETS et al., 2013).

A búza a második legfontosabb növény, a világ 651,6 millió tonnás termelésével (2010/2011) (USDA, 2011). Számos búzanövényekkel kapcsolatos baktériumot azonosítottak már, összpontosítva az úgynevezett növényi növekedést elősegítő baktériumokra (GOTTLIEB et al., 2002; PARK et al., 2005), amelyek potenciálisan növelik a növények növekedését és a növénytermesztést (ADESEMOYE et al., 2010; LADE et al., 2018). A sokféleség megértése és a növényi baktérium asszociációk fontossága a jövőbeni biotechnológiai alkalmazások szempontjából fontos. Ha ezeket az asszociációkat manipulálni kell a növénytermesztés növelése érdekében, a biológiai sokféleség megőrzése és fenntartása válik elsődlegessé.

A MALDI-TOF MS-t széles körben alkalmazták azonosításra klinikai izolátumok vizsgálatokor, a referencia patogén törzsek átfogó spektrumadatbázisainak felhasználásával. A szabadalmaztatott szoftvereket ezután használva kereshetővé válnak az adatbázisban a hozzárendelendő klinikai izolátumok taxonómiai csúcslistái.

Ennek a technológiának a környezettanulmányokban való alkalmazása is folyamatban van. FERREIRA et al. 2011-ben megmutatták, hogy a MALDI-TOF profilozás felhasználható a Rhizobiaceae család fajainak megkülönböztetésére. A programot, a Biotyper-t (Bruker Daltonics) hozták létre, mely egy adatbázis az eredetileg 56 profilból gyorsan növekvő rhizobia fajok adataival, melyekkel így azonosítani tudták az újabb izolációkat.

A MALDI-TOF tömegspektrometria lehetséges szövődményei a baktériumok növekedési körülményeit, a mintafeldolgozást és az adatokat profiláló olyan felvétel, amely jelentősen befolyásolhatja a kapott tömegspektrumokat (LIU et al., 2007). Különböző környezeti feltételek, például tenyésztő táptalajként különböző eredményeket produkálhatnak, a változást bakteriális anyagcsere okozhatja (RAJAKARUNA et al., 2009; KEYS et al., 2004).

A környezeti baktériumok azonosítása óriási kihívást jelent, mivel a baktériumfajok sokfélesége a természetes környezetben nagyon magas lehet. Ezen túlmenően az ismeretlen/nem tenyésztett baktériumok aránya nagyon magas számos területen, például talaj- és növényi rizoszférák körében. Ezek a tényezők teszik lehetővé a környezeti baktériumok taxonómiai azonosítását a teljes sejtes MALDI-TOF MS segítségével. A spektrumok keresésén alapuló szabványos technika alkalmazásával a referencia törzsek adatbázisa jelenleg nehezen nyomkövethető. Az izolátumokból származó spektrumok hierarchikus klaszterezése azonban azt jelenti, hogy létezik alternatíva a dereplikációra és a környezeti izolátumok azonosítására (DIECKMANN et al., 2005; GHYSELINCK et al., 2011).

A MALDI-TOF MS analízis nagy felbontása lehetővé teszi az izolátumok könyvtárainak gyors klaszterezését a reprezentatív törzsek kiválasztásához. teljes sejtes MALDI-TOF MS analízis használható, mint gyors és hatékony szűrési módszer a baktériumok csoportosítására. A környezeti mintákból izolálják az operatív taxonómiát egységeket (out), függetlenül az adatbázisoktól és a korábbi ismert taxonómiai pozícióktól. Ez a technika szekvenálással kombinálva a kiválasztott izolátumok 16S rRNS-ét alkalmazza a tenyésztőtől függően a búza gyökerekhez kapcsolódó baktériumdiverzitás elemzéséhez.

Továbbá a Gamma proteobaktériumok elterjedtségét tárja fel, a *Pseudomonas* és a *Pantoea* fő csoportjaival együtt. Ráadásul az eddig kapott eredmények megmutatták, hogy a MALDI-TOF profilozás finomabb felbontást biztosít a részleges 16S rRNS génszekvenáláshoz képest, az izolátumok faj/törzs szintjén történő megkülönböztetés során.

A búzamazag fehérjéket a kalászkok betakarítás előtt vizsgálták, hogy azonosítsák a fajtaspecifikus fehérjéket csírázó búzafajták, a Jinpum (érzékeny) és a Keumgang (rezisztens) esetében. A búzamazag fehérjéket elválasztották kétdimenziós elektroforézissel, a keletkező peptid fragmentációt pedig MALDI-TOF-MS módszer segítségével vizsgálták tovább (YAHATA et al., 2005 a; YAHATA et al., 2005 b).

A fehérjeprofilok 9 kategóriába kerültek felosztásra: anyagcsere, raktározás, fotoszintézis, aminosav, allergia, stressz, fehérjeszintézis, enzimek és hipotetikus fehérjék. A glutén két különböző komponenst tartalmaz, a nagy molekulatömegű (glutenint) alegységet és a kis molekulatömegű glutenin alegységet (gliadint). A proteomanalízis jobb megértése és a betakarítás előtti csírázás azonosítása érdekében a felelős fehérjék körében összehasonlító proteomikai elemzést végeztek a betakarítás előtti csírázó búzamazagokban, mind a fogékony, mind a rezisztens fajták között.

A MALDI-TOF módszer továbbá biztosíthatja az újabb információkat a különböző mechanizmusok vezérléséről, mint például a sütési teljesítmény, csírázás (betakarítás előtti csírázás), stressz- és betegségállóság, ami újabb utakat nyithat meg a minőség felé a búza javítása során (KAMAL et al., 2009).

3.6.2. MALDI-TOF szójabab vizsgálat módszere

A MALDI-TOF MS egy új technika, amely számos előnnyel rendelkezik az élelmiszerek elemzésben szempontjából (WANG és SPORNS, 2000).

A szójabab vagy a szójaételek nagyon fontos vegyület csoportot tartalmaznak, az izoflavonokat. Az izoflavonok étrendi bevitele csökkenti a hormonális megbetegedések a rákos megbetegedések, valamint a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásának kockázatát, enyhítik a menopauza tüneteit, mint például a hőhullámok és csontritkulás, valamint az olyan örökletes betegségek megelőzésében is segítenek, mint az autoimmun betegségek (BARNES et al., 1998, BAU et al., 2000).

A szójabab aglikonok háromféle izoflavont tartalmaznak: daidzeint, geniszteint és gliciteint, melyeknek négy kémiai formája ismert. Az élelmiszerekben található izoflavonok elemzése szükséges ahhoz, hogy segítse egészségre vonatkozó előnyeik és hatékonyságuk megértését (HERMAN et al., 2003; VERNAZA et al., 2012, ÁBRAHÁM és PEPÓ, 2021).

Manapság is gyakran használják a szójababok vizsgálatára a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát (HPLC), kromatográfiás tömegspektrometriát (GC-MS) és HPLC-vel kombinált tömegspektrometriai módszereket (MS). Ezek a technikák azonban időigényesek és a nehézkes a minta-előkészítés menete is. A MALDI-TOF MS módszert először 1987-ben vezették be, és eredetileg nem illékony, valamint nagyméretű biomolekulák vizsgálatára fejlesztették ki (KARAS et al., 1987).

A MALDI-TOF MS-nek nagy előnye a fentebb felsorolt módszerekhez képest, hogy sokkal gyorsabb elemzést biztosít, nagy érzékenységgű, széles körben alkalmazható, jó toleranciával rendelkezik a szennyező anyagokkal szemben, valamint keverékek komplex elemzésére is alkalmas. Egy MALDI-TOF MS spektrum, azaz egy mintaprofil akár percek alatt elkészülhet.

A szójabab termékek (szárított tofu, SC) feldolgozása során a hőálló mikrobiális szennyeződések sterilizálást igényelnek. Élelmiszerbiztonság figyelmen kívül hagyása és az eltarthatósági idő meghosszabbítása azonban jelentős állagkárosodást és kedvezőtlen ízt okozhat. A szekvenálási elemzés azt sugallta, hogy a *Bacillus*, *Clostridium*, *Lysinibacillus* és *Brevibacillus* okozták a fő szennyeződést. Ezenkívül összehasonlító vizsgálatot végeztek két különböző ipari SC bakteriális szennyezettségére vonatkozóan, feldolgási útvonalak feltérképezésével, életképes telepszámlálással, 16S rDNS génszekvenálással és nagy áteresztőképességű MALDI-TOF-MS alkalmazásával.

A *Staphylococcus*, *Macroccoccus*, *Psychrobacter*, *Bacillus* és *Acinetobacter* nemzetségek voltak az uralkodó nemzetségek minden félkész termékben (ZHAO et al., 2021). A szójabab fontos és népszerű étel. Ízletes gélszerű textúrája és potenciálja miatt világszerte egészségügyi előnyeiről beszélnek (PINTO et al., 2017; SERRAZANETTI et al., 2013; ZHU et al., 2016). Kínában a megfelelő gyártási folyamatokat követve, beleértve az áztatást, őrlés, forralás, koagulálás, lúgosítás, pácban párolás, ill sütés menetét is (LIU és KUO, 2013; WANG et al., 2019), szárítás után tofut készítenek belőle.

A friss és szárított tofu szennyeződése nagyon gyakori (ROSSI et al., 2016; PINTO et al., 2017), amely jelentősen befolyásolja az élelmiszerbiztonságot és az eltarthatóságot az adott termékek esetében. Hatékony, kritikus ellenőrzési stratégiát és megbízható minőséget fenntartó sterilizációs technológiára van szükség a szójabab alapú termékek gyártásakor.

Termikus és nem termikus sterilizálási technológiákat szükséges alkalmazni, beleértve kereskedelmi autokláv, γ -sugárzás és mikrohullámú kezelést, melyeket azért vezették be, hogy megbirkózzanak a nagy mennyiségű, rendkívül változatos mikroba szennyeződéssel a szója

termékekben. Mindazonáltal az összes fenti sterilizálási technológia érzékszervi károsodást eredményez nagy intenzitás esetén (HUANG és HO, 2003; HUANG és KUO, 2015).

A gépsorokon a hőálló romlást okozó baktérium szennyeződés fő forrásainak tisztázása érdekében összehasonlító vizsgálatot végeztek két feldolgozó sor között, az életképes telepek számlálása, nagy áteresztőképességű 16S rDNS génszekvenálás és mátrix-asszisztált lézeres deszorpciós/repülési ionizációs idő tömegspektrometria (MALDI-TOF-MS) segítségével. A baktériumok közötti kapcsolatot és a feldolgozó környezetet is vizsgálták.

A szójabab terméssel történő biológiai nitrogénmegkötés (BNF) valószínűleg a legfontosabb fenntartható technológia világszerte, dollármilliárdokat takarít meg az N műtrágyák terén, továbbá csökkenti a vízszennyezést és az üvegházhatású gázok kibocsátását. Ennek megfelelően a baktérium törzsek azonosítása kritikus lépést jelent azon vizsgálatokban, amelyek célja a BNF hozzájárulásának növelése. A jelenlegi azonosítási módszerek többnyire szerológián vagy DNS-profilokon alapulnak.

Azonban az antitestek előállítása kevés laboratóriumra korlátozódik, illetve a több száz izolátum DNS-profiljának beszerzése költséges és időigényes. Ezzel szemben a mátrix-asszisztált lézeres deszorpciós/ionizációs repülési idő (MALDI-TOF) MS technika remek lehetőséget jelenthet a szerológiai és DNS-alapú módszerek helyettesítésére.

A környezeti mikroorganizmusokat tartalmazó MALDI-TOF adatbázisok azonban még mindig korlátozottak, és ami a legfontosabb, aggodalomra ad okot a fehérjeprofilok hiánya. A mátrix-asszisztált lézeres deszorpciós/ionizációs repülési idő tömegspektrometria (MALDI-TOF MS) egy példa a nagy áteresztőképességű módszerekre, amely lehetővé teszi a fehérjék összehasonlítását, megkülönböztetését.

Ennek a módszernek az alapján különböző mikrobiális sejtekből nyert ujjlenyomatokkal, referencia spektrális adatokkal és különféle integrált algoritmusok segítségével kereskedelmi forgalomban érintett rendszerek működése segíthető. Az utóbbi években ezt a megközelítést egyre gyakrabban alkalmazzák számos mikroorganizmus faj fenotipizálására és azonosítására (WELKER et al., 2011). Ez egy egyszerű technika, kevés finomítást igényel a minta-előkészítés, így lehetővé teszi az azonosítást nagyszámú mikroorganizmus jelenlétében, még a komplex keverékekből származtatott minták esetében is (LAVIGNE et al., 2013).

Egy korlát azonban jelentősen befolyásolja a rendszer működését, mégpedig a környezetből származó a mikroorganizmusok vizsgálata, mivel jelenleg a rendelkezésre álló tanulmányok és adatbázisok túlnyomó többsége még csak patogén humán baktériumokkal és gombákkal kapcsolatos (FENSELAU és DEMIREV, 2001).

A legújabb kutatások rávilágítottak az új technikák használatának fontosságára, mint például a MALDI-TOF MS, mely az ökológiában és taxonómiai nagyszabású vizsgálatok elvégzését segíti. Ferreira és munkatársai kiterjesztették 56 rizobiális fajból álló MALDI Biotyper 2.0 adatbázisukat, melybe *Rhizobium*, *Ensifer* és *Shinella* nemzetségek tartoztak. Ezen kívül 35 különböző törzs forrásokból izolált, korábban azonosított törzs szekvenciát használtak alapul a MALDI-TOF MS rendszerrel új baktériumcsoportnak validálásához (FERREIRA et al., 2011, ROLIM et al., 2019).

A MALDI-TOF MS kiváló eszköz képes a gyorsan és lassan növekvő rizobia azonosítására, ezenkívül alkalmazható rizobiális izolátumok nagy populációihoz is. Különböző tanulmányok igazolják a MALDI-TOF MS hatékonyságát a különböző nemzetségbe tartozó mikroorganizmusok azonosításában; fajok, sőt alfajok szintjén is (SUAREZ et al., 2013).

A MALDI-TOF MS lehetővé tette az *N. meningitidis* izolátumok gyors tipizálását. Bebizonyították egy jól definiált adatbázis fontosságát a filogenetikai azonosításban. Továbbá MALDI-TOF MS-t használtak (SARAMIS™) az adatbázis 116 törzs spektrális profiljának betáplálásához, amelyek a főbb rizobia nemzetségeket képviselik. Megközelítésük lehetővé tette a MALDI-TOF MS hatékonyságának értékelése a rizobiális törzsek tipizálására is alkalmassá váljon a későbbiekben, pontos és nagy felbontású elemzést téve lehetővé törzsek diverzitásáról faji és gyakran alfaji szinten is (ZIEGLER et al., 2015).

Nagy előny és előrelépés a MALDI-TOF használatában, hogy az MS-sel várhatóan egyre több a baktériumot tanulmányozhattuk. Bizonyították, hogy ezen technika gyors, megfizethető és megbízható, alkalmas többek között a *Bradyrhizobium* törzsek azonosítására, kimutathatók közvetlenül a tehénborsóból (*Vigna unguiculata* L. Walp.), göbszuspenzióból, baktériumizolálás nélkül (MENNA et al., 2009).

A fajok helyes azonosítása mellett monitoring baktériumtörzsek talajba juttatása is mindig nagy kihívás volt. E vizsgálatok közül a hüvelyesek gumóiból származó törzsek azonosítása a kulcs a rizobiális versenyképesség meghatározásához.

A MALDI-TOF MS technika a statisztikai módszerekkel kiegészítve hatékonyan különböztet meg négy *Bradyrhizobium* törzset a szójában: SEMIA 587, SEMIA 5019 (29W), SEMIA 5079 (CPAC 15) és SEMIA 5080 (CPAC 7). Jelenleg Brazíliában, Dél-Amerika és Afrika országaiban kereskedelmi oltóanyagok használatosak. A megszerzett kiegészítő adatbázis fontos előre lépéseket tett lehetővé az ökológia, a szójabab-rhizobia agronómiai és ipari vizsgálati szimbiózis területén egyaránt.

3.6.3. MALDI-TOF kukorica vizsgálat módszere

A termesztett transzgenikus növények mennyisége és fajtáinak száma évről évre világszerte növekszik, a fogyasztók köre sok országból származnak, különösen Európából. A fő termesztett géntechnológiával módosított (GM) növényeket - a GM szójabab és kukorica-, úgy tervezték, hogy tolerálják a gyomirtó szereket és/vagy a kórokozó rovarokat (SHAH et al., 1986; OBERT et al., 2004). Például a Roundup Ready™ szójabab glifozáttal szembeni rezisztenciáját okozó 5-enol-piruvilsikimát-3-foszfát-szintáz (EPSPS) gént az *Agrobacterium tumefaciens* CP4-ből eredeztetik. A génszintű módosítások túlnyomórészt olyan tulajdonságokat vezetnek be, amelyek javítanak agronómiai jellemzőkön, de egyes GM-növényeknek javítják a tápérték. Ilyen például az A-pro-vitamin Golden Rice, amelyek segíthetnek az éhínség, a vakság elleni küzdelemben és a fejlődésben. Ezenkívül találkozhatunk vassal dúsított GM rizsszel is.

Megvizsgálták tömegspektrometriával (MS) az elválasztó fehérjefrakcionálás lehetőségét a Roundup Ready™ szójában és kukoricában jelenlévő transzgenikus fehérje kimutatására és jellemzésére. A géntechnológiával módosított (GM) szója és kukorica 5-enol-piruvil-sikimát-3-foszfátot tartalmazó szintáz (EPSPS) génje az *Agrobacterium tumefaciens* CP4-ből származik, amely rezisztenciát biztosít a herbicid glifozát ellen. A GM szója és kukorica proteomjait géliszűréssel frakcionálták, anioncserélő kromatográfia és nátrium-dodecilszulfát/poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) történt az MS előtt.

Ez megkönnyítette a CP4 EPSPS peptid térképének kimutatását mátrix-asszisztált lézeres deszorpciós/ionizációs repülési idő (MALDI-TOF) MS és a nanoelektrospray ionizációs kvadрупólus repülési idő (nanoESI-QTOF) MS számára (OCAÑA et al., 2007). Az azonosítás 0,9%-os génmódosított szójamagban valósult meg, ami az EU jelenlegi élelmiszer-címkézési követelmények küszöbértéke.

A fehérje fejlődését szemléltető frakcionálási és tömegspektrometriás megközelítések a CP4 EPSPS kimutatása herbicidrezisztens Roundupban Ready™ szójabab és kukorica magvak esetében. Az elemzési stratégia a GM fehérje enzimés emésztésén alapulnak és annak tömegspektrometriás azonosításán. Azonban a növekedéshez a kivonatban lévő transzgenikus fehérje létfontosságú volt, mivel a nyers kivonatokban jelenlévő fő raktározó fehérjék észlelése korlátozott. A MALDI-TOF-MS módszer méretezhető, és lehetőséget kínál más élelmiszerekhez való alkalmazkodásra mátrixokhoz vagy más, különböző GM-ekből származó transzgenikus fehérjékhez kukorica- és szójakészítményekben.

A növényekben lehetséges főként bétalainok, karotinoidok és flavonoidok előállítása. A flavonoidokat antocianinokra (antocianidinekből származó) és antoxantinokra osztják szét, ezek a flavonolok fő csoportjai. Az antocianinok kiterjedten a növényekben, különösen a gyümölcsökben és virágokban, - mint a vörös héjú szőlő, alma, cseresznye, retek, kapulin, lila káposzta, pigmentált kukorica- (kék, piros, lila) található. Ezen anyagok vizsgálata során a HPLC-vel nyert fő antocianin frakciót összegyűjtötték, majd MALDI-ToF MS-sel elemezték, amelyről kiderült, hogy gyors módszer az antocianinok azonosítására, különösen a kukorica esetében (KING és YOUNG, 1999).

Beszámoltak a kivont zeinek tömegspektrometriás elemzéséről, zsírtalanított kukoricaliszt 70%-os vizes etanollal vagy 60%-os 10 mM ditiotreitot tartalmazó acetonitriles keveréke esetében. Az elemzést a MALDI-TOF tömegspektrométer α -ciano-4-hidroxi-fahéjsav felhasználásával végezte. A módszer lehetővé tette az α -, β - és γ -zeinek kimutatását, de a δ -zeint; illetve a KWS 3381 beltenyésztett kukorica zeintartalmának elemzésére használták a kereskedelemben használt, különböző szemcseméretű liszt típusok összehasonlítását is (ȘTEFĂNESCU és BĂNCILĂ., 2017).

ADAMS W.R. et al. a B73 beltenyésztett kukoricából származó zeiniket azonosították MALDI-TOF módszerrel, a számított molekulatömegek alapján azokra az aminosavszekvenciákra következtetve, amelyekből eltávolították a szignálpeptidet (ADAMS et al., 2004).

A növényi hormonok, a citokininek olyan anyagok, amelyek elősegítik sejtosztódást és más fontos funkciókat is befolyásolnak (MILLER et al., 1995; SKOOG és ARMSTRONG, 1970). A citokinin-oxidáz/dehidrogenáz (CKO; EC 1.5.99.12) visszafordíthatatlanul lebontja a növényi citokin hormonokat.

Yarrowia élesztőben előállított rekombináns kukorica izoenzim 1 (ZmCKO1) esetében a lipolyticát enzimátikus deglikozilációnak vetették alá endoglikozidáz H-val. Spektrofotometriás vizsgálatok azt mutatták, hogy az enzim aktivitása és termostabilitása egyaránt csökkent a kezelésnél, még nem denaturáló körülmények között is, ami jelzi a ZmCKO1 biológiai jelentőségét a glikozilációban. A felszabaduló N-glikánokat grafitizált szénszorbenssel tisztították és MALDI-TOF MS módszerrel elemezték. A mért, nagy mannóz tartalmú N-glikánok szerkezete megerősítését tandem tömegspektrometriával végezték el (MS/MS), egy Q-TOF műszeren, elektropermettel ionizálással (FRANC et al., 2012).

A zeinek fontos raktározó fehérjék, jelentős szerepet játszanak a szemek szerkezetében és a feldolgozásukra gyakorolt hatásban. Van egy technika, mellyel pontosan számszerűsíthető az egyes zeinek és ezek fehérjéinek mérete. Lehetővé vált ezen fehérjék pontosabb megértése, megtudhatjuk, milyen hatással vannak a szemek szerkezetére és/vagy feldolgozásra. Ehhez mátrix-asszisztált lézer deszorpciós ionizációs repülési idő tömegspektrometriát (MALDI-TOF MS) alkalmaznak (O'KENNEDY et al., 2017).

Egy új, egyszerűsített és lerövidített zein extrakciós módszer a zein profilok jellemzésére és bármely meghatározására a lehetséges kapcsolatok felmérése a hibrdek és szüleik között. A hibrdek és a megfelelő szülői vonalak közötti kapcsolatokat genetikai variációra utalva figyelték, ekkor tudatosult, hogy a zein osztályok léteznek. Azonosított MALDI-TOF MS módszer az egyes zeinfehérjék különbségeit és a hibrdek között különbségek megfigyelését segíti. A módszer lehetőséget ad a jelenlét és a molekulaméret pontos számszerűsítésére zein fehérjék esetében, amelyek fontosak lehetnek az őrlése és a feldolgozásuk során.

A raktározó fehérjék esetében nemcsak az szemcseösszetétel meghatározásnál fontos, hanem bizonyos eljárásokban is, mint például az őrlés. Ezeknek az egyedi fehérjéknek a változása hatással lehet a feldolgozás hatékonyságára.

A zein fehérjéket eddig négy megfelelő MS módszerrel elemezték, nevezetesen mátrix-asszisztált lézeres deszorpcióval ionizációs repülési idő tömegspektrometriával (MALDI-TOF MS) (WANG et al., 2003), kapilláris elektroforézis tömegspektrometriával (CE-MS) (ERNY et al., 2007), fordított fázisú, nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás elektropermet ionizációs tömegspektrometriával (RP-HPLC-ESI MS) és nagy teljesítményű folyadék kromatográfiás repülési idő tömegspektrometriával (HPLCTOF MS). Ezek közül csak a MALDI-TOF MS-t alkalmazták sikeresen az összes főbb zein osztály kimutatására, alosztályaikkal együtt (LÓPEZ et al., 2009).

A kutatók a kukorica zeinek nagyobb felbontású megfigyelésének lehetőségével élhetnek a MALDI-TOF MS esetében, mint a hagyományos módszerekkel. Két mátrix használatával egy új, egyszerűsített zein ismerhető meg. Az extrakciós eljárás a kukorica zsírtalanításaként köthető az étkezésekhez, ennek eléréséhez emelt extrakciós hőmérsékletre nem volt szükség. Egyértelmű kapcsolatokat figyeltünk meg a hibridek és a megfelelő szülővonalai között. Zein fehérjék, melyek korábban molekuláris a zein-nómenklatúrában nem szerepeltek, innentől megfigyelhetővé váltak és hozzárendelték azokat a 10 kDa δ -zeinhez, 15 kDa β -zein és 27 kDa γ -zein osztályokhoz.

Egyértelműen megmutatható a MALDI-TOF MS használatának előnye a zein profilok kiértékelésekor, valamint az őrlési hatékonyság és élelmiszer-feldolgozás szempontjából egyaránt.

A természetes pigmentek egyik legfontosabb forrása a növényekben található. A növényekben főként bétalainok, karotinoidok és flavonoidok előállítása zajlik. A flavonoidokat antocianinokra (antocianidinekből származó) és antoxantinokra csoportosítják. Az antocianinokat, mint természetes pigmenteket vizsgálják; valamint az emberi egészségre gyakorolt jótékony hatások (antioxidáns tulajdonságok) feltérképezése a cél. Az antocianinok fő hátránya, hogy erős fény, változó hőmérséklet és pH hatására könnyen lebomlanak (MAZZA et al. 2002; WANG et al., 1997; KONCZAK és ZHANG, 2004).

A mexikói kukoricát (*Zea mays*) is gyakran vizsgálták. Ebből készített két kivonatot (hidrolizált és nem hidrolizált) elemezték HPLC-vel, különböző hőmérsékleteken. Az utolsó antocianin frakciót összegyűjtötték és elemezték MALDI-ToF MS rendszerrel is.

Összességében a 3-glükózid származékokat találtak a kivonatban. Ezek a cianidin, pelargonidin és peonidin, amelyeket a képletük összehasonlításával azonosítottak pontosan. A fő antocianin szerkezetének tisztázása érdekében fontos jelenlétük a kukorica kivonatban, ezután MALDI-ToF MS elemzések végezhetőek (GARCÍA-BENEYTEZ et al., 2003; RODRÍGUEZ és JOSÉ, 2010).

3.6.4. MALDI-TOF Napraforgó vizsgálat módszere

A növényi olajok hamisítása vagy az alacsonyabb minőségű olívaolajok használata az olajpiac általános problémáját okozza világszerte. Erre megoldás a triacilglicerinnel (TAG) profilok tömegspektrometriás lenyomatainak vizsgálata MALDI-TOF-MS segítségével. A MALDI-TOF-MS technológia statisztikai elemzéssel párosítva hasznosnak bizonyult a hamisítás kimutatására (ELLIS et al., 1995; JERGOVIĆ et al., 2017).

A MALDI-TOF-MS elemzés megfelelő a TAG profilok feltérképezéséhez különböző növényi olajok esetében, valamint speciális TAG "ujjlenyomatok" vételéhez. A módszer nagy áteresztőképességű, megbízható analitikus módszer növényi olajok ellenőrzéséhez. Ez a módszer bizonyult a leghatékonyabbnak a hamisított minták eredetétől történő megkülönböztetésekor. Egy ilyen kombinált megközelítés lehetővé tette a különböző olajkategóriák elkülönítését és hatékonyan bizonyult a hamisított keverékek kimutatásában (WEISE et al., 2012).

Azonban a MALDI-TOF MS módszerek hátránya is nyilvánvaló: a berendezés költsége jóval magasabb, mint az SDS-PAGE esetében, HPCE és RP-HPLC, amelyek potenciálisan megakadályozhatják a szaporodási programokat, hogy hozzáférjenek ehhez a technológiához (ASBURY et al., 1999).

Megvizsgálták a minőség mikrobiológiai, fizikai és kémiai paramétereit négy Bánát területéről származó bio napraforgóméző minta esetében, ezek biztonságát és antimikrobiális potenciálját mérték fel (Északkelet-Szerbia). Páratartalmat, hamut, pH-t, szabad savtartalmat, elektromos vezetőképességet, hidroximetil-furfurol tartalmat, cukortartalmat és diasztáz aktivitást mérték.

A mikrobiológiai elemzés kimutatta az aerob mezofil baktériumok, coliformok, aerob endospórák, tejsavbaktériumok (LAB), jó néhány penészgomba és élesztő jelenlétét. Az izolátum azonosítása Matriks-asszisztált lézeres deszorpció/ionizációs tömegspektrometria segítségével történt (MALDI-TOF-MS) (MILOSAVLJEVIĆ et al., 2021).

A polisavak (PA) alkalmazását sok helyen leírták olyan megfigyelések során, mint az adalékanyag és gyógyszer intermedierek vizsgálata (MOSHVERINIA et al., 2012; RODRÍGUEZ és KATIME, 2003).

Alifás polisavak szintetizálását végezték el napraforgó olajból, majd a szintetizált anyagokat Fourier-transzformációs infravörös (FTIR) spektroszkópiával, mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópiával, mátrix-asszisztált lézeres deszorpciós/ionizációs repülési idő tömegspektrometriával (MALDI-TOF-MS) és termogravimetriás analízissel jellemezték. (TGA).

Megerősítették a szintetizált polisavban jelen lévő többsavas csoportok létezését a MALDI-TOF-MS segítségével. Ez a tulajdonság a bioanyagok fejlesztésének szükségességét jelzi (ZEIMARAN et al., 2013).

A felmelegített olajból származó, nem poláris és poláris komponensek szilikagélen végzett kromatográfiás elválasztása az MS analízis előtt jelentősen javította az oxidált komponensek kimutatását. A spektrumok olyan jeleket tartalmaztak, amelyeket triacilglicerinek (TAG), diacilglicerinek (DAG) és a triacilglicerin oxidatív dimerei közé soroltak. A poláris vegyületek dúsítása megakadályozta a tömegspektrometriás ionelnyomást, így lehetővé vált a termikus oxidációból származó kisebb fajok kimutatása.

Ezen kívül ez elérhetővé tette a poláris vegyületek monitorozását az enyhe hőkezelésen átesett növényi olajokban is. Mint a hasonló kromatográfiás elválasztási módszerek, a MALDI-TOF MS analízis is gyors, érzékeny, és speciális eszköz a növényi olajok termikus oxidációjának értékelésére (PICARIELLO et al., 2009).

A triacilglicerolok fontos szerepet játszanak a táplálkozásban és a kozmetikában, de egyben számos betegség kialakulásában is.

Míg a MALDI-TOF nagyon gyors és megbízható információt nyújt a lipidminták zsírsavösszetételéről; addig a monoacilglicerolok és különösen a húgysavak esetében nehéz a megfelelő triacilglicerin molekuláris ionok kimutatása (SCHILLER et al., 2002).

Jelenleg egyre több bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy mátrix-asszisztált lézeres deszorpciós/ionizációs repülési idő tömegspektrometria (MALDI-TOF-MS) reprezentatív és kényelmes módszer a lipidanalízishez, megfelelő a keverékek elemzéséhez és a lipidek mennyiségi meghatározásához (HILLENKAMP et al., 1991; SCHILLER et al., 1999).

A klorofillok (Chls) fontos pigmentek, amelyek a kloroplasztiszok jellegzetes zöld színéért felelősek algákban és növényekben. Az 1,5-diamino-naftalin (DAN) elektrontranszfer másodlagos reakciómátrixként került bevezetésre az érintetlen klorofill származékok azonosításakor, a mátrix-asszisztált lézeres deszorpciós/ionizációs repülési idő tömegspektrometria során. A MALDI-TOF-MS képes követni az érintetlen porfirin alapú pigmentek természetes lebomlását, illetve lehetőséget biztosít az illegális növényi olajok újra zöldítési módszereinek kimutatáshoz (BENARD et al., 1999).

A DAN sikeresen használható mátrixként az érintetlen klorofillok és néhány származékuk teljes jellemzésére. A MALDI-TOF-MS a DAN segítségével képes a klorofillokot elektronnal ionizálni másodlagos átviteli reakció során, amely korlátozott energiafelesleg biztosításáért felelős a páratlan molekuláris ionok töredezettségének gyakorlatilag hiányának elkerüléséhez. A fragmentáció hiánya miatt a MALDI-TOF-MS képes követni a klorofillok természetes lebomlását, amelynek kezdeti lépései csak a demetalációt és a defitilációt képviselik. A MALDI-TOF-MS lehetőséget nyújt a feldolgozott élelmiszerekben előforduló klorofillok biotranszformációjának vizsgálatához is (BOUTAGHOU és COLE, 2012).

3.7. Új technológiák alkalmazása a MALDI-TOF vizsgálatokban

Jelenleg két analitikai rendszert használnak túlnyomórészt az LMW-GS allélek megkülönböztetésére, beleértve a nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) és a fordított fázisú, nagy teljesítményű folyadékkromatográfiát (RP-HPLC). Az LMW-GS Glu-3 lókuszaiban azonban körülbelül 30-40 variábilis génből álló többgéncsaládból állnak (CUCU et al., 2012; CALVANO et al., 2015; BRAUN és GALBÁCS, 2018).

Az LMW-GS összetétel erősen polimorf, és gyakran egy allél több fehérjéből áll; ezért gyakran nehéz pontosan azonosítani és elemezni az LMW-GS-t a jelenleg bevált módszerekkel, mivel nagyszámú expresszált alegység és átfedő mobilitásuk más fehérjékkel, például a bőséges gliadin fehérjékkel. Az LMW-GS összetételek jelenlegi elemzési módszerekkel történő meghatározásakor gyakran előforduló pontozási hibák miatt a búza minőségére vonatkozó LMW-GS variációt kevésbé hasznosítják, mint a HMW-GS-ét a búzanemesítésben. A jelenlegi nagy nemzetközi együttműködés az LMW-GS nomenklatúra rendszerének finomítására irányul (NG és BUSHUK, 1987; TATHAM et al., 1991; MARGIOTTA et al., 1993; WIESER et al., 1998; HE et al., 2005; WANG et al., 2015).

Az elmúlt években olyan új technológiákat fejlesztettek ki, mint a kétdimenziós elektroforézis (2-DE) és az N-terminális aminosavszekvenciák az LMW-GS jellemzésére és meghatározására, amelyek nagymértékben javították az LMW-GS allélek azonosításának pontosságát és felépítésük és funkcióik megértése. Ezek a technológiák azonban költségesek és alacsony áteresztőképességűek, nem alkalmasak nagyüzemi búzanemesítési programokban való alkalmazásra, amelyek nagyszámú minta precíz feldolgozását igénylik egy adott rövid idő alatt. A mátrix-asszociált lézeres deszorpciós/ionizációs repülési idő tömegspektrometria (MALDI-TOF-MS) hatékony eszköznek bizonyult a búza tartalék fehérjeelemzésére.

Nagyon pontosnak és érzékenynek tűnik, csak kis mintára van szükség (általában kevesebb, mint 1 pmol), és gyorsabb a végrehajtása (mintánként körülbelül egy percet vesz igénybe), összehasonlítva más általános elválasztási módszerekkel. A nagy áteresztőképesség különösen vonzó a gyors fajtaazonosítás lehetősége szempontjából. A legalkalmasabb nagyszámú minta rövid időn belüli kezelésére, ideális búzanemesítési programokhoz, gabonakereskedelemhez stb. LIU et al. sikeresen alkalmazta ezt a technológiát a HMW-GS allélek elemzésére, és számos új allélt azonosított régi búzafajtákból (KUSSMANN et al., 1997; ZHENG et al., 2011).

3.8. Aszálytűrés vizsgálata MALDI-TOF analízissel

Az aszály világszerte egyre nagyobb terméskiesést okoz a növénykultúrákban (KALLIS, 2008). A jövőben a globális felmelegedés, az erdőirtás és a városiasodás tovább erősíti a súlyosabb és gyakoribb aszályos időszakok tendenciáját. Ezért egyre nagyobb igény mutatkozik olyan új növények nemesítésére, amelyek stabil és magas terméshozamot biztosítanak alacsony vízellátottság mellett. A szárazságtűrés hatékony nemesítéséhez a szelekciós folyamat javítása érdekében egyszerű és könnyen kezelhető szűrőrendszerre van szükség, mivel a szántóföldi kísérletek idő- és munkaigényesek. Az in vitro szűrőrendszer alternatívaként való alkalmazását intenzíven tárgyalták, különösen a standardizált körülmények közötti nagyfokú reprodukálhatóság miatt, amely a szántóföldi kísérletekben nem érhető el (HURKMAN és TANAKA, 1988; MUNNS et al., 2006).

A napraforgó palánták szárazságtűrésének egyszerű és könnyen kezelhető in vitro szűrési rendszerét értékelték, amely polietilén-glikol 6000-rel kiegészített MS táptalajon alapul. A *Helianthus annuus L. cv. Peredovick* kontroll és szárazságstressznek kitett palántái között morfológiai és fiziológiai paramétereit hasonlították össze.

A szárazságtól sújtott növények növekedése a hipokotil hosszát, valamint a hajtások és a gyökerek friss tömegét tekintve szignifikánsan elmaradt a kontrollnövényekhez képest.

A hajtásnövekedés korlátozottabb volt, mint a gyökérnövekedés, ami a szárazságnak kitett növényeknél a gyökér/hajtás arány növekedését eredményezte. Az ozmolitok, mint például az inozitol (65-szörös), glükóz (58-szoros), prolin (55-szörös), fruktóz (11-szeres) és szacharóz (nyolcszoros) felhalmozódása a szárazságnak kitett növények leveleiben gáz-folyadék kromatográfiával kimutatható volt. A levelek oldható fehérjemintázatát 2D gélelektroforézissel (2D-PAGE) és MALDI-TOF tömegspektrometriával határozták meg (SENG, 2009).

A 46 fehérjefoltból álló készlet 19 markerfehérje azonosítását tette lehetővé. Kimutatták a szárazságstressznek kitett növények fehérjeexpressziójának mennyiségi változásait a kontrollnövényekhez képest. A szárazságnak kitett napraforgó palánták leveleiben hat fehérjét mutattak ki szignifikáns mennyiségben: feltételezett koffeoil-CoA 3-O-metiltranszferázt (4,5-szeres), egy fruktokináz-3-at (3-szoros), egy vegetatív raktározási fehérjét (2,5-szeres), egy glicinben gazdag RNS-kötő fehérjét (2,2-szeres), egy Cu-Zn-szuperoxid-dizmutázt (2,1-szeres) és egy ismeretlen alacsony molekulásúlyú fehérjét (2,3-szoros). Ezek a fehérjék a szárazsági körülmények között indukált általános stresszfehérjéket vagy az alapvető szénanyagcseréhez hozzájáruló fehérjéket képviselik. A túltermelt fehérjék érdekes jelöltek a napraforgó szárazságtűrésével kapcsolatos további fiziológiai és molekuláris vizsgálatokhoz (FULDA et al., 2011).

A napraforgó (*Helianthus annuus* L.) magvak gyorsított öregítése a csírázási arány és az összfehérje-tartalom jelentős csökkenését eredményezte. A csírázási sebesség és a fehérjetartalom közötti korrelációs index 0,937 volt. Kétdimenziós elektroforézist alkalmaztak az öregített magok embrionális fehérjéinek elkülönítésére.

Az eredmények azt mutatták, hogy néhány fehérje mennyisége, amikor 2d-ről 4d-re nőtt, felgyorsította az öregedést. Két fehérjét azonosítottak MALDI-TOF segítségével ebben a vizsgálatban. Az egyik fehérje 26,2%-os peptid egyezést mutatott az NBS4 rezisztencia gén analógjával, a másik fehérje pedig 23,5%-os peptid egyezést mutatott az NBS5 rezisztencia gén analógjával. Ezt a két fehérjét a gyorsított öregedés okozta károsodások enyhítésére lehet használni (LIU et al., 2010).

3.9. Peroxidázok kimutatása MALDI-TOF MS készülékkel

Három plazmamembránhoz kötött III. osztályú peroxidáz előfordulását mutatták ki a kukorica (*Zea mays* L.) gyökereinél (MIKA et al., 2008). Jelen munkában egy új, PM-hez kötött peroxidázt (pmPOX3) részben tisztítottunk. A hem fehérje kísérleti molekulatömege méretkizárás után 38 kDa, a tetrametilbenzidin és H₂O₂ peroxidáz szubsztrátokkal festett, nem redukáló SDS-PAGE-ban pedig 57 kDa volt. A pmPOX1, pmPOX2b és pmPOX3 glikozilációját különböző megközelítésekkel mutatták ki. A pmPOX1, pmPOX2b és pmPOX3 teljes hosszúságú szekvenciáit ESI-MS/MS és MALDI-TOF MS analízissel azonosítottuk, in silico és in vivo klónozással kombinálva.

Így közöljük a membránhoz kötött III. osztályú peroxidázok első szekvenciaanalízisét. A részleges génanalízis két vagy három intront tárt fel. Kísérleti és elméleti izoelektromos pontokat és molekulatömegeket hasonlítottunk össze. Az aminosav-szekvenciákból következtettünk a célzási szignálokra, a feltételezett fehérjeszerkezetekre és az enzimek aktív centrumának a plazmamembránon kívüli elhelyezkedésére. Más III. osztályú peroxidázokkal ellentétben úgy tűnik, hogy a pmPOX1 dimer szerkezetű. A hidrofób doménekre vonatkozó előrejelzések a szolubilizációs kísérletekkel összehasonlítva az N-terminális transzmembrán doménre utalnak az izoenzimek számára (KALÁSZ és BÁTHORI, 1995; DARMAWAN et al., 2010; MIKA et al., 2008.).

3.10. Kórokozók kimutatása MALDI-TOF MS módszerrel

A mikroorganizmusok MALDI-TOF tömegspektrometriás azonosításának folyamata a következő szekvenciákat foglalja magában: egy baktérium, gomba vagy gombaszervezet tiszta tenyészetét izoláljuk (vagy közvetlen beoltással szilárd agar táptalajon, vagy folyékony táptalajon történő tenyésztéssel; ha folyékony táptalajon tenyésztették, a telepeket pufferoldatokkal keverjük, centrifugáljuk és merítjük, a kezdeti felülúszót eltávolítjuk); a megtisztított tenyészetet felkenjük egy fémtáblás cellára (96 cellás fémtábla) és megszáritjuk; a mátrix-folyadékot felkenjük a fémtáblában lévő cellában lévő száritott tenyészetre, majd összekeverjük és megszáritjuk; a fémtáblát a berendezés formájába helyezzük. A készülék bekapcsolása után megkezdődik a lézerfény hatása a fémtáblában lévő sejtekre, és a számítógépes programban megjelenik az egyes fajokra jellemző spektrumok halmaza, amely az adott faj specifikus "ujjlenyomataként" működik (AHMAD et al., 2012; LÉVESQUE et al., 2015; HOU et al., 2019).

A program az adatbázisban rendelkezésre álló spektrumok összehasonlításával megjeleníti, hogy a minta melyik típusba tartozik. Napjainkban a MALDI-TOF tömegspektrometriás mikroorganizmus-azonosítás vezető gyártói rendszerek vezetői közé tartozik a Bruker Daltonics (USA), a Shimadzu (Japán) és a bioMérieux (Franciaország) (DINGLE és BUTLER, 2013, PATEL, 2015).

A posztgenomikus korszakban a transzkriptomikai stratégiát széles körben alkalmazták, és nagyban hozzájárult ahhoz, hogy megértsük a génexpresszió globális változásait. A transzkriptumszintű vizsgálatokhoz képest a fehérjeszintű vizsgálatok egyre fontosabbá váltak, mivel ma már jól bebizonyosodott, hogy a fehérjék közvetlenebb kapcsolatban állnak a funkcióval, és kevés az összefüggés a transzkriptum és a fehérjeszintek között (PANDEY és MANN, 2000; BENEDUZI et al., 2011; Li et al., 2011; FRANYÓ és ZUDORNÉ; 2015).

A proteomika képes feltárni az organizmusok fehérje expressziós profilját a kórokozó fertőzésekre vagy más környezeti stresszekre adott válaszként. A proteom profilok szisztémás változásainak vizsgálata hasznos lehet a vírusfertőzésekben szerepet játszó sejtfolyamatok feltárásában. A közelmúltban számos olyan proteomikai tanulmány jelent meg, amely kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézist (2-DE) és tömegspektrometriát (MS) használ, és jó áttekintést ad az adott szövetben, organelumban vagy fejlődési szakaszban jelenlévő fehérjékről. Azonban proteomikai szempontból keveset tudunk az SCMV-gazdaszervezet kölcsönhatásokról (PANDEY és MANN, 2000; PECHANOVA et al., 2010; GUO et al., 2011).

Ezzel a módszerrel először 1963-ban jelentették a cukornád-mozaikvírust (SCMV) az Egyesült Államokban, Ohio államban, de egy fontos víruskórokozó, különösen a kukoricában. A kukorica (*Zea mays* L.) az egyik legjelentősebb növényfaj, amelyet elsősorban közvetlen emberi fogyasztásra és állati takarmányozásra használnak. Ezenkívül a kukorica a biológiai kutatások fontos modellszervezete, és a teljes genomszekvenciát hivatalosan is közzétették. Jelen tanulmányunkban 2-DE és mátrix-asszisztált lézeres deszorpciós/ionizációs idő repülési tömegspektrometria (MALDI-TOF-MS/MS) alkalmazásával elemeztük a kukorica rezisztens és érzékeny genotípusainak proteomikus válaszát az SCMV fertőzésre (WU et al., 2013; GAN et al., 2010).

Az eredmények felbecsülhetetlen értékű forrást jelentenek a kórokozóválaszban szerepet játszó új fehérjék felfedezésében, és ezeknek a fehérjéknek a mezőgazdaságilag fontos fajokba történő bejuttatása rezisztens növényeket hozhat létre. Emellett elemeztük a fitohormonok változásait is az SCMV fertőzés során (BAUCOM et al. 2009).

3.11. Proteomanalízis MALDI-TOF MS módszerrel

Kukoricában néhány proteomanalízist publikáltak, például a kukoricalevél felmérését, az oldalgökök beindulásának hatását az elsődleges gyökök proteomjára, a mitokondriumok és a kloroplasztiszok proteomjait, a primer gyökök proteomja 5 nappal a csírázás után, sejtfal proteomja a primer gyökök megnyúlási zónájában, a primer gyökök összehasonlító proteomanalízise az oldalgökök beindulása előtt, a hajtás által hordozott gyökök iniciációjának proteomikai elemzése, a patogén elicitorindukált proteomikai elemzése változások a kukorica extracelluláris mátrixában.

Jelen tanulmányunkban elemeztük a fehérje expressziós profilok különbségét 5 vagy 1000 mM (kontroll) KH_2PO_4 -gyel 17 napig 2-DE-vel kezelt kukorica gyökereiben, és számos eltérően expresszáldó fehérjét azonosítottunk MALDITOF-MS-sel. Ezek az eredmények hasznosak lehetnek a növények alacsony P-tolerancia-mechanizmusának megértésében, és alapot adnának a P-éhezésre reagáló gének működésének és szabályozásának további jellemzésére (PORUBLEVA et al., 2001; HOCHHOLDINGER et al., 2003; HOCHHOLDINGER et al., 2004; LONOSKY et al., 2004; CHIVASA et al., 2005; HOCHHOLDINGER et al., 2005; ZHU et al., 2006; LIU et al., 2009; SAUER et al., 2006).

A foszfor (P) hiánya a növények növekedésének és fejlődésének fő korlátja. A növények védekezően reagálhatnak erre a stresszre, módosítva anyagcsere-útvonalait és gyökérmorfológiájukat, ami a génexpressziójuk változásával jár. A növények alacsony P adaptációs mechanizmusának jobb megértése érdekében összehasonlító proteomanalízist végeztünk 17 napig 1000 mM (kontroll) vagy 5 mM KH_2PO_4 -gyel kezelt kukoricagyökerekből izolált fehérjékre. Az eredmények azt mutatták, hogy a 2-DE géleken kimutatott fehérjék körülbelül 20%-a kétszeresére vagy csökkent foszfát (P_i) stressz hatására. 106 eltérően expresszáldó fehérjét azonosítottunk MALDITOF-MS-sel. Ezeknek a P-éhezésre reagáló fehérjéknek az elemzése arra utalt, hogy részt vesznek a fitohormon bioszintézisében, a szén- és energiaanyagcserében, a fehérjeszintézisben és a sorsban, a jelátvitelben, a sejtciklusban, a sejtszerveződésben, a védekezésben, a másodlagos anyagcserében stb. Megállapítható, hogy szerepet játszhatnak. fontos szerepet játszik a külső P_i -koncentráció változásának érzékelésében és a P_i -megvonáshoz való komplex alkalmazkodási tevékenységek szabályozásában a P-homeosztázis elősegítése érdekében. Ezzel egyidejűleg, mint alapplatform, az eredmények hasznosak lennének a génfunkciók további jellemzésére is a növényi P táplálkozásban (LI et al., 2007).

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

Felhasznált anyagok:

A vizsgálatok során alkalmazott összes anyag analitikai tisztaságú:

- 2-Propanol (iPa - HPLC tisztaságú)
- Abszolút etanol (EtOH - vízmentes, analitikai tisztaságú)
- Acetonitril (ACN - HPLC gradient grade tisztaságú)
- Metanol (MeOH - HPLC gradient grade tisztaságú)
- Grafitpor (2 - 20 μm szemcseméretű)
- Alumínium-oxid por (MS tisztításhoz)
- Ionmentes víz (Milli Q víz)
- Trifluoecetsav (TFA, 100%-os, analitikai tisztaságú)
- Hangyasav (FA - 100%-os HPLC-MS tisztaságú)
- α -ciano-4-hidroxi-fahéjsav (α -HCCA - ultra tisztaságú, MALDI mátrix)
- Sinapinic Acid (SA- ultra tisztaságú MALDI matrix)
- MALDI-TOF Kalibráló Standard (Bruker PROTEIN MIX Standard, Part.No.: 8255343)
- Nátrium-klorid (NaCl analitikai tisztaságú)
- Ditiotreitól (DL-DTT – > 99,0%, Sigma Aldrich)
- 1-Propanol (HPLC grade tisztaságú)
- Ecetsav (100 %, HPLC grade tisztaságú)

4.1. Munkaoldatok, kalibrációs oldatok

- 80 %-os (v/v %) trifluorecetsav oldat

Felhasznált labor eszközök:

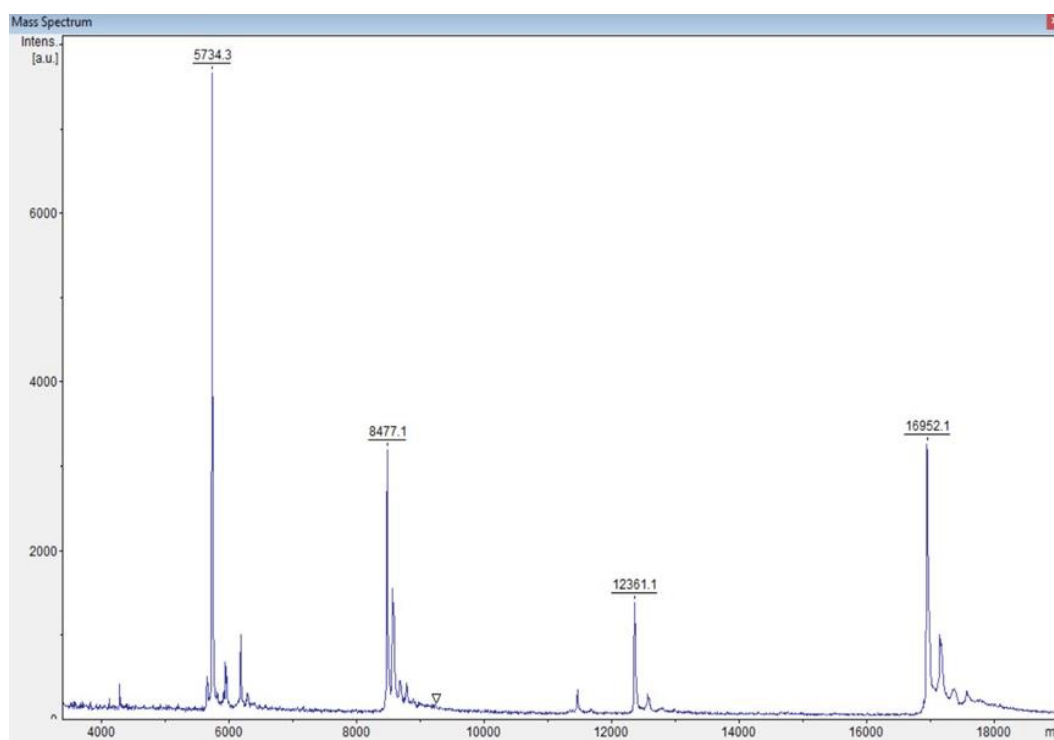
- Eppendorf csövek (térfogat: 1,5 ml és 2,0 ml)
- eppendorf csőtartó
- Centrifuga csövek (térfogat: 40 ml)
- Vízfürdős termosztát <10 <10 24 (emag)
- Analitikai mérleg (pontosság: 0,01 mg)
- Automata pipetták (0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl) +hegyek (eppendorf)
- Vortex kémcsőkeverő
- Ultrahang fürdő (emag Sonocool 255)
- Rotoros vertikális rázó gép
- Asztali centrifuga (1,5-2,0 ml-es eppendorf csövekhez)
- Ultracentrifuga (15-40 ml centrifuga csövekhez)
- MALDI MSP 96-os polírozott acél mintatartó lemez (target)
- MALDI MSP 365-os polírozott acél mintatartó lemez (target)
- RETSCH ZM 200 típusú ultra-centrifugális daráló
- Bruker Microflex LT MALDI-TOF MS készülék
- Bruker Autoflex speed MALDI-TOF-TOF MS készülék

4.1.1. Kalibráló Standard

Az analízisek során a mérési módszereket a Bruker protein mix standardjával kalibráltunk. A kalibrációs anyag, amely lefedte az elvárt mérési tömegtartományt, az 5. táblázatban feltüntetett standardokat tartalmazta, míg a kapott spektrumokat az 1. ábra szemlélteti.

5. táblázat: Kalibrációs standard oldatok összetétele

Protein Mix I	(M+H)avg
Insulin	5734.51 Da
Ubiquitin	8565.76 Da
Cytochrome C	1236.97 Da
Myoglobin	16952.30 Da



1. ábra: A Protein Mix I kalibráló standard spektrum

4.1.2. Az extrakciós módszer optimalizálása

Ahhoz, hogy minél informatívabb tömegspektrumokat kapjunk az extrakció körülményeit optimalizálnunk kell. A tartalék fehérjék oldhatóság szempontjából két fő csoportra osztják, a „vízoldható” frakcióra és az „alkohol-oldható” frakcióra, ezért az extrakcióhoz különböző extraháló elegyeket alkalmazhatunk. Ezen kívül az extrakciót több paraméter is befolyásolja (pH, ionerősség, keverési mód, extrakciós idő, extrakciós hőmérséklet, redukálószer koncentrációja), amelyeknek a hatását a módszer optimalizálása során szintén meg kell vizsgálnunk. Ehhez ismert fehérje összetételű vetőmagok átlagmintáival végzünk extrakciós kísérleteket, azért, hogy a legmegfelelőbb paramétereket tudjuk alkalmazni a valódi minták vizsgálataiban. A vízoldható frakciók extraktumainak felvitele a MALDI-TOF mintatartó lemezére (target-re) általában nem problémát (határozott formájú cseppek vihetők fel), bár a szakirodalom azt javasolja, (ide jön a szakirodalom) hogy ezeket az extraktumokat is célszerű adott összetételű acetonitril – TFA elegyre (30 % ACN – 0,6 % TFA) hígítani. Az így előállított oldat homogénebb spot-ot eredményez és javítja is a tömegspektrometriás csúcsok alakját, felbontását. Célszerű a módszer

Az alkohol oldható

a) extraháló szer anyagi minősége: Minden esetben analitikai tisztaságú vagy azzal egyenértékű volt

b) extraháló szer pH-ja:

- semleges pH (puffer nélkül);
- savas pH (pH állítás ecetsavval (1% v/v));
- enyhén bázikus pH (pH állítás TRIS pufferrel)

c) Az extraháló szer ionerőssége:

- Nátrium-klorid koncentrációja (0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 – 1,5 – 5,0 % m/v)

-A redukáló szer mennyisége:

- Ditiotreitolt (DTT): 0,0 – 0,1 – 0,2 – 0,4 – 0,8 – 1,0 % m/v

d) Az extrakciós módok:

- Ultrahanggal segített extrakció;
- Rotációs keverővel végzett extrakció;
- Rázógépen végzett extrakció

e) Az extrakció ideje:40 perc;

f) Az extrakció hőmérséklete: szobahőmérséklet: 20-24 °C.

4.1.3. Extrakciós munka oldatok

- **NaCl extraháló puffer:** egy 150 ml-es csavaros tetejű üvegbe 100 ml ionmentes vizet mértünk, majd 0,58 g NaCl-ot és 0,31 g Ditionitritolt (DL-DTT) mértünk és alaposan összekevertük.
- **NaCl savas extraháló puffer:** egy 150 ml-es csavaros tetejű üvegbe 100 ml ionmentes vizet mértünk, majd 0,58 g NaCl-ot és 0,31 g Ditionitritolt (DL-DTT) és 1 ml ecetsavat mértünk és alaposan összekevertük.
- **Propanolos extraháló puffer:** egy 150 ml-es csavaros tetejű üvegbe 50 ml 1- propanolt mértünk, hozzátettünk 47 ml ionmentes vizet, 1 ml 100%-os ecetsavat és 2g ditionitritolt (DL-DTT).
- **2-propanolos extraháló puffer:** egy 150 ml-es csavaros tetejű üvegbe 50 ml 2- propanolt mértünk, hozzátettünk 47 ml ionmentes vizet, 1 ml 100%-os ecetsavat és 2g ditionitritolt (DL-DTT).
- **60%-os EtOH:** 60 ml analitikai tisztaságú abszolút etanolt 200 ml mérőhengerben mértünk majd 40 ml ionmentes vizet mértünk rá, ezt az oldatot 150 ml-es csavaros tetejű üvegbe átöntöttünk majd alaposan összeráztuk.

A nagy minta szám miatt ezeket az oldatokat 4 vizsgálat során el is használtuk, de maximum 30 napig tárolható 4 °C-on.

4.2. Eluáló oldat

TA25 oldat: egy 150 ml-es csavaros üvegbe 25 ml acetonitrilt (ACN), 75 ml ionmentes vizet és 100 µl trifluorecetsavat mértünk, majd alaposan összekevertük.

4.3. Mátrix oldatok

Mátrix oldat HCCA: Az ionmentes vízből pipettával bemértünk 450 µl-t egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe, majd hozzá mértünk 500 µl acetonitrilt és 25 µl 100 %-os trifluorecetsavat.

Mátrix oldat SA: Az ionmentes vízből pipettával bemértünk 450 µl-t egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe, hozzá mértünk 450 µl acetonitrilt és 35 µl 100 %-os trifluorecetsavat.

4.4. Minta előkészítés

4.4.1. Mintatartó lemezek előkészítése

Ezt a tisztítási eljárást Lovász Csaba okleveles vegyészmérnök fejlesztette ki a WESSLING Hungary Kft-ben. Első lépésben a mintatartó lemezeket kell előkészíteni az alábbi módon:

A MALDI-TOF vizsgálat befejezése után, a szennyezett mintatartó lemezeket 5-10 percre 70 %-os etanolban áztattuk. Áztatás után meleg folyóvízzel lemostuk a mátrix, vagy az extraktumok maradékát, és ezt követően finom alumínium-oxid vizes szuszpenziójával átdörzsöltük a lemezeket és papírtörölő segítségével megszáritottuk.

Ezt követően 5 - 10 percre metanolba áztattuk a lemezeket, majd lamináris boksban hagytuk elpárologni a metanol maradékát, majd a lemezeket 2-propanolba mártott szálmentes törölkendővel dörzsöltük át.

Száradás után lamináris boksban, a lemezek közepére 50 ml 80 %-os trifluorecetsav oldatot pipettáztunk és fültisztító pálcika segítségével a lemezeket alaposan átdörzsöltük, majd a trifluorecetsav maradékát ionmentes vízzel mostuk le. A megszáritott lemezeket kevés grafitporral dörzsöltük át, majd a grafitpor maradékát finom ecsettel távolítottuk el. Az így előkészített mintatartó lemezeket Petri csészében tároltuk a vizsgálatok megkezdéséig.

Több MALDI-TOF vagy MALDI-TOF-TOF készüléket használó laborokban az egyszerű mosogatószer és desztillált, azaz ioncserélt vizes eljárást használják.

Első lépésben desztillált vízben áztatják 10 percig majd mosogatószert visznek fel a lemezre, ezt követően egy általános mosogató szivaccsal letörölik majd újra desztillált vízben áztatva 5 perc után szárazra törölik.

4.5. Kalibráló Standard oldat

Standard oldat

Az eljárás során, a Bruker által kiadott protokollt használtuk. A kalibráló standardoldat 1 ml-t az előkészített mintatartó lemez „A” sor valamelyik pozíciójára cseppentettük fel és hagytuk az oldószert elpárologni. Lehetőség szerint, a száradás után azonnal 1 ml mátrix oldatot (SA vagy HCCA) cseppentettünk a kalibráló standardra és lamináris boksiban hagytuk elpárologni az oldószert. A mintatartó lemezeket hagytuk megszáradni szobahőmérsékleten, és a beszáradás után készek voltak az MALDI-TOF és MALDI-TOF-TOF vizsgálatokra. Minden minta felviteléhez új pipetta hegyet használtunk, és miután a minta megszáradt a lemezen, azután lemértük a mintákat és a mátrix oldatot legfeljebb 10 percen belül.

SA mátrix készítése

SA mátrix oldat (25 mg/ml koncentrációjú): Dieckmann et al. (2008) által publikált tanulmány szerinti SA mátrix oldatot 0,6 % TFA tartalmú ioncserélt víz és ACN 1:1 arányú oldatának, valamint a kívánt 25 mg/ml koncentráció eléréséhez szükséges kristályos szinapinsavnak az összemérésével készítettük. Az oldódást vortex használatával segítettük elő. A mátrix oldat 4°C-on, fénytől védve tárolandó, a felhasználás napján célszerű frissen készíteni, legfeljebb 1 napig használható.

HCCA mátrix készítése:

Az α -HCCA mátrix oldat (20 mg/ml koncentráció): SIGNOR és ERBA (2013) által publikált tanulmány szerinti α -HCCA mátrix oldatot 5 % hangyasav tartalmú ioncserélt víz és ACN 7:3 arányú oldatának, valamint a kívánt 20 mg/ml koncentráció eléréséhez szükséges kristályos α -HCCA összemérésével készítettük. Az oldódást vortex, majd ultrahang vízfürdő használatával segítettük elő. A mátrix oldat 4°C-on fénytől védve tárolandó, a felhasználás napján célszerű frissen készíteni, legfeljebb 1-2 napig használható.

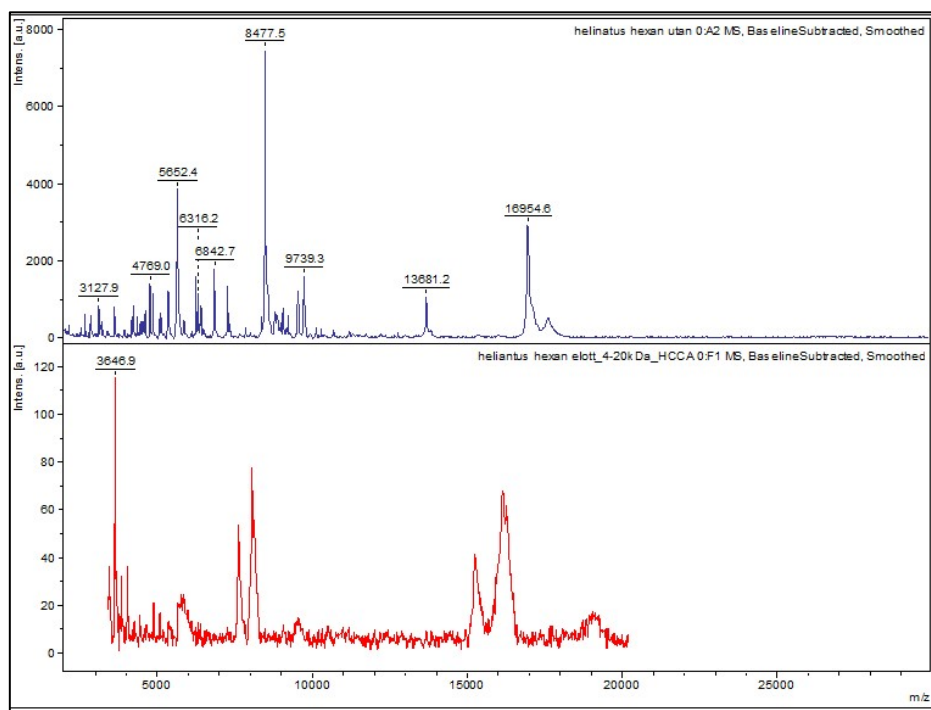
4.6. Minták fizikai előkészítése

A módszer újdonsága miatt minden egyes vetőmag tétel és növényfajtól függetlenül össz daralmányt kellett készítenünk. Növényfajtól függetlenül 20 szemet össze daráltunk, majd 1 mg-ot kivettünk egy 2ml -es eppendorf csőbe és növényfajtól függően ráértünk 500 µl extraháló szert, a szója és napraforgó esetében itt is a hexános eljárás nélkülözhetetlen volt. Erre azért volt szükség, hogy feltérképezzük, milyen biomarkereket kell kapnunk a szemenkénti vizsgálatoknál. **A szemenkénti vizsgálatokhoz azaz a homogenitás vizsgálatokhoz** a mintákat a napraforgó kaszatok estében hántolom. Minden egyes fajtánál egyesével daráltam ultracentrifugális őrlőmalommal (Retsch ZM200). Az őrleményeket 2 ml sterill eppendorfba helyeztem.

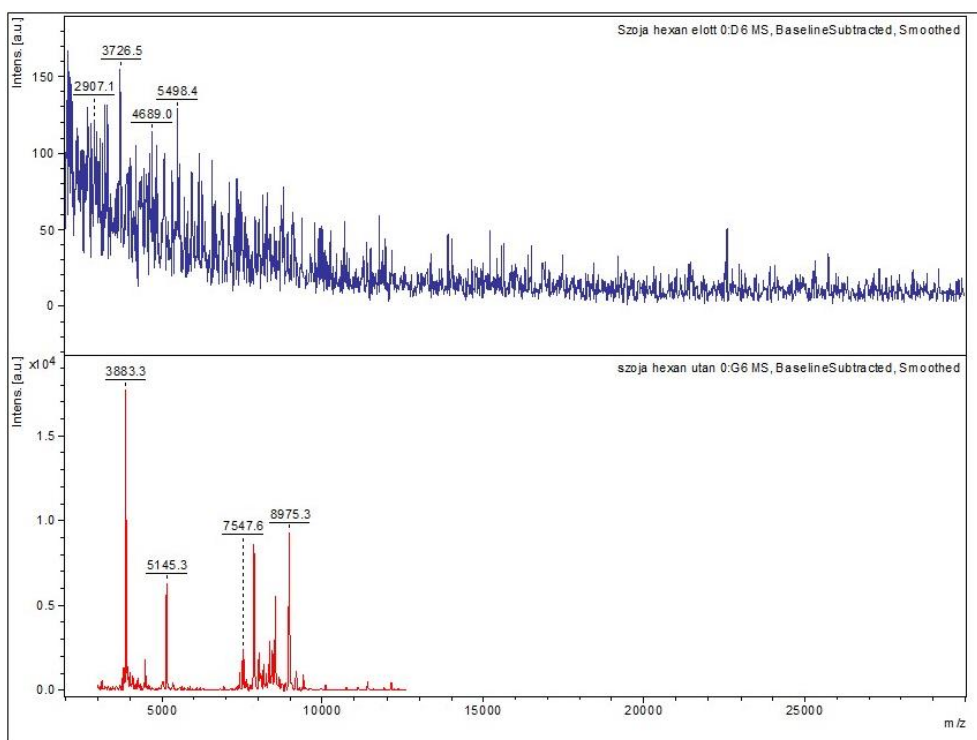
4.7. Extrakciós eljárások

4.7.1. Hexános puffer extraktumok felvitelének lépései

A napraforgó magok és szója magok esetében extrakciós eljárás előtt a megtört darált szemeket 1 ml analitikai tisztaságú hexánban áztattuk 30 percig, erre a külön eljárásra azért volt szükség mert az elő kísérleteink alapján elmondható, hogy a magas olaj és zsírtartalom befolyásolja a kapott végeredményt (2-3. ábra).



2. ábra: A napraforgó hántolt kaszatok hexános kezelése – kék spektrum előtte és piros spektrum utána



3. ábra: Szójabab hexános kezelése – kék spektrum előtte és piros spektrum utána

4.7.2. Extrakció vizes NaCl pufferrel extraktumok felvitelének lépései

A mintákat szemenként megtörtük, a mintákból megközelítőleg szemenként 10 mg-ot mértünk be egy 2,0 ml-es Eppendorf centrifugacsőbe. A darált mintákra 300 μ l NaCl-os extrahálószeret pipettáztunk és Vortexszel, megkevertük, majd 30 percre ultrahangos fürdőbe helyeztük. A NaCl-os mintákat rotoros vertikális rázógépbbe helyeztük és még 30 percig rázattuk. Az extrakció befejezése után lecentrifugáltuk (3 perc, 14100 rpm), és a felülúszóból 50 μ l-t pipettáztunk egy tiszta 1,5 ml-es új Eppendorf csőbe. A minták felvitele előtt ismét vortexszel megkevertük az extraktumot és újra lecentrifugáltuk (3 perc, 14100 rpm). Ezek után az előkészített mintatartó lemezre 1-1 μ l-t cseppentettünk két párhuzamosban mintánkként. Száradás után a felvitt mintákra 1 μ l HCCA vagy SA mátrix oldatot cseppentettünk és lamináris boksiban hagytuk elpárologni az oldószert, és megszáradni mintát.

4.7.3. Extrakció savas NaCl pufferrel extraktumok felvitelének lépései

A mintákból szemenként 10 mg-ot mértünk be egy 2,0 ml-es Eppendorf centrifugacsőbe. Ezután 300 μ l NaCl-os extrahálószeret pipettáztunk a centrifugacsővekbe. Vortexszel megkevertük, majd 30 percre ultrahangos fürdőbe helyeztük őket. Ezt követően rotoros vertikális rázógépbbe helyeztük a mintákat és még 30 percig folytattuk az extrakciót ennek az eljárásnak a befejezése után lecentrifugáltuk a mintákat (3 perc, 14100 rpm), majd a felülúszóból 50 μ l-t pipettáztunk egy tiszta 1,5 ml-es Eppendorf csőbe. Mielőtt felvittük a mintákat vortexszel alaposan megkevertem az extraktumot újra és még egyszer lecentrifugáltuk (3 perc, 14100 rcf). Ezt követően az előkészített mintatartó lemezre 1-1 μ l-t cseppentettünk két párhuzamosban mintánkként. Száradás után a mintákra HCCA vagy SA 1 μ l mátrix oldatot egyenként cseppenttem és lamináris boksban hagytam elpárologni az oldószert, beszáradni a mintát.

4.7.4. Extrakció 2-propanolos pufferrel extraktumok felvitelének lépései

A mintákból körülbelül 10 mg-ot mértem be egy 2,0 ml-es Eppendorf centrifugacsőbe. A darálmányokra 300 μ l 1-propanolos extrahálószeret pipettáztunk. Vortexszel összekevertük, majd 30 percre ultrahangos fürdőbe helyeztük. Ezután rotoros vertikális rázógépbbe helyeztük a mintákat és még 30 percig folytattuk az extrakciót, ahogy ez folyamat befejeződött lecentrifugáltuk a mintákat (3 perc, 14100 rpm), majd a felülúszóból 50 μ l-t pipettáztunk egy tiszta 1,5 ml-es Eppendorf csőbe. A felülúszó lepipettázása után, 50 μ l TA25 oldatot adtunk a mintákhoz. Ez a lépés a minta extraktum felvitele szempontjából fontos.

A tiszta 1-propanolos extraktum szétfolyik a lemezen, viszont TA25 oldattal kiegészítve a felvitel lehetségessé válik. Kísérleteinkből kiderült, ez az anyag nem befolyásolja a további eredményeket. A mintafelvitel előtt ismét vortexszel alaposan megkevertük az extraktumot és lecentrifugáltuk (3 perc, 14100 rpm).

Ezt követően az előkészített mintatartó lemezre 1- 1 μ l-t cseppentettünk két párhuzamosban mintánkként. Száradás után a mintákra 1 μ l mátrix oldatot cseppentettünk és lamináris boksban hagytuk elpárologni az oldószert, beszáradni a mintát.

4.7.5. Extrakció 1-propanolos pufferrel extraktumok felvitelének lépései

A minden egyes mintából külön-külön 10 mg-ot mértünk be külön 2,0 ml-es Eppendorf centrifugacsőbe. Ezután 300 µl 1-propanolos extrahálószerrel pipettáztunk a centrifugacsővekbe. Vortexszel alaposan megkevertük, majd 30 percre ultrahangos fürdőbe helyeztük őket. Ezután rotoros vertikális rázógépbbe helyeztük a mintákat és még 30 percig folytattuk az extrakciót. Az extrakció befejezése után lecentrifugáltuk a mintákat (3 perc, 14100 rpm), majd a felülúszóból 50 µl-t pipettáztunk egy tiszta 1,5 ml-es Eppendorf csőbe. A felülúszó lepipettázása után, 50µl TA25 oldatot adtunk a mintákhoz. Ez a lépés a minta extraktum felvitele szempontjából fontos.

A tiszta 1-propanolos extraktum szétfolyik a lemezen, viszont TA25 oldattal kiegészítve a felvitel lehetőségessé válik. Kísérleteinkből kiderült, ez az anyag nem befolyásolja a további eredményeket. A mintafelvitel előtt ismét vortexszel alaposan megkevertük az extraktumot és lecentrifugáltuk (3 perc, 14100 rpm).

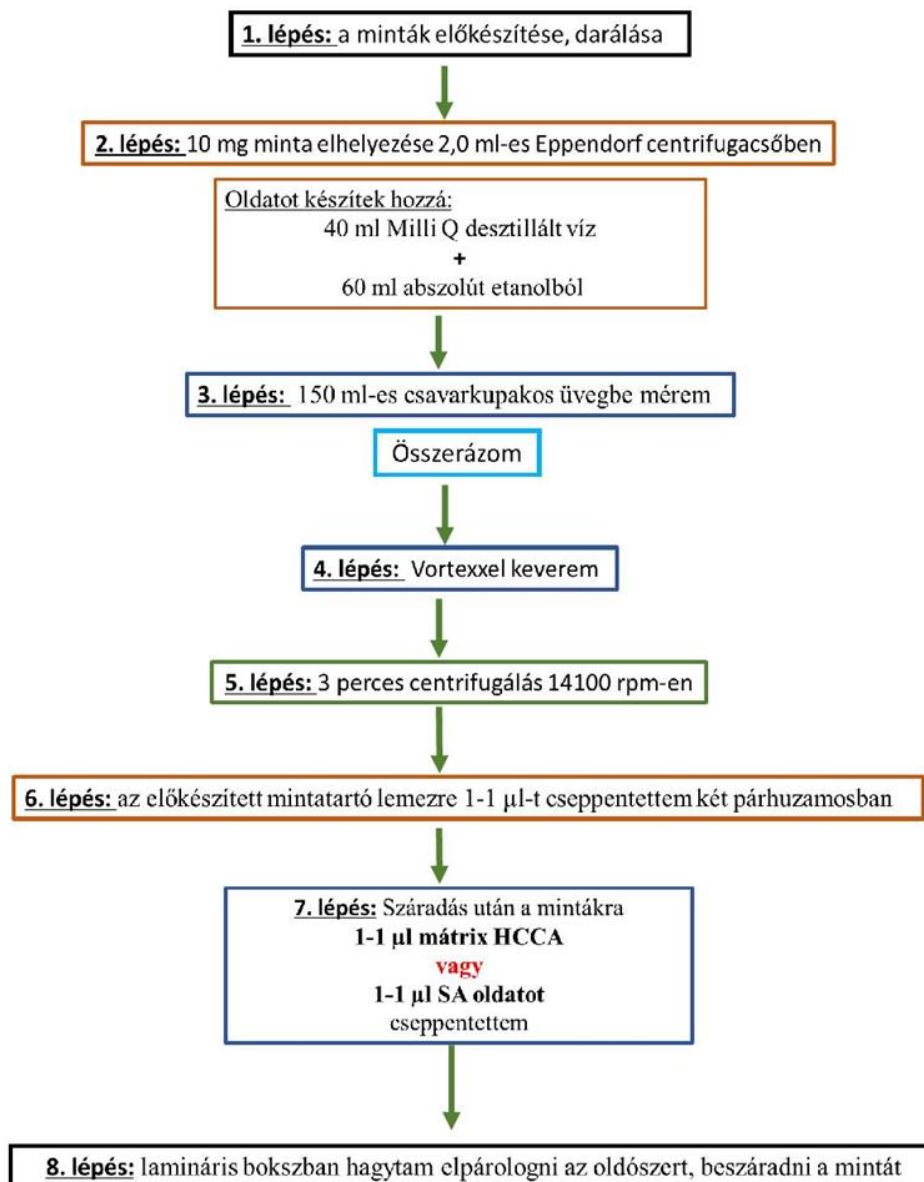
Ezt követően az előkészített mintatartó lemezre 1- 1 µl-t cseppentettünk két párhuzamosban mintánként. Száradás után a mintákra 1 µl mátrix oldatot cseppentettünk és lamináris boksban hagytuk elpárologni az oldószert, beszáradni a mintát.

4.7.6. 60%-os etanolos puffer extraktumok felvitelének lépései

A darált szemeket 2,0 ml-es Eppendorf centrifugacsőbe helyeztük. Az oldat elkészítése 40 ml Milli Q desztillált víz és 60 ml abszolút etanol 150 ml-es csavarkupakos üvegbe történő mérésével és összerázásával készült. A mintafelvitel előtt ismét vortexszel alaposan megkevertük az extraktumot és lecentrifugáltuk (3 perc, 14100 rpm).

Ezt követően az előkészített mintatartó lemezre 1- 1 µl-t cseppentettünk négy párhuzamosban mintánként. Száradás után a mintákra 1-1 µl mátrix HCCA vagy 1-1 µl SA oldatot cseppentettünk és lamináris boksban hagytuk elpárologni az oldószert, beszáradni a mintát (4. ábra).

Búza minta előkészítése 60% EtOH vizsgálathoz



4. ábra: 60% EtOH vizsgálat mintaelőkészítés folyamatábrája

4.8. Mérés

A méréshez *Bruker microflex LT* MALDI-TOF tömegspektrométert használtuk a Wessling Hungary KFT-ben. A Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszékén 2000-ben egy, a szintén Bruker cég által gyártott igen korszerű MALDI-TOF-TOF tömegspektrométer, amelynek típusa Autoflex Speed.

Az előkészített mintatartó lemezt vagy másnéven plate-t, zsiliprendszeren keresztül juttattuk az ionforrásba. A minták letapogatásához szükséges mozgatót, egy precíz mechanika végzi, amely igen pontosan tudja mozgatni a mintatartó lemezt az UV lézerforrás alatt. Egy kisfelbontású digitális kamerával nyomon is követhetjük az aktuális pozícióban lévő minta vizsgálatát. Ez egyrészt segít ellenőrizni, hogy a vizsgálat a megfelelő minta pozícióból történik, illetve az esetleges mintafelviteli inhomogenitások esetén segíti a manuális spektrum felvételt.

Egy általános műszervezrlő szoftverrel (*flexControl - Bruker Daltonik*) lehet beállítani a tömegspektrumok felvételéhez szükséges paramétereket, például a lézer energiáját, az ionok gyorsításához szükséges nagyfeszültséget, a mintatartó lemez mozgató sémáját és a vizsgált tömegszám tartományt is. Ezzel a szoftverrel végezhetjük továbbá a készülék tömegszám-skálájának kalibrációját, a repülési idők tömegszámra történő konverziójához szükséges függvény meghatározását. Az elv egyszerű, egy ismert fehérje összetételű protein mixet, mint kalibráló standardot használtam erre a célra.

A vákuum ellenőrzése után, a kalibráló pozícióra (A3) állítottuk a lézert és az automatikus spektrum felvételi módban elkészítettük a kalibráló standard átlag tömegspektrumát a 2000 – 25.000 amu (*atomic mass unit*) tömegszám tartományban, lehetőség szerint 200-500 spektrum átlagából. Zajsűrés (simítás) és alapvonal korrekció után elvégeztük a kalibrációt (a műszer megkereste a referencia tömegszámokat és a megfelelő függvényt illesztette a tömegszámokra). Ellenőriztük a referencia tömegszámok eltérését, és akkor fogadtuk el a kalibrációt, ha minden tömegszám esetén az eltérés kisebb volt, mint 500 ppm.

4.8.1. Saját method fájlok automatizált méréshez

A kukorica vetőmagok genetikai homogenitás vizsgálatához az */csilla/MBT_FC_Kukorica_14526.par* nevezetű módszer fájlt használtuk. A készülék a mintapozíciókon automatikusan haladt végig és közben a szoftver elvégezte a tömegspektrumok felvételét.

A napraforgó vetőmagok genetikai homogenitás vizsgálatához az */csilla/MBT_FC_napraforgo_14476.par* nevezetű módszer fájlt használtuk. A készülék a mintapozíciókon automatikusan haladt végig és közben a szoftver elvégezte a tömegspektrumok felvételét.

A szójabab vetőmagok genetikai homogenitás vizsgálatához az */csilla/MBT_FC_szoja_14852.par* nevezetű módszer fájlt használtuk. A készülék a mintapozíciókon automatikusan haladt végig és közben a szoftver elvégezte a tömegspektrumok felvételét.

A búza vetőmagok genetikai homogenitás vizsgálatához az */csilla/MBT_FC_buza_14999.par* nevezetű módszer fájlt használtuk. A készülék a mintapozíciókon automatikusan haladt végig és közben a szoftver elvégezte a tömegspektrumok felvételét.

4.9. Alkalmazott módszerek

4.9.1. SPSS

A kiértékelésekhez az adatokat Microsoft Excel táblázat segítségével összesítettük, majd ábráztuk, míg a statisztikai kiértékeléseket az SPSS v13.0 programmal végeztük.

A statisztikai vizsgálatot R 4.1.3. statisztikai környezetben (HTTP7) RStudio (HTTP6) grafikus felülettel, "agricolae" csomagok felhasználásával végeztük.

A grafikonok Microsoft Excel 2019 programmal készültek. A statisztikai vizsgálat során az elsőfajú hibát 5%-nak választottuk meg ($\alpha = 0,05$). Az extrahálószer M/Z értékekre gyakorolt hatásának vizsgálatára ismételt mérési modellt (repeated measure analysis of variance) alkottunk HUZSVAI és BALOGH (2015) példája alapján. Az ismételt mérési modell szintaxisa R statisztikai környezetben:

```
modell<- aov(M/Z~Extrahálószer+Error(minta_azonosító/Extrahálószer),
data=forrás_adatbázis)
summary(modell)
```

A mért M/Z adatok középérték összehasonlítását legkisebb szignifikáns különbség (least significant difference - LSD) módszerével végeztük, amelyben meghatároztuk a legkisebb szignifikáns különbséget R statisztikai környezetben az ismételt mérési modell minden egyes megadni, amelyet a következő szintaxissal végeztük minden modellre külön-külön post hoc tesztjéhez a szabadsági fokokat (df) és a négyzetösszeg hibákat (MSE) egyedileg kell (HUZSVAI és BALOGH, 2015):

```
df=df.residual(modell$"hiba:hiba")
mse=deviance(modell$"hiba:hiba")/df
LSD <- with(adatbázis, LSD.test(M/Z, modelltől_a_szignifikáns_hatás, df, mse, console = T))
```

5. EREDMÉNYEK

5.1. A MALDI-TOF vizsgálatok eredményeinek értékelése

A FelxAnalysis szoftverrel lehetőségünk nyílt egyesével megtekinteni a különböző növényfajok magjainak mintáiból készült tömegspektrumokat. Miután beolvastuk a spektrumokat, egy általunk kidolgozott módszerfájlal elvégeztük a zajsűrést és az alapvonal korrekciót. Bár a készülék egy mintából 640 tömegspektrumot készített és átlagolt, az elkészült spektrumok intenzitása teljesen eltérő volt. Ez a különbség abból ered, hogy az extrakcióhoz bemért mintarészek nem azonos mennyiségben tartalmazták a különböző tartalék fehérjéket, melyeket vizsgáltunk.

A genetikai homogenitás vizsgálatokhoz minden esetben fel kell térképezni a jellemző fehérjéket, ezért ilyenkor több szem átlagmintáiból készítünk extraktumokat és ezeket visszük fel a mintatartó lemezre, majd elvégezzük a mérést, hogy vizsgálni tudjuk milyen spektrum görbék jellemzőek az adott tételekre. Ezáltal lehetőségünk nyílt megtalálni az ún. marker fehérjéket, amelyek jellemzően kimutathatóak a különböző tételekben. Általában ezek egymáshoz közeli tömegszámú csúcspároként jelentek meg a tételek tömegspektrumaiban. A markerfehérje kiválasztása után a fajtából készített extraktumok tömegspektrumait vizsgáltam és kerestem a markerfehérjék jelenlétét. Amennyiben a kiválasztott marker csúcsok jelen voltak a spektrumban, akkor azt a fajtát genetikailag homogénnek tekintettem.

Minőség ellenőrzés céljából minden extraktumból két párhuzamos vizsgálatot végeztem. A „hibás”, genetikailag nem tiszta hibrid fajta szemeiből készített extraktumok vizsgálatát többször is megismételtem és csak utána fogadtam el a végleges eredményt.

Továbbá a minták extraktumait hűtőszekrényben tároltam 4 °C-on, mert a tapasztalataim alapján az extraktumok így legalább 1 hónapig megőrzik a minőségüket. Az eltarthatóságot folyamatosan vizsgáltam és az eredményeket táblázatban foglaltam össze A 6-9. táblázatokból jól látható, hogy a kukorica (*Zea mays*), a szója [*Glycine max* (L.) Merr.] és a búza (*Triticum aestivum*) esetében nem csökkent 90% alá, míg a napraforgónál (*Heliantus annuus*) nem haladta meg a 4%-os csökkenést 1 hónap letelte után.

6. táblázat: A kukorica (*Zea mays*) minták extraktumainak eltarthatósága (%)

4 °C-on 1 hónapig

<i>Zea mays</i> 1-206	100%
<i>Zea mays</i> 2-89	100%
<i>Zea mays</i> 3-236	100%
<i>Zea mays</i> 4-167	95%
<i>Zea mays</i> 5-137	93%
<i>Zea mays</i> 6-99	100%
<i>Zea mays</i> 7-125-15	100%
<i>Zea mays</i> 8-103-15.4	100%
<i>Zea mays</i> 9-169-15.25	100%
<i>Zea mays</i> 10-165-15	99%

7. táblázat: A szója (*Glycine max* (L.) Merr.) minták extraktumainak eltarthatósága (%)

4 °C-on 1 hónapig

<i>Glycine max</i> (L.) Merr.1- 1	100%
<i>Glycine max</i> (L.) Merr. 2-2	100%
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.3-78-16	100%
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.4-4	100%
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.5-5	98%
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.6-169	98%
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.7-58.59	100%
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.8- mentor	91%
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.9- Elio5-16	100%
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.10-keveret	100%

8. táblázat: A napraforgó (*Heliantus annus*) minták extraktumainak eltarthatósága (%)

4 °C-on 1 hónapig

<i>Heliantus annus</i> 1-Sun 1	96%
<i>Heliantus annus</i> 2-33tetel sun	98%
<i>Heliantus annus</i> 3-8tetel	100%
<i>Heliantus annus</i> 105-15	100%
<i>Heliantus annus</i> 5-sun.2018.10.11	97%
<i>Heliantus annus</i> 6-122-15	100%
<i>Heliantus annus</i> 7-F1	99%
<i>Heliantus annus</i> 8- 7 new	100%
<i>Heliantus annus</i> 9-9new	99%
<i>Heliantus annus</i> 10-10_SA	99%

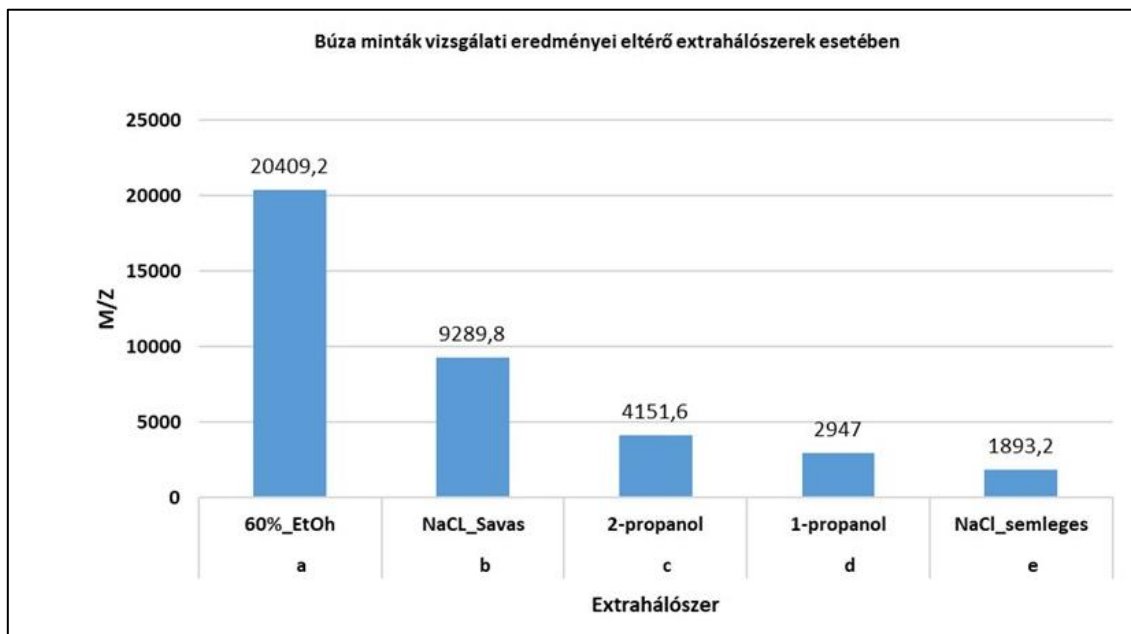
9. táblázat: A búza (*Triticum aestivum*) minták extraktumainak eltarthatósága (%)

4 °C-on 1 hónapig

<i>Triticum aestivum</i> 1-h7	100%
<i>Triticum aestivum</i> 2-F2	100%
<i>Triticum aestivum</i> 3-20tetel Buza	100%
<i>Triticum aestivum</i> 4-4tetel Buza	98%
<i>Triticum aestivum</i> 5-21	100%
<i>Triticum aestivum</i> 6- 10tetel Buza	97%
<i>Triticum aestivum</i> 7-balibuza	100%
<i>Triticum aestivum</i> 8-h2	100%
<i>Triticum aestivum</i> - 9 9tetel Buza	100%
<i>Triticum aestivum</i> 10-h22	97%

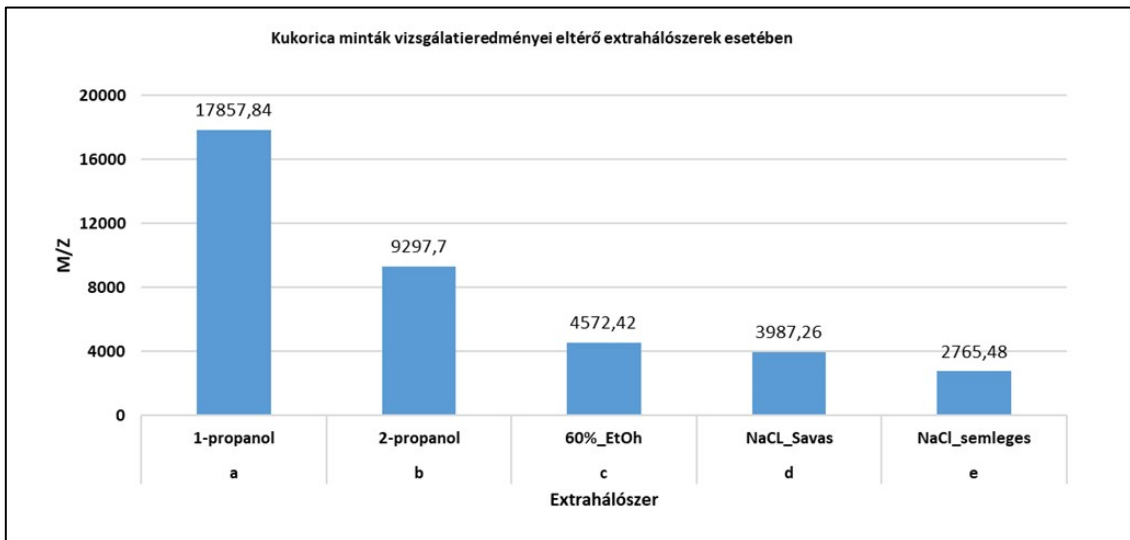
5.2. Az extraháló szerek kiválasztása spektrumok alapján, a vizsgált növényfajoknál

A búza minták esetében azt tapasztaltuk, hogy a legnagyobb M/Z értéket (20409,2) a 60%-os EtOH, a legkisebbet pedig a NaCl izoláló (1893,2) adta, de jelentősen különböztek a többi három izolálóval kapott M/Z értékek is, melyek esetében LSD_{5%}-on vizsgálva szignifikánsan ($p < 0,05$) gyengébb spektrum eredményeket adtak a 60% EtOH extrahálószerhez viszonyítva (5. ábra).



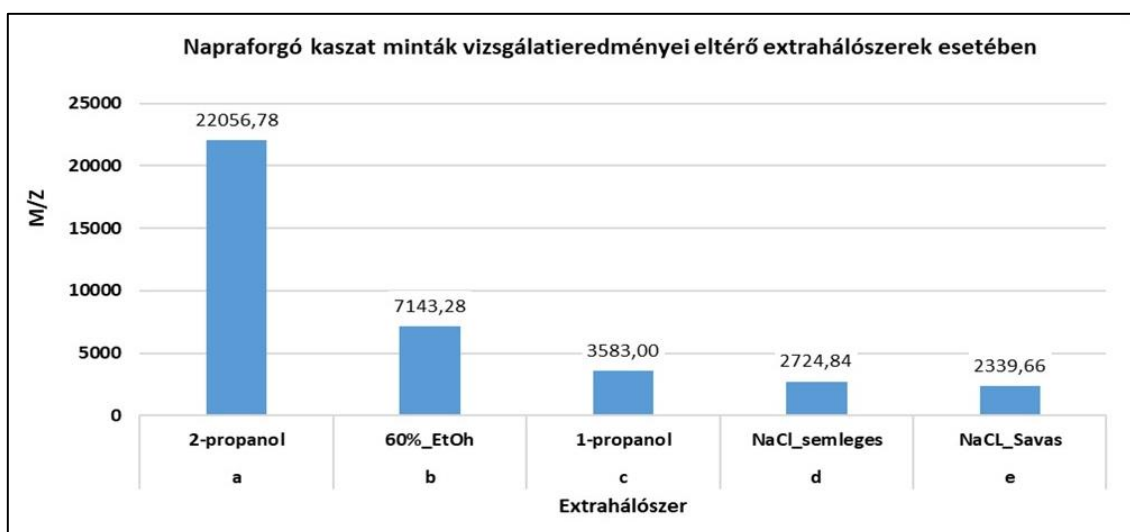
5. ábra: Búza minták tartalékfehérjéinek M/Z értékei eltérő extrahálószeres alkalmazása esetében

Hasonló tendenciát figyeltünk meg a kukorica mintáknál is, de ezeknél a NaCl savas és semleges izolálók adták a legalacsonyabb (3987,26 és 2765,48) és szinte azonos M/Z értékeket. LSD_{5%}-on vizsgálva megállapítottuk, hogy 1-propanol szignifikánsan ($p < 0,05$) a legjobb M/Z eredményt adta (17857,84) a kukorica esetében a 60% EtOH, illetve a NaCl savas és NaCl semleges extrahálószer spektrumaihoz viszonyítva (6. ábra).



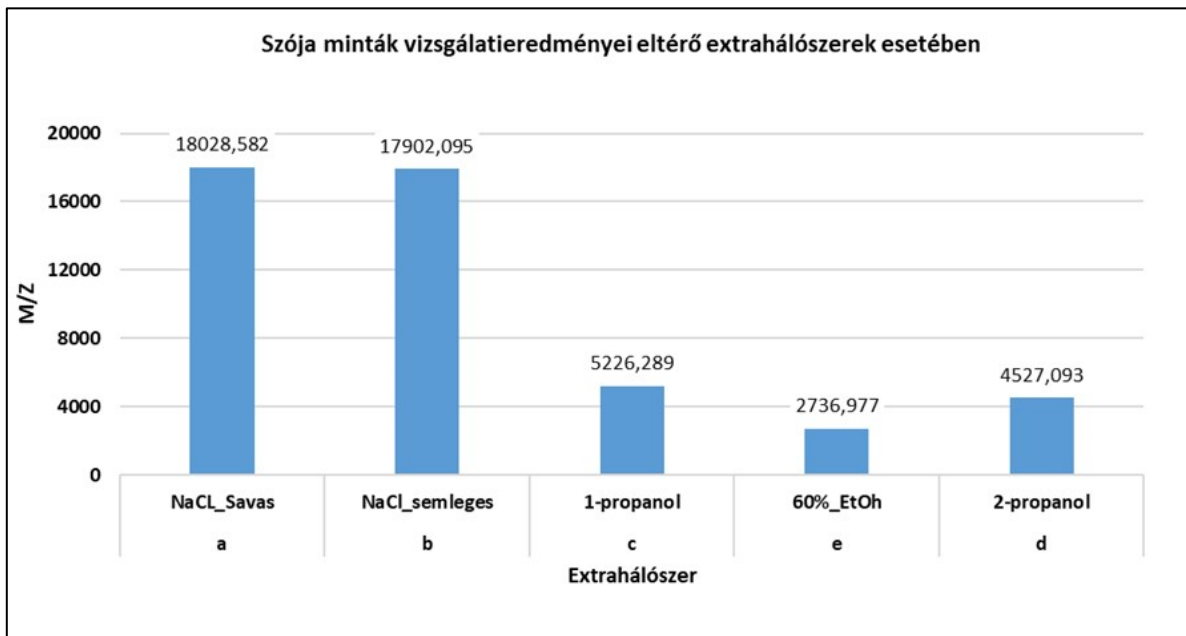
6. ábra: Kukorica minták tartalékfehérjének M/Z értékei eltérő extrahálószer esetében

A napraforgó kaszalminták esetében az öt extrahálószer közül a 2-propanolos izoláló adta a legjobb M/Z értéket (22056,78), melyet LSD_{5%}-on vizsgálva szignifikánsan ($p < 0,05$) is eltért a 60% EtOH, 1-propanol, NaCl semleges és NaCl savas izoláló szerekhez viszonyítva (7. ábra). Ebből is látható, hogy nem minden extrahálószer alkalmas az adott növényfaj elemzésére.



7. ábra: Napraforgó kaszat minták tartalékfehérjének M/Z értékei eltérő extrahálószer esetében

A szója mintáknál mind a NaCl savas, mind pedig a NaCl semleges izolálók után magas M/Z értékeket kaptunk (18028 és 17902), míg az 1-propanol és a 2-propanol, valamint 60% EtOH szignifikánsan a legalacsonyabb ($p < 0,05$) M/Z értékeket adták a két NaCl extrahálószerhez viszonyítva (LSD_{5%}-on vizsgálva) (8. ábra).

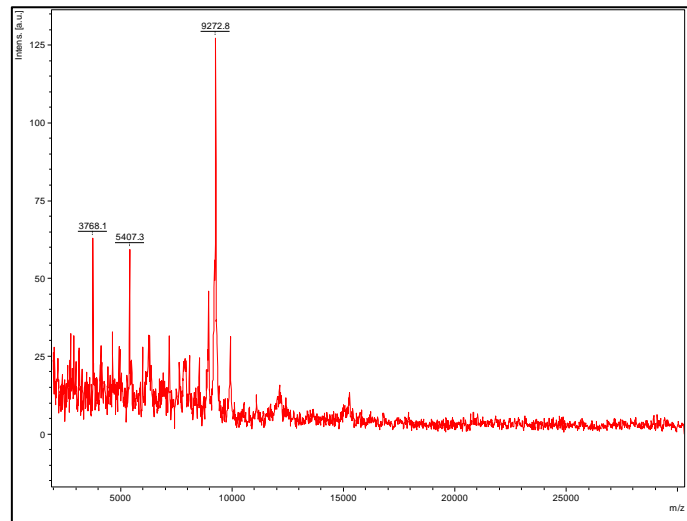


8. ábra: Szója minta vizsgálati eredménye eltérő extrahálószeres esetén

5.3. Az extrahálószerrek hatásai a tömegspektrumokra

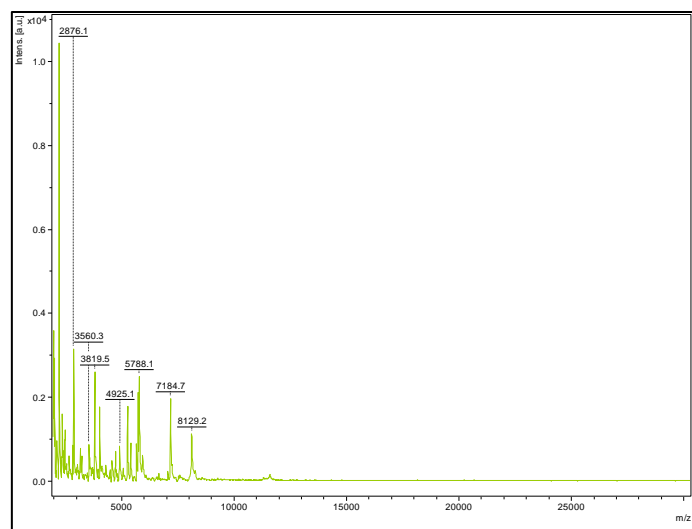
A vizsgálataink során, 4 különböző minta és 4 ismétléses vizsgálatot végeztünk el.

A napraforgó kaszatok NaCl semleges oldatát vizsgálva, csúcs szegény tömegspektrumokat kaptunk. Három jellemző fő csúcs volt, de ezek intenzitásában jelentősen elmaradtak a többi oldószeres vizsgálatunk eredményétől (9. ábra).



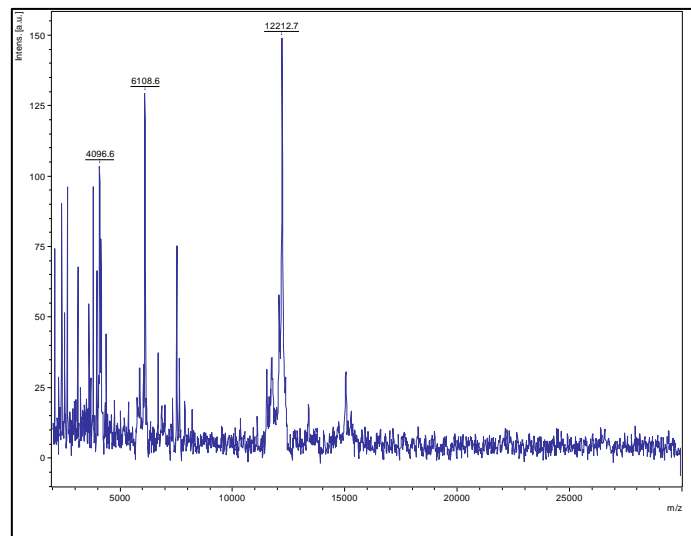
9. ábra: Napraforgó kaszatok NaCl semleges oldatának tömegspektruma (hántolva, darálva)

Míg a vizes oldat alig adott csúcsokat, addig a savas extrakció eredményeként egy jóval intenzívebb és csúcs gazdagabb tömegspektrumot kaptunk. A jellemző csúcsok 8500 m/z-ig terjedtek. Itt a spektrumok már kiértékelhető eredmények szolgáltattak az előző vizsgálatainkhoz képest (10. ábra)



10. ábra: Napraforgó kaszatok NaCl savas oldatának tömegspektruma (hántolva, darálva)

Az 1-propanolos vizsgálatunk eredményei jóval elmaradtak az izopropanolos értékektől, csúcs szegény és intenzitásban is alacsony spektrumokat kaptunk (11. ábra).

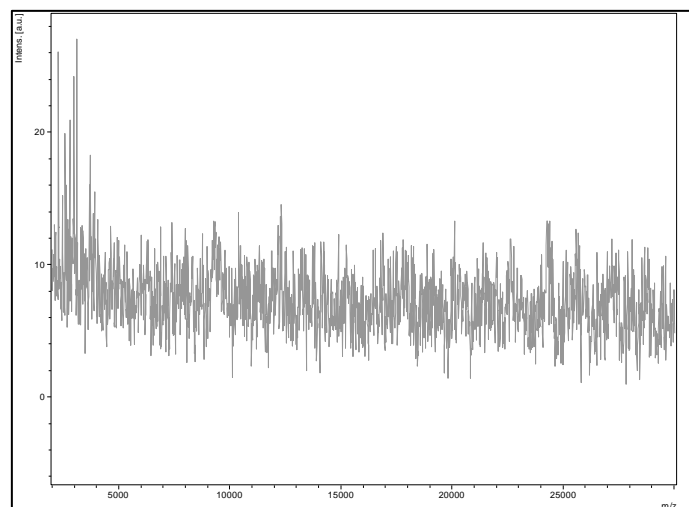


11. ábra: Napraforgó kaszatok 1-propanol oldatának tömegspektruma (hántolva, darálva)

Az egyik legérdekesebb vizsgálatunk a napraforgó 60% etanolos extakció volt. A többi előkészítési módszerünkhöz képest itt értékelhető spektrumokat nem kaptunk (12. ábra).

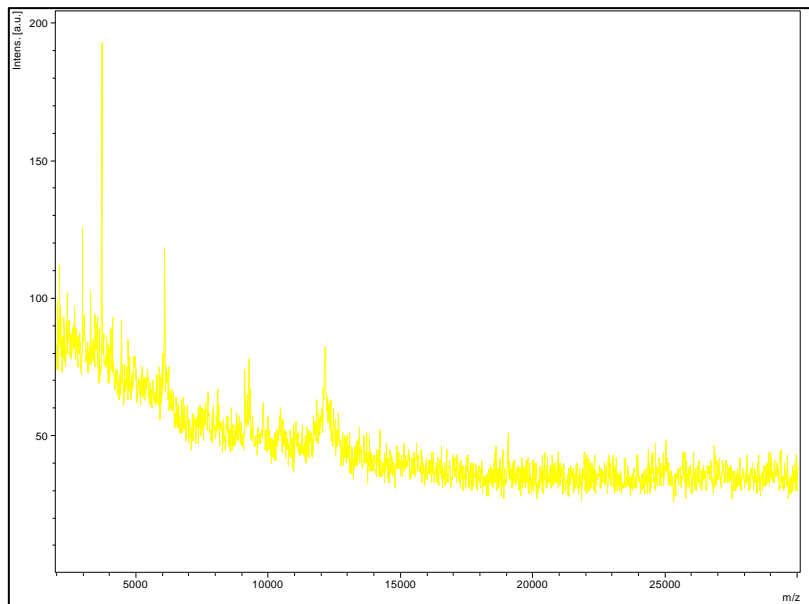
Etanol: CH₃CH₂OH

- 2 propanol CH₃ CHOH CH₃
- propanol CH OH CH₂ CH₃



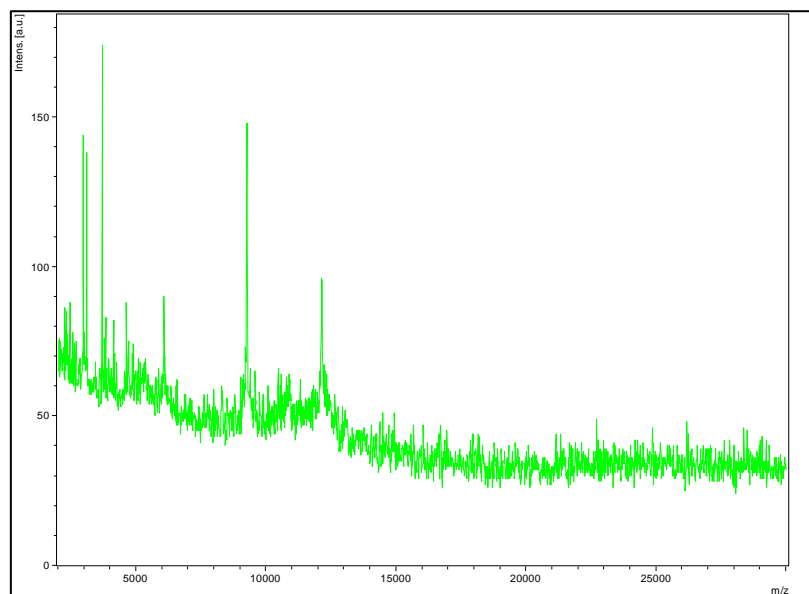
12. ábra: Napraforgó kaszatok 2-propanol oldatának tömegspektruma (hántolva, darálva)

A kukoricánál mért NaCl semleges extrakciók nem adtak értékelhető eredményeket, mert a kioldás során nem kaptunk olyan fehérjéket, ami tömegspektrumokat eredményezett volna (13. ábra).



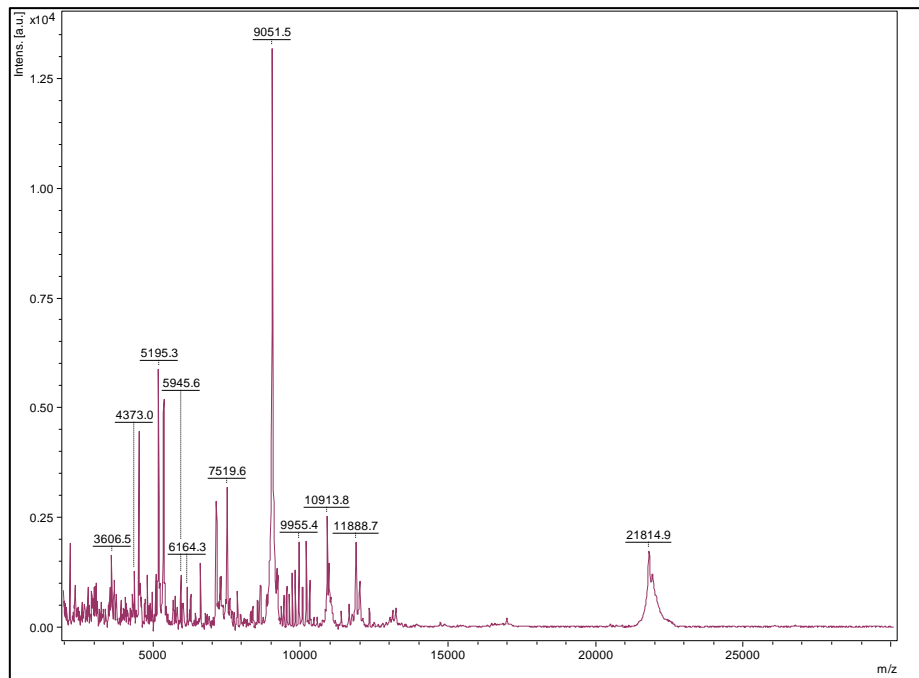
13. ábra: Kukorica NaCl semleges oldatának tömegspektruma (darálva)

A kukorica NaCl - savas extrakciója (1 ml 96%-os ecetsav) adott 1-2 csúcsot, de értékelésre még nem számottevőek (14. ábra)



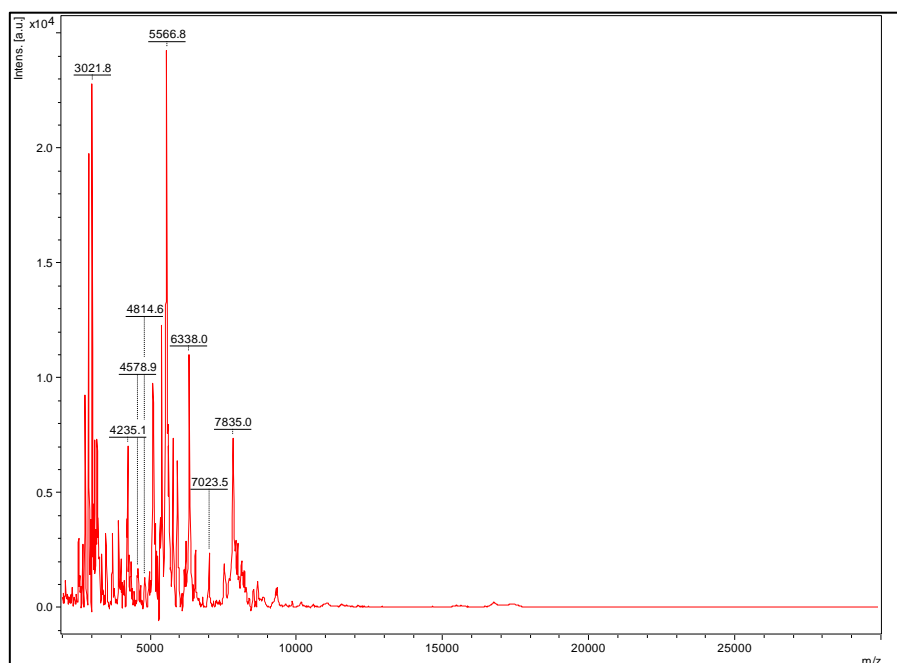
14. ábra: Kukorica NaCl savas oldatának tömegspektruma (darálva)

A kukorica minták vizsgálata során az 1-pronalos mérések adták a legjobb eredményeket. Az értékelhető tömegtartomány egészen 23000 m/z-ig terjedt. A legtöbb csúcs 12000 m/z alatt található. Az intenzitások megfelelőek a statisztikai kiértékelésekhez (15. ábra).



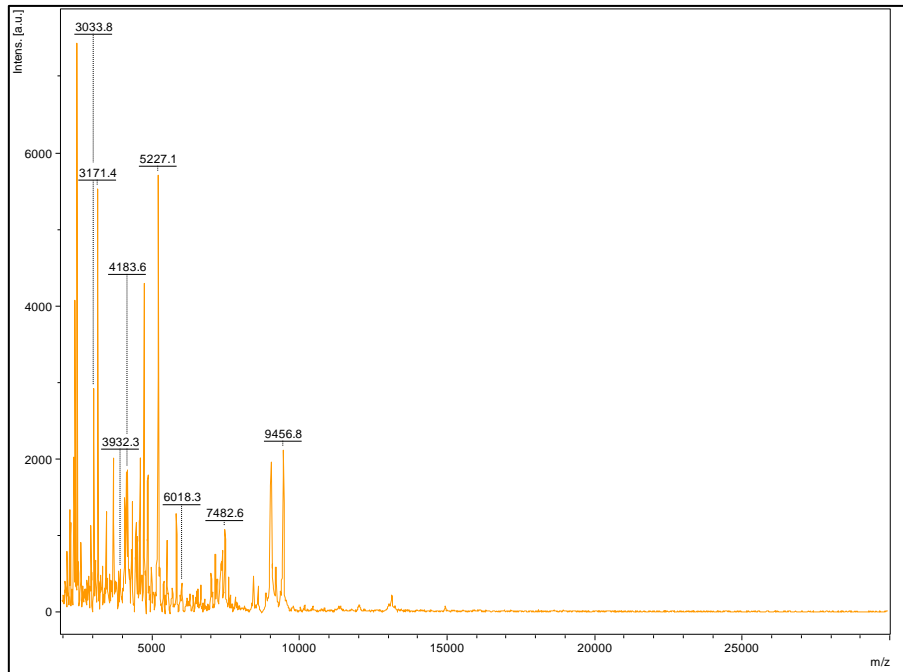
15. ábra: Kukorica 1-propanol oldatának tömegspektruma (darálva)

Az izopropanolos vizsgálatunk 10000 m/z tömegtartományig terjedt az 1-propanolos vizsgálatainkhoz összehasonlítva jóval csúcshegyenyebb spektrumokat kaptunk (16. ábra).



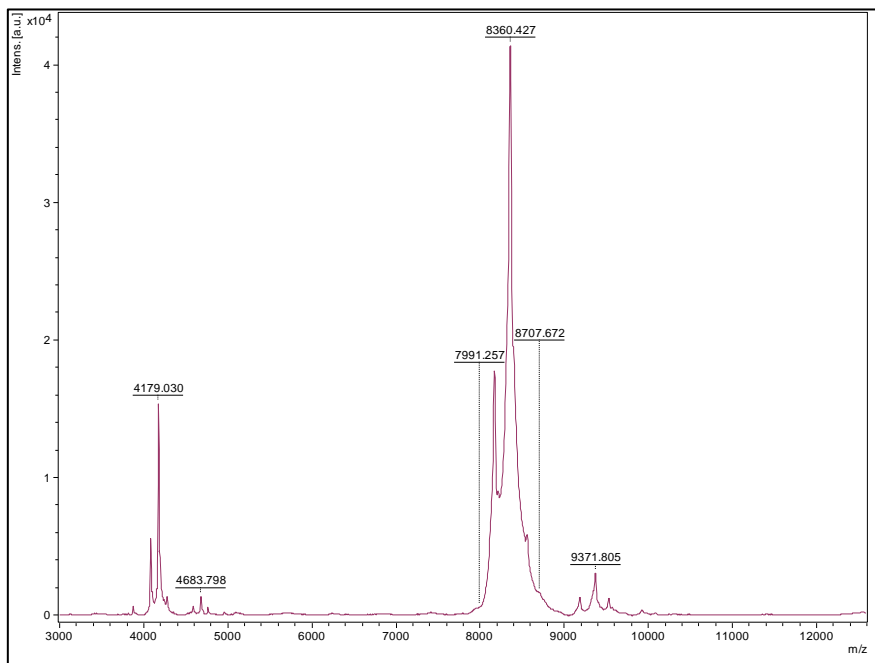
16. ábra: Kukorica 2-propanol oldatának tömegspektruma (darálva)

A kukorica 60%-os EtOH-s vizsgálati eredményénél értékelhető tömegspektrumokat kaptunk, de elmaradt az 1-propanolos elíráshoz képest (17. ábra)



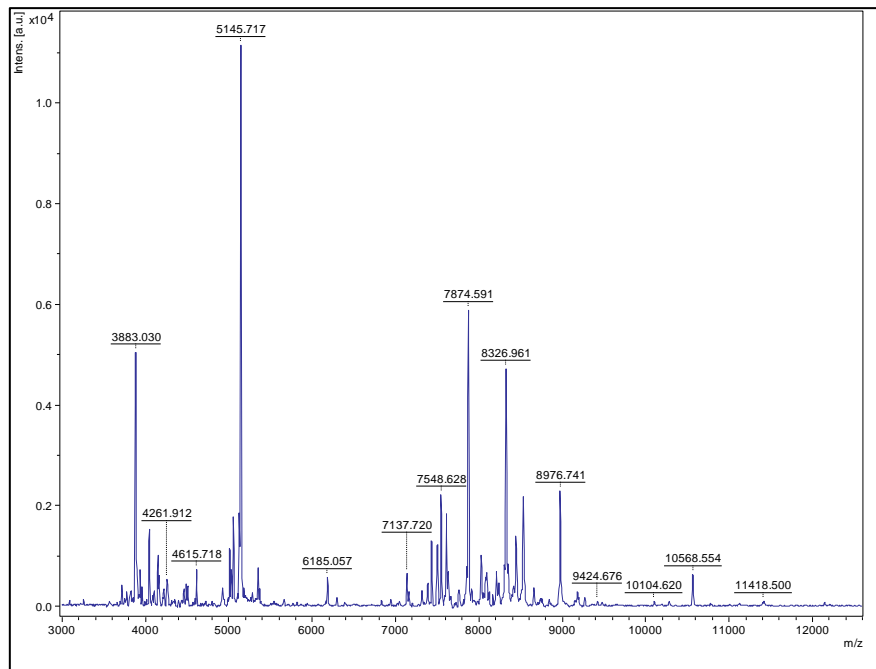
17. ábra: Kukorica 60%-os EtOH oldatának tömegspektruma (darálva)

A szója NaCl semleges vizsgálati szép tömegspektrumokat adtak és jellemzően 2 fő csúcs volt: az egyik 4200 m/z körül, míg a másik 8400 m/z környékén kaptuk (18. ábra)



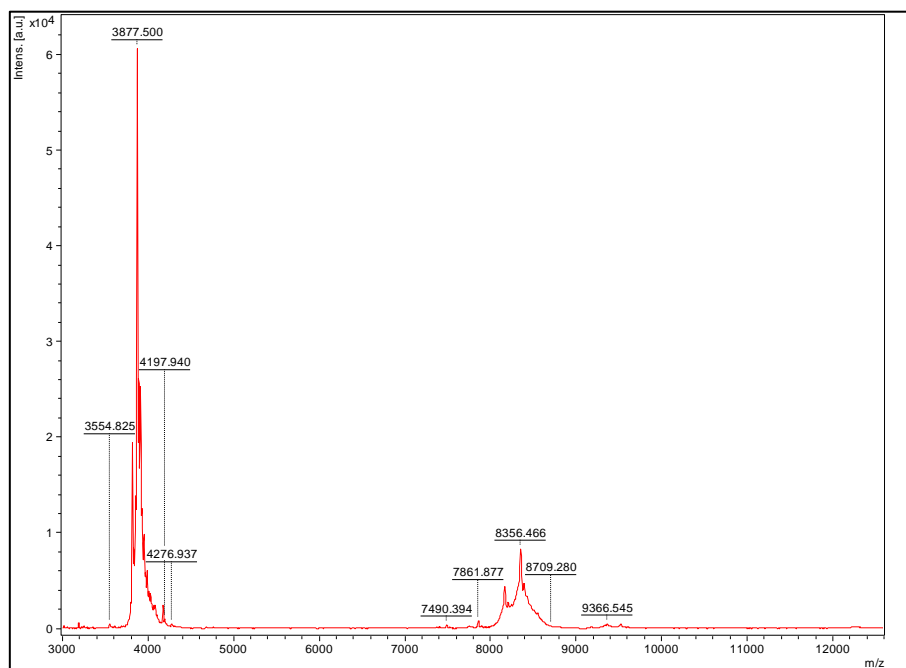
18. ábra: Szója NaCl semleges oldatának tömegspektruma (darálva)

A szója vizsgálataink során a legjobb eredményeket a savas extrakció adta a tömegtartomány 3500 m/z és 12000 m/z közé terjed. Csúcs gazdag és értékelésre alkalmas spektrumokat kaptunk (19. ábra).



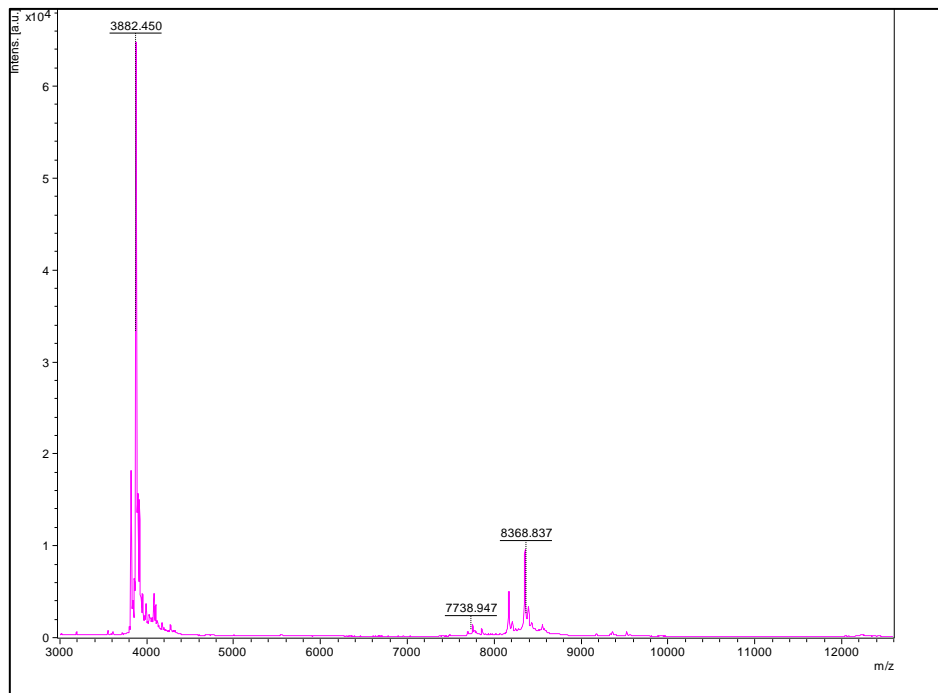
19. ábra: Szója NaCl savas oldatának tömegspektruma (darálva)

Az 1-pronalos extrakció szép spektrumokat adott, de itt is csak 2 csúcsot kaptunk, mint az NaCl semleges extrakció során (20. ábra).



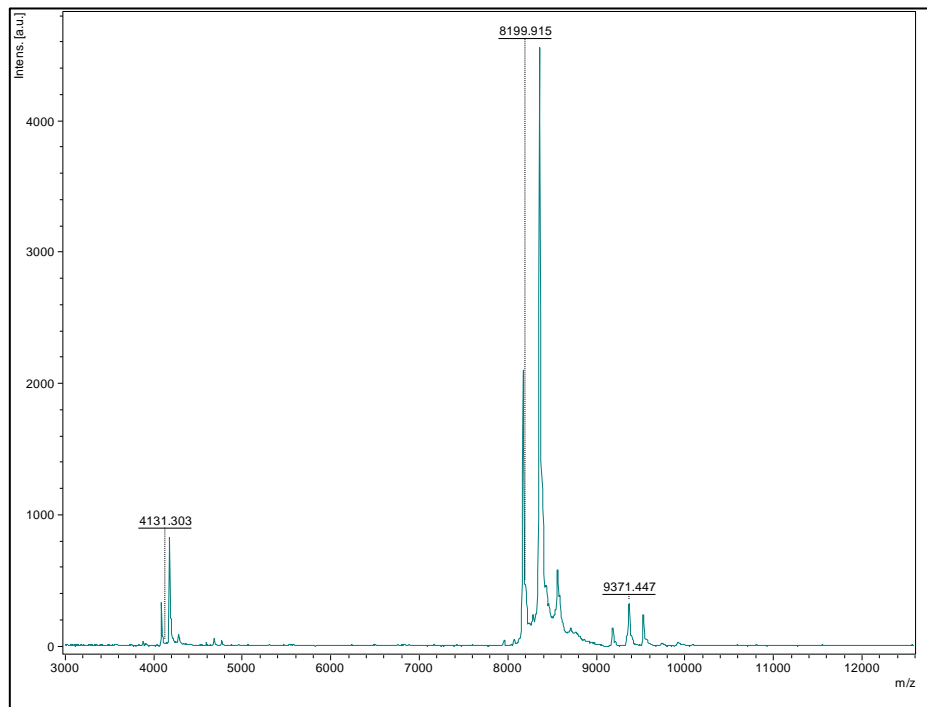
20. ábra: Szója 1-propanol oldatának tömegspektruma (darálva)

A szója 2-propanolos mérési eredményeket adott az 1-propanolos az NaCl semleges extrakciói során felvett tömegspektrumokhoz (21. ábra).



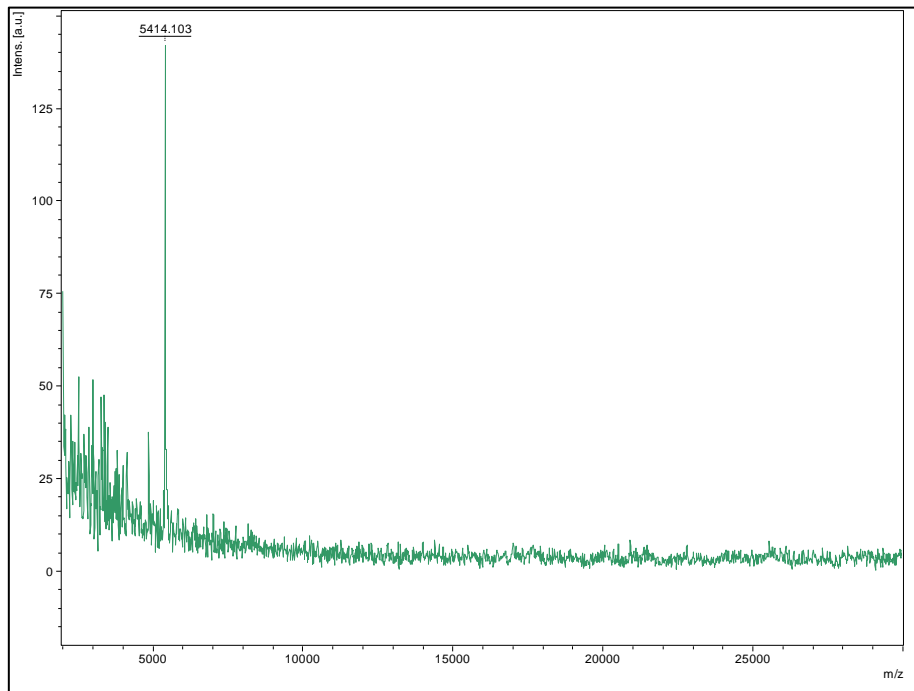
21. ábra: Szója 2-propanol oldatának tömegspektruma (darálva)

A szója 60% etanolos vizsgálati eredményei hasonlóak voltak, mint az 1-propanolos, 2-propanolos és a NaCl semleges extrakciói során felvett tömegspektrumokhoz (22. ábra)



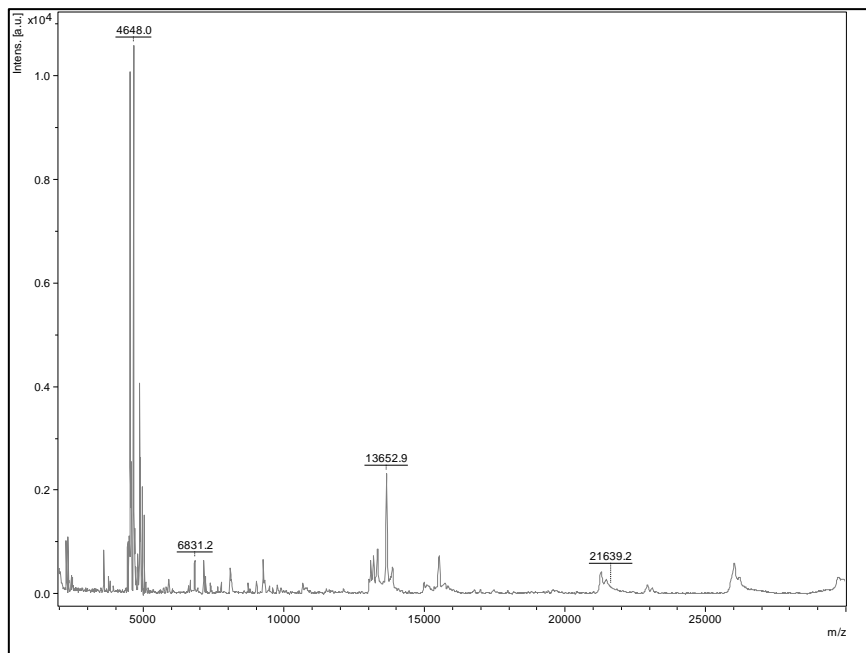
22. ábra: Szója 60%-os EtOH oldatának tömegspektruma (darálva)

A búza vizsgálatai során a semleges extrakció nem adott értékelhető tömegspektrumokat (23. ábra).



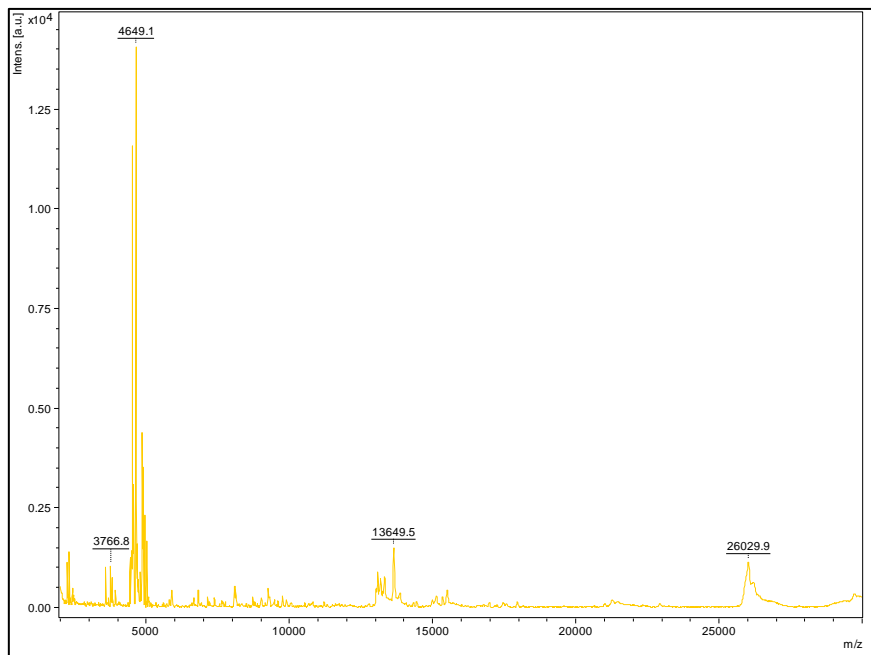
23. ábra: Búza NaCl semleges oldatának tömegspektruma (darálva)

A búza NaCl savas extrakciója értékelhető tömegspektrumokat eredményezett. A tömegtartomány 27000 m/z-ig terjedt (24. ábra).



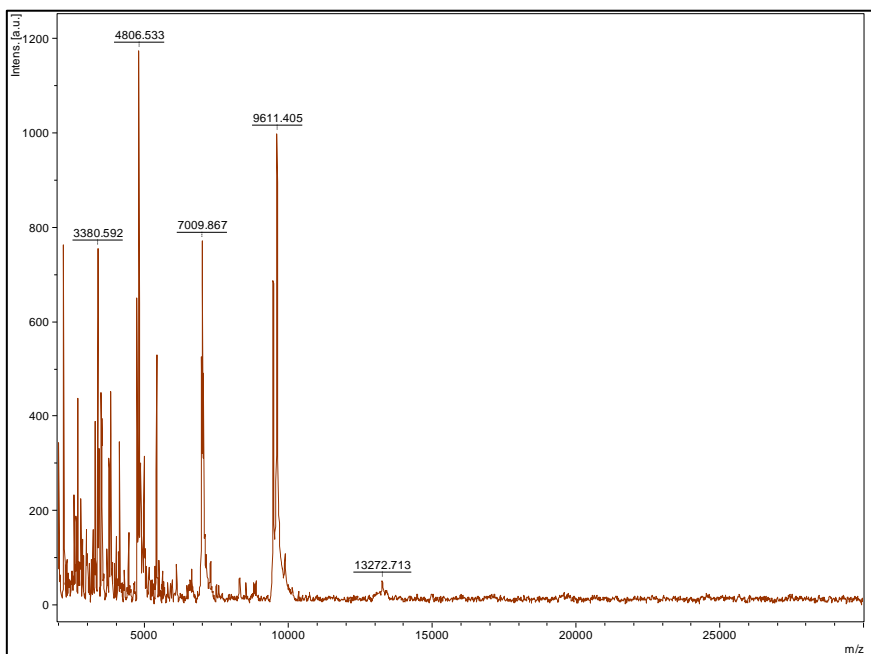
24. ábra: Búza NaCl savas oldatának tömegspektruma (darálva)

A búza 1-propanolos mérése során kapott spektrumi értékelhetőek és mint a savas extrakciónál, 27000 m/z ig terjedt (25. ábra).



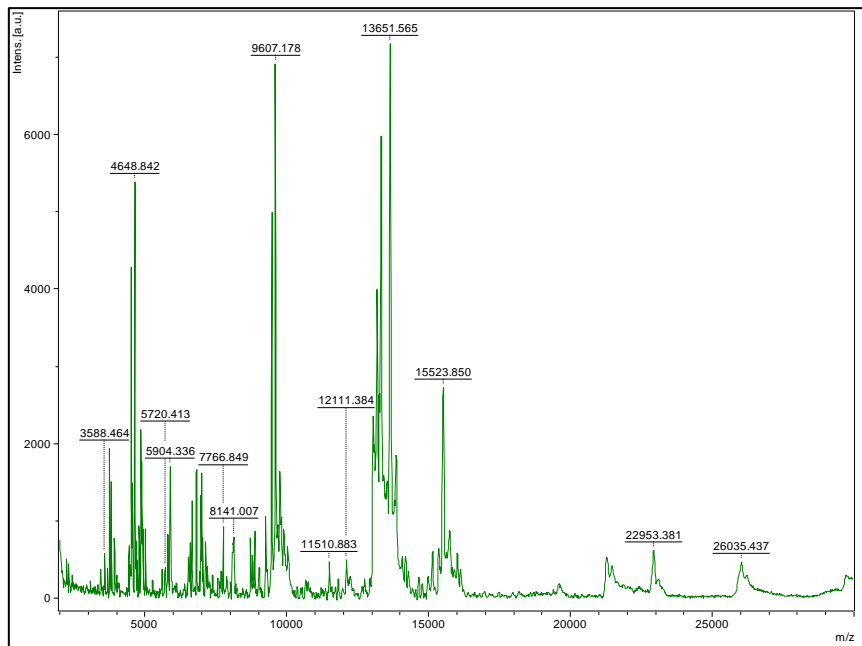
25. ábra: Búza 1-propanol oldatának tömegspektruma (darálva)

A búza 2-propanolos vizsgálatának eredményei elmaradtak az 1-propanolos méréseinktől, de kiértékelésre alkalmas spektrumokat kaptunk (26. ábra).



26. ábra: Búza 2-propanol oldatának tömegspektruma (darálva)

A legjobb eredményeket a búzaminták mérései során a 60% etanos extrakcióval kaptuk, amely csúcsgazdag és kiértékelésre alkalmas spektrumokat eredményezett. A tömegtartomány egészen 27.000 m/z-ig terjedt (27. ábra).



27. ábra: Búza 60%-os EtOH oldatának tömegspektruma (darálva)

5.4. Az M/Z értékek vizsgálati eredményei a napraforgó kaszat minták esetében

5.4.1. Napraforgó kaszatok esetében mért M/Z értékek eredményei

A vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy nem jelenik meg minden fehérje repülési ideje (M/Z érték) ugyanott, adott növényfajtnál. Ez azt jelenti, hogy adott mintát többször mérve sem mindig kapunk ugyan olyan eredményeket. Jelen vizsgálat során csak az 5. és 6. minta esetében mértük ugyanazon értékeket (14-15. táblázat). A Napraforgó kaszat 10 átlagmintáját vizsgálva jól látható, hogy a legtöbb esetben nem jelent meg ugyanaz az M/Z érték, míg az adott fehérje, adott mintatételben csak akkor tekinthető értéknek, amennyiben százszor mérve száz szemből legalább kilencvennyolcszor kimutatható (10-19. táblázat).

10. táblázat: Napraforgó kaszat – 1. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Napraforgó kaszat - 1. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3635	100
5102	1
7543	100
9284	100
10202	1
12224	100
15070	100

11. táblázat: Napraforgó kaszat – 2. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Napraforgó kaszat - 2. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3419	98
5136	98
7654	98
9280	99
11588	98
11624	98
15308	98

12. táblázat: Napraforgó kaszat – 3. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Napraforgó kaszat - 3. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3588	100
5212	100
7155	100
9049	100
10917	100
13126	100
17756	100

13. táblázat: Napraforgó kaszat – 4. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Napraforgó kaszat - 4. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
2598	100
3655	100
4526	100
7483	100
9050	100
13332	100
17752	100

14. táblázat: Napraforgó kaszat – 5. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Napraforgó kaszat - 5. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3690	100
5363	100
7307	100
7518	100
9050	100
10911	100
10133	2

15. táblázat: Napraforgó kaszat – 6. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Napraforgó kaszat - 6. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3757	100
5678	100
7518	100
9028	100
10915	100
13135	100
21801	100

16. táblázat: Napraforgó kaszat – 7. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Napraforgó kaszat - 7. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3022	100
4236	100
4563	100
5568	100
6340	100
7836	100
16751	1

17. táblázat: Napraforgó kaszat – 8. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Napraforgó kaszat - 8. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
5484	100
9275	100
12218	100
13611	100
13712	100
15065	1
15953	1

18. táblázat: Napraforgó kaszat – 9. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Napraforgó kaszat - 9. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
5813	100
6950	100
9274	100
10362	1
13610	100

19. táblázat: Napraforgó kaszat – 9. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Napraforgó kaszat - 9. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
712	100
4639	100
6109	100
9278	100
1220	100
15070	100
19981	1

5.4.2. A búza minták esetében mért M/Z értékek eredményei

A búza minták esetében hasonlót tapasztaltunk, mint a napraforgónál, de sok esetben más tartományokba esnek a vizsgált fehérjék, mely a LMW-GS glu-3 lókuszaival magyarázható (20-28. táblázat).

20. táblázat: Búza – 1. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Búza - 1. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3826	100
5415	
6480	
6480	
13273	

21. táblázat: Búza – 2. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Búza - 2. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3037	100
5193	
7307	
9049	
10193	
13130	
17499	
21788	

A Búza – 3. Minta esetében a 100 szem közös tartományait nézve voltak közös peakek de végig elemezni nem lehetett mivel az összdarálmánnyal egyáltalán nem egyezett. Valószínűleg aratás után nem fajtánként lett szelektálva (22. táblázat).

22. táblázat: Búza –32. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Búza - 3. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
2608	98
2759	98
3768	44
3825	63
5414	100
6641	6
9606	20

23. táblázat: Búza – 4. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Búza - 4. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3690	100
4125	100
4459	100
5185	100
7514	100
17614	100

24. táblázat: Búza – 5. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Búza - 5. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
2659	100
4976	100
7520	100
9059	100
10916	100
21822	92

A Búza – 6. minta esetében a 100 szem közös tartományait nézve voltak közös peakek de végig elemezni nem lehetett mivel az összdarálmánnyal egyáltalán nem egyezett. Valószínűleg aratás után nem fajtánként lett szelektálva, ezért nem jelenítettük meg táblázatban. A grafikonos mérési eredményeket a 96-99. számú melléletek tartalmazzák.

25. táblázat: Búza – 7. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Búza - 7. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3824	100
5413	
7002	
9605	
13269	

26. táblázat: Búza – 8. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Búza - 5. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
4123	100
5908	100
7465	100
9580	100
17616	99
21482	100
11047	2
24322	1

27. táblázat: Búza – 9. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Búza - 9. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
2654	1
3690	95
4785	92
8755	100
10910	93
13108	100
14887	96
17618	100
21497	97

28. táblázat: Búza – 10. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Búza - 10. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3098	98
4786	99
7477	97
8874	100
9582	100
11989	95
17620	100
21000-21970-ig	értékelhetetlen

5.4.3. A szója minták esetében mért M/Z értékek eredményei

A szója minták esetében hasonlót tapasztaltunk, mint a napraforgónál, de sok esetben más tartományokba esnek a vizsgált fehérjék, mely az eltérő fajták fehérjetartalmával magyarázhatók (29-38. táblázat).

29. táblázat: Szója – 1. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Szója - 1. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
486	100
4180	100
8165	100
8350	100
8552	100
8752	100
9359	100
9564	100
9911	100
16705	100

30. táblázat: Szója – 2. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Szója - 2. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
4082	100
5542	100
5349	100
9535	100
12327	100
16700	100

31. táblázat: Szója – 3. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Szója - 3. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3573	100
5198	100
6566	100
7145	100
7483	100
9054	100
13131	100
17749	100
21960	100

32. táblázat: Szója – 4. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Szója - 4. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3855	100
4070	
4175	
4820	
5120	
5350	
8037	
8139	
8348	
8426	
8550	
9066	
9148	
9269	

33. táblázat: Szója – 5. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Szója - 5. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3866	100
4088	
4173	
8349	
9357	
9912	
16332	
16702	
17017	
17700	
25133	

34. táblázat: Szója – 6. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Szója - 6. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3031	100
3744	
4525	
5208	
5377	
7097	
7310	
9058	
17689	
25133	

35. táblázat: Szója – 7. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Szója - 7. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
4525	100
6588	
7098	
7311	
9061	
7489	
13131	

36. táblázat: Szója – 8. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Szója - 8. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
2786	87
3886	93
7860	91
15114	92
20002	83

37. táblázat: Szója – 9. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Szója - 9. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
4037	100
5068	100
6952	100
7160	100
7654	
7768	
11164	100

38. táblázat: Szója – 10. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Szója - 10. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
5351	100
7433	
7874	
8353	
8976	
9424	
10140	

5.4.4. A kukorica minták esetében mért M/Z értékek eredményei

A szója minták esetében hasonló tapasztaltunk, mint a napraforgónál, de sok esetben más tartományokba esnek a vizsgált fehérjék (39-48. táblázat).

39. táblázat: Kukorica – 1. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Kukorica - 1. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
2650	100
3764	100
5200	100
7159	100
9050	100
10913	100
17557	100
21800	100

40. táblázat: Kukorica – 2. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Kukorica - 2. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3740	100
5213	100
7450	100
9053	100
11163	100

41. táblázat: Kukorica – 3. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Kukorica - 3. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
4528	100
5229	100
7748	100
9052	100
13137	100
18877	100

42. táblázat: Kukorica – 4. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Kukorica - 4. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3545	100
5213	100
7485	4
9050	96
6021	4
13135	100
17622	100

43. táblázat: Kukorica – 5. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Kukorica - 5. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3658	100
7313	100
9030	100
10985	100
13138	100
17750	99
21959	93

44. táblázat: Kukorica – 6. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Kukorica - 6. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3682	100
5196	100
3711	100
9051	100
13135	100

45. táblázat: Kukorica – 7. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Kukorica - 7. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
2698	100
4529	100
7519	100
9058	100
10915	100
21811	100

46. táblázat: Kukorica – 8. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

Vizsgált Kukorica - 8. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3684	100
5197	100
7308	100
9024	100
10930	100
13134	100
17447	100
21803	100

47. táblázat: Kukorica – 9. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

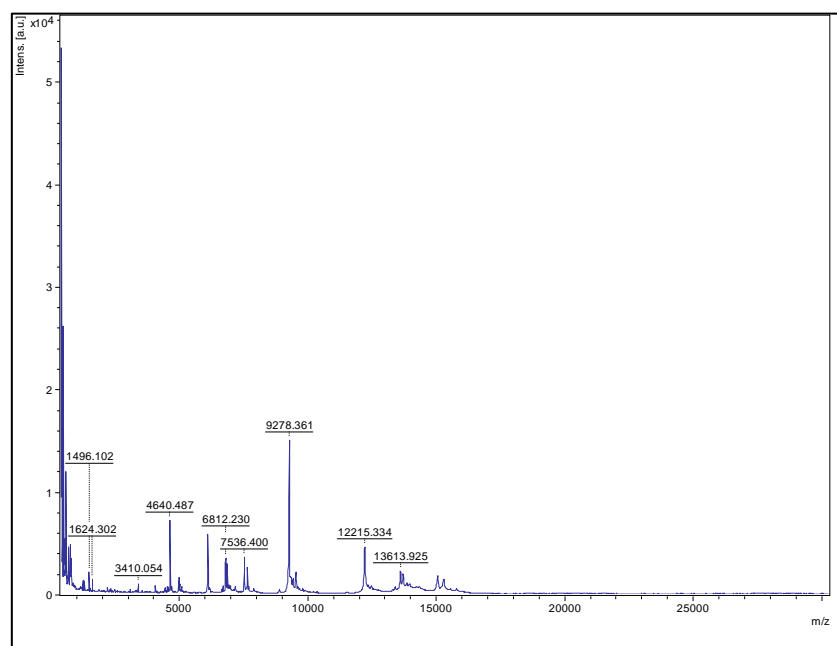
Vizsgált Kukorica - 9. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3570	100
5211	100
7139	100
9050	100
13132	100
17609	100

48. táblázat: Kukorica – 9. Minta M/Z értékeinek kiértékelése (%)

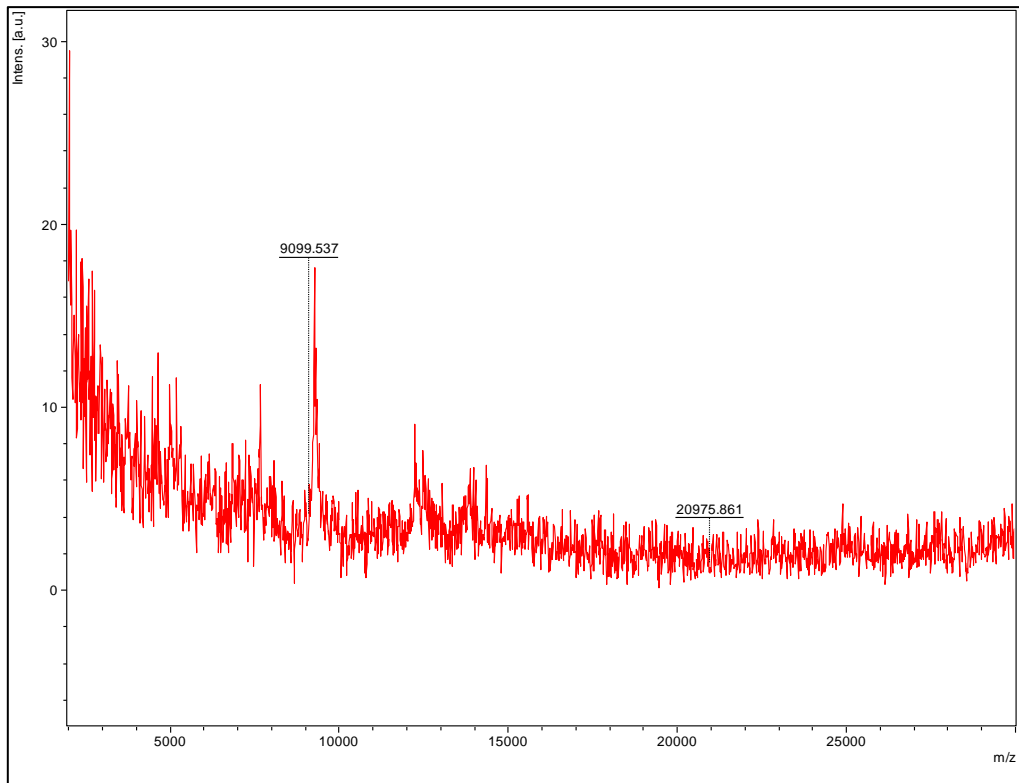
Vizsgált Kukorica - 10. minta M/Z értékek kiértékelése	Találatok az adott M/Z értékre (%)
3743	100
4527	100
5212	100
7484	100
9052	100
13134	100

5.5. Darált és darálatlan minták mérési eredménye

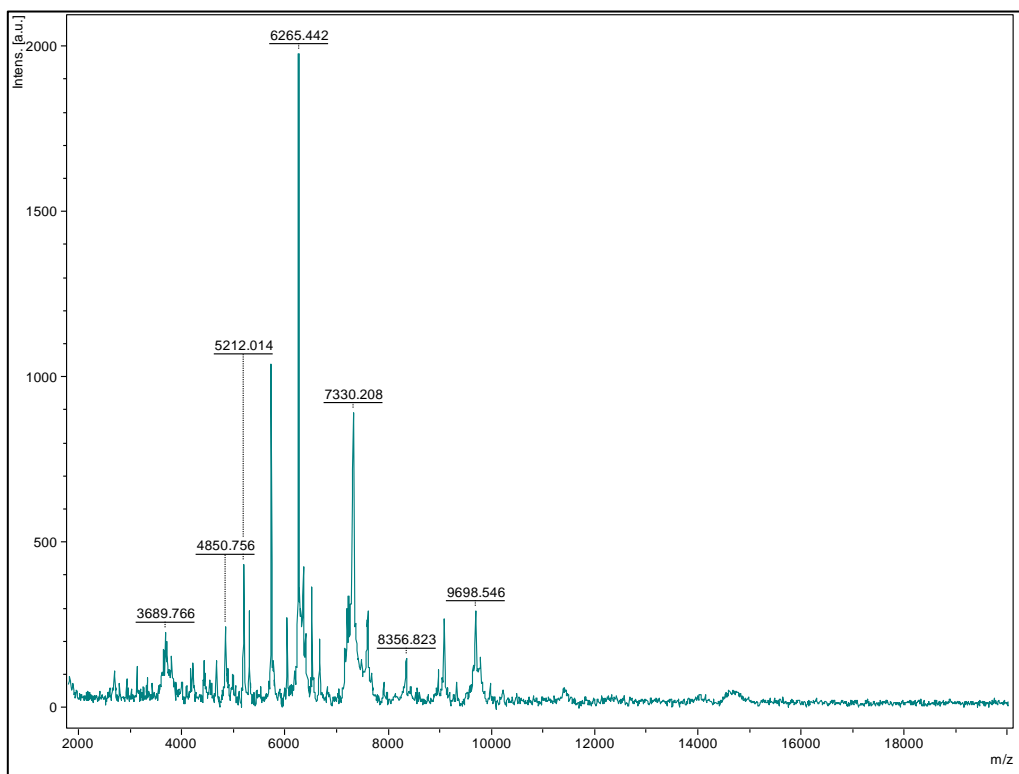
Az analitikai mérések alapja a megfelelő fizikai mintaelőkészítés. Az alábbi ábrákon látható, hogy míg darálás nélkül végzett MALDI-TOF vizsgálatok során alig kaptam értékelhető csúcsokat, addig a darált minták esetén a feltárás eredményesebb volt és csúcsgazdag tömegspektrumokat vettem fel a tömegspektrométer segítségével. A darált minták mérése során kapott spektrumok értékelhetőek és megbízható eredményt adnak a későbbi vizsgálataink során. A darálás nélküli feltárások várhatóan azért nem adtak értékelhető eredményeket, mert sokkal kisebb volt a fizikai felület, amellyel az oldószer érintkezett, így kisebb eséllyel vagy egyáltalán nem oldottunk ki fehérjéket a mintáinkból (28-35. ábra)



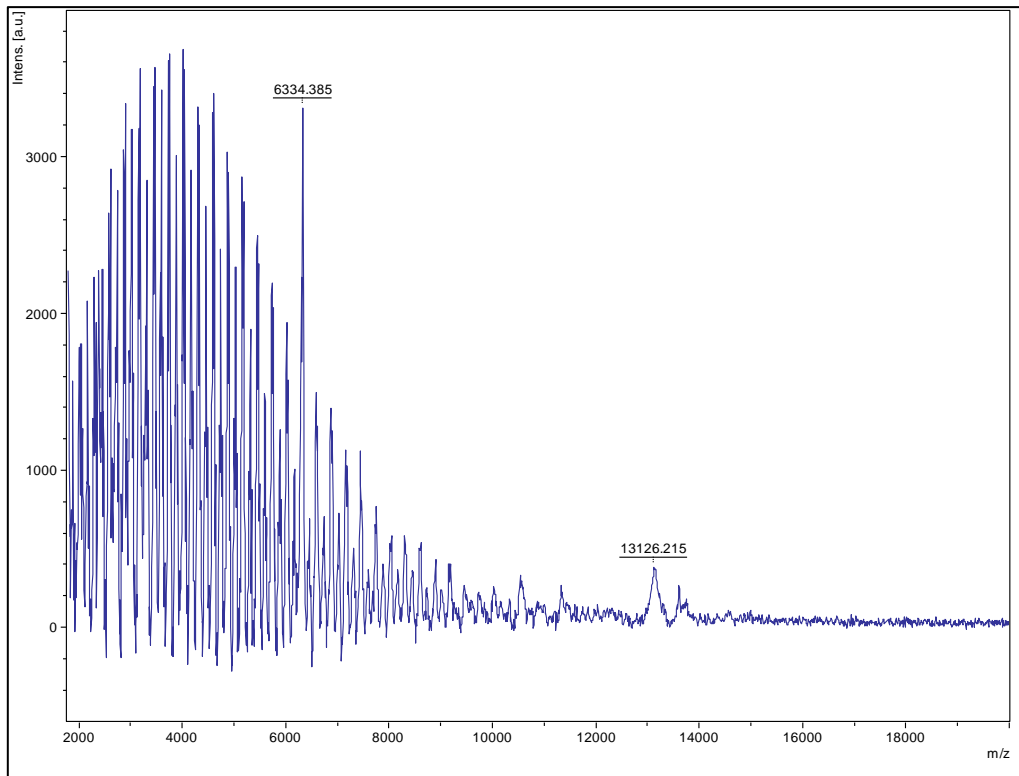
28. ábra: Darált napraforgó kaszatok spektrum elemzése



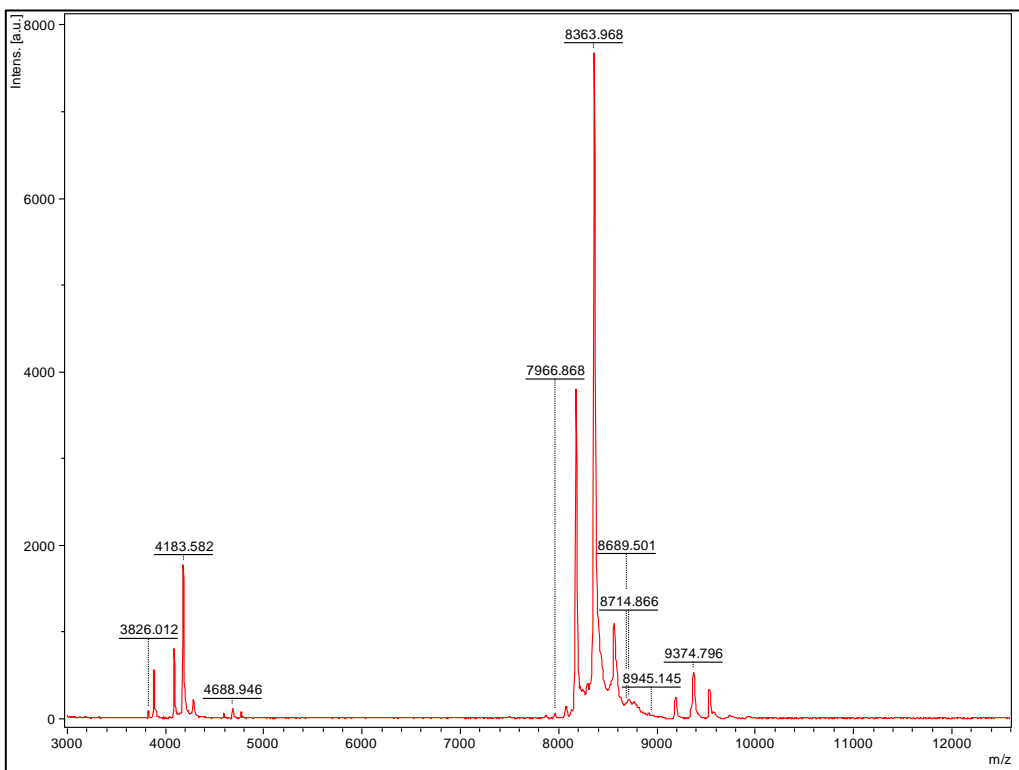
29. ábra: Darálatlan napraforgó kaszatok spektrum elemzése



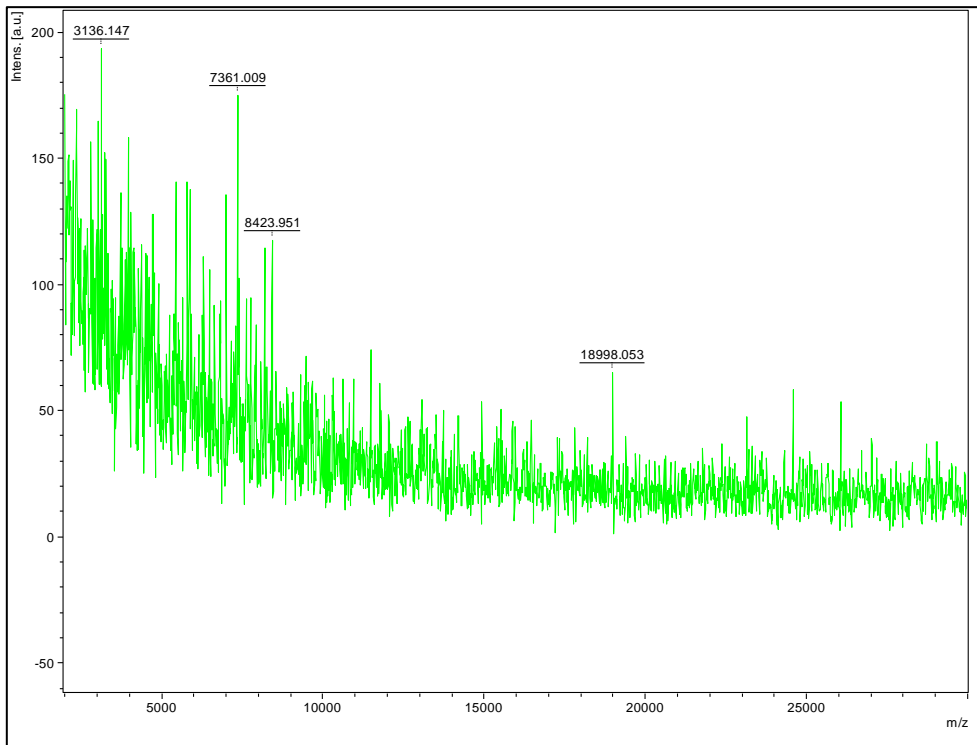
30. ábra: Darált búza minta spektrum elemzése



31. ábra: Darálatlan búza minta spektrum elemzése

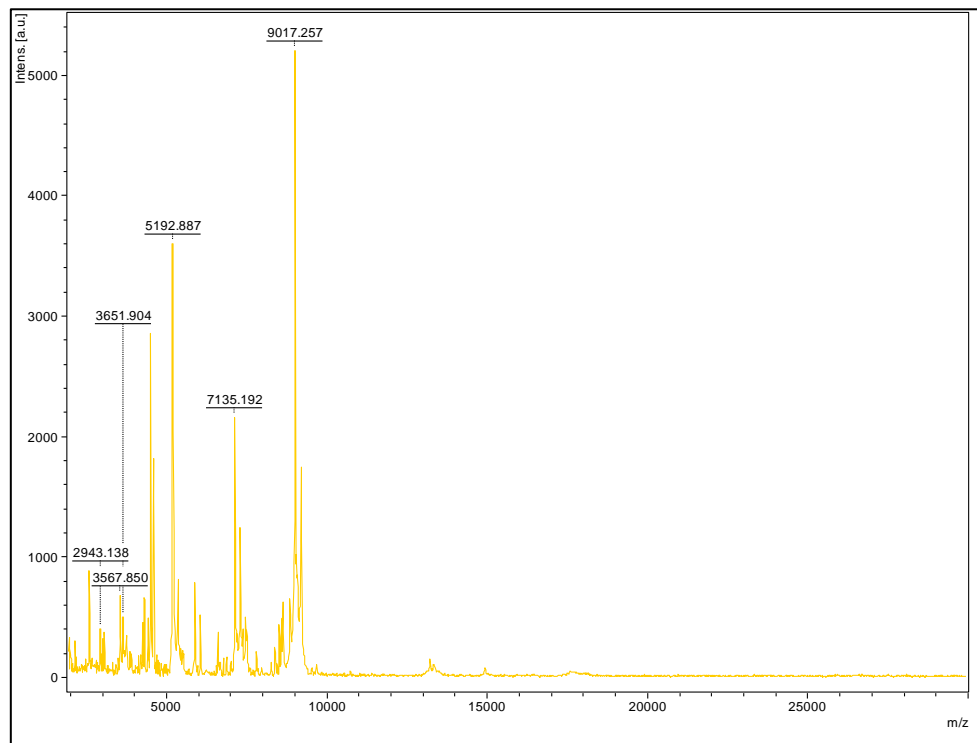


32. ábra: Darált szója minta spektrum elemzése

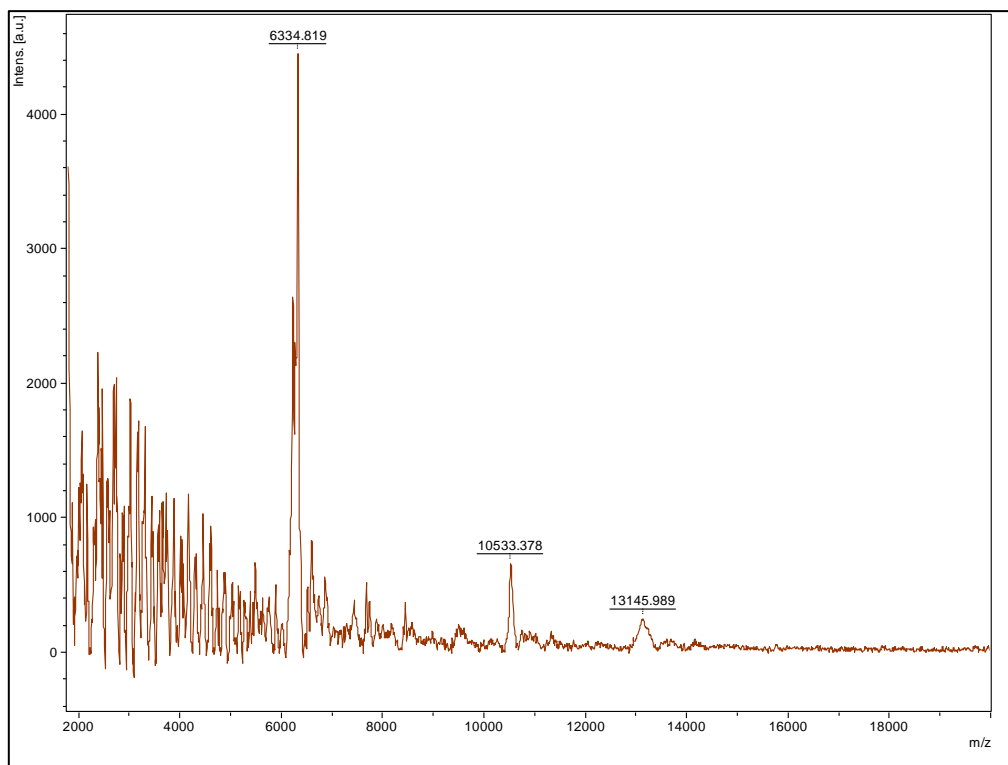


33. ábra: Darálatlan szója minta spektrum elemzése

Kukoricánál már a korábbi elő munkálatokból kiderült, hogy ennél a magnál fontos a darálás, de természetesen a homogenitás teszthez szintén újra elvégeztük.



34. ábra: Darált kukorica minta spektrum elemzése



35. ábra: Darálatlan kukorica minta spektrum elemzése

5.6. Az extrahálószer és az M/Z érték közötti korreláció, Pearson-féle analízissel vizsgálva

Tovább elemezve a kapott eredményeket, arra kerestük a választ, hogy mennyire alkalmas az adott izoláló a vizsgált szántóföldi növényfaj tartalékfehérje markereinek meghatározására. Az összefüggés vizsgálatot Pearson-féle korrelációs analízissel végeztem, és az eredmények alapján megállapítottam, hogy minden vizsgált növéyminta esetében pozitív közepes kapcsolat volt a növényfajonként alkalmazott extrahálószer és az M/Z értékek között, mely hozzájárulhat az új módszer finomításához (49-52. táblázat). Az analízis megerősítette, miszerint a búza fehérjét a 60 EtOH-, a kukorica fehérjét az 1-propanol-, a napraforgó kaszatokban lévő fehérjét a 2-propanollal, míg a szója esetében a két NaCl extrahálószer oldja ki a legjobban, mely a fehérjék repülési tömegének idejében mutatkozik meg a legjobban (M/Z). A kapcsolatok jellemzője, hogy pozitív, közepes erősségű mind a négy növényfaj esetében (Búza $r = 0,661^{**}$, kukorica $r = 0,600^{**}$, napraforgó kaszat $r = 0,634^{**}$, szója $r = 0,656^{**}$).

49. táblázat: A búza mintákhoz alkalmazott extrahálószeres és az M/Z értékek közötti kapcsolat vizsgálata Pearson-féle analízissel

Búza mintához alkalmazott extrahálószeres	60% EtOH (r)	NaCl savas (r)	2-propanol (r)	1-propanol (r)	NaCl semleges (r)
M/Z	0,661**	0,197	0,152	0,129	0,106

** A korreláció szignifikáns p = 1% szinten

50. táblázat: A kukorica mintákhoz alkalmazott extrahálószeres és az M/Z értékek közötti kapcsolat vizsgálata Pearson-féle analízissel

Kukorica mintához alkalmazott extrahálószeres	1-propanol (r)	2-propanol (r)	60% EtOH (r)	NaCl savas (r)	NaCl semleges (r)
M/Z	0,600**	0,193	0,157	0,134	0,112

** A korreláció szignifikáns p = 1% szinten

51. táblázat: A napraforgó mintákhoz alkalmazott extrahálószeres és az M/Z értékek közötti kapcsolat vizsgálata Pearson-féle analízissel

Napraforgó kaszat mintához alkalmazott extrahálószeres	2-propanol (r)	60% EtOH (r)	1-propanol (r)	NaCl semleges (r)	NaCl savas (r)
M/Z	0,634**	0,197	0,163	0,127	0,122

** A korreláció szignifikáns p = 1% szinten

52. táblázat: A szója mintákhoz alkalmazott extrahálószeres és az M/Z értékek közötti kapcsolat vizsgálata Pearson-féle analízissel

Szója mintához alkalmazott extrahálószeres	NaCl savas (r)	NaCl semleges (r)	1-propanol (r)	60% EtOH (r)	2-propanol (r)
M/Z	0,656**	0,623**	0,177	0,125	0,169

** A korreláció szignifikáns p = 1% szinten

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a **MALDI-TOF** és **MALDI-TOF-TOF** vizsgálati módszer alkalmas a kukorica napraforgó szója és búza hibrid és szülői anya vonal vetőmag vizsgálatára. A **MALDI-TOF** és a **MALDI-TOF-TOF** tömegspektrometriás módszerünkkel lehetőségünk van arra, hogy tartalékfehérje profilokat elemezzünk, azaz kukorica, napraforgó szója és búza hibrid minták esetén a szemekből meghatározzuk a genetikai homogenitást. A módszer újdonsága miatt hiányos volt az tudásunk, hogy a vetőmag tételeknek növényi fajtól függetlenül mik a jellemző biomarkerei ezért 20 szemből összdaralmányt kellett készíteni.

A vizsgálatokat 4 különféle extrakciós módszerrel végeztük, egy nátriumkloridos savas, 2-propanolos, 60%-os alkoholos és 1-propanolos puffert alkalmazva. Az előkísérletekben minden egyes mérés előtt mind az öt extrakciót elvégeztük és az elővizsgálatok eredményeinek értékelése után döntöttem el, hogy melyik puffert fogjuk a további vizsgálatokhoz használni, de a kezdetekben öt extrahálószerrel kezdtük. A kukorica hibridek esetében az 1-propanolos extrakció bizonyult a megfelelőbbnek. Az 1-propanolos pufferben extrahált minták tömegspektrumai értékelhetőbbek voltak, amelyből arra következtettünk, hogy a kukorica tartalékfehérjéi 1-propanolos extraháló pufferben sokkal jobban kioldódnak.

A napraforgó és szójabab esetében mindenképpen hexános kezelés szükséges mivel az olaj és zsírtartalom magas jelenléte miatt, így minden egyes vizsgálatnál elkell végezni az összdaralmányon és szemenként is egyesével külön-külön. A napraforgó kaszatok esetében már az első vizsgálatok után kiderült, hogy hántolni és darálni kell, hogy értékelhető spektrumot kapjunk, ezért ez a módszer megoldást jelenthet erre a problémára is. A napraforgó magok esetében a 2-propanolos extrakció volt a legjobb, míg a búzaszemeket a 60% -os etanolos eljárással voltak a legjobban értékelhetők.

A kukorica tételek vizsgálataiból 10 tételből 7-volt homogén, míg napraforgó esetében 10 tételből szintén 6-volt genetikailag 100% homogén. A szójabab tételek esetében 10-ből 7 tétel volt, míg a búza vetőmagtétételek esetében 10 tételből 7 tétel volt, ahol a szemek 100% azonosak voltak. A nem homogén tételek esetében alacsony volt az intenzitás az adott peaknek, ami nem azt jelenti, hogy nincs meg az a fehérje vagy más tételből származik, hanem abban a magban a több fehérje mellett nem jelent meg, vagy csak alacsonyan ezért, hogy biztos legyen további vizsgálatok szükségesek ilyen esetekben és újra kell mérni azt a tartományt.

További tervek, kutatási célok: A kidolgozott módszerünk alkalmazhatóságának bizonyítására teljes adatbázist szeretnék a forgalomban lévő növényi fajok vetőmagjaira éves szinten így nyomon követés is perspektivikus lehetne, hasonlóságok és különbségek fehérje szinten a *Wessling Hungary Kft.* Laboratóriumában. További célok az izoenzimek vizsgálata.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Gazdasági szempontból az első 4 legfontosabb kultúrnövényeink a **kukorica**, **szója**, **napraforgó** és a **búza** termesztési szempontjából nélkülözhetetlen a kiváló minőségű vetőmag. A kutatás során mindegyik fajból 10 mintát elemeztünk, amelyek képi anyagai a dolgozatban megtekinthetők. A vetőmag minősítés feltételeit és minősítési paramétereit törvények, rendeletek írják elő, ezért a termelőknek és a vetőmag előállítóknak nagyon fontos a kétes eredetű vagy gyenge minőségű vetőmagok kiszűrése.

A kutatás célja az volt, hogy kidolgozzunk egy új vizsgálati módszert (tömegspektrometriás módszer) a készülékek segítségével (**MALDI-TOF** és **MAIDI-TOF-TOF**) kukorica, szója, napraforgó, búza vetőmagok genetikai homogenitási vizsgálatára, illetve, hogy mérésekkel igazoljuk a módszer alkalmazhatóságát.

Ez a módszer egy speciális *mátrixszal segített lézer deszorpció/ionizációs* módszer, amelynek segítségével a 4 növényifaj magjainak tartalékfehérjéit vizsgáltuk. A tömegspektrumokban megjelenő, különböző tömegszámú csúcsok (fehérjék) lehetővé teszik a marker fehérjék kiválasztását, illetve ezek nyomon követését, vizsgálatát a hibridekben. A **MALDI-TOF** és **MAIDI-TOF-TOF** tömegspektrometriás módszer, nemcsak gyorsaságával, érzékenységével és eredményeivel bizonyult megfelelő módszernek, de az adatok elektronikusan is bármikor elérhetők, évekre visszatekinthetők és hordozhatók is.

A mintákat különböző nemesítőházaktól kaptuk, eltérő, általuk elnevezett kódolással, melyeket megtartottunk és méréseknél is alkalmaztunk. A fajta nevet nem használhatjuk. A spektrumok a mérések útján nem átnevezhetők, így pár tételnél felismerhető a fajta neve, ezt jeleztük a fajta tulajdonosnak, aki engedélyezte az ilyen mérések publikálását.

8. SUMMARY

From an economic point of view, high-quality seeds are essential for the cultivation of our first 4 most important crops: maize, soybeans, sunflowers and wheat. In the course of the research, we analyzed 10 pieces of each species, the pictorial materials of which can be viewed in the dissertation. The conditions and certification parameters of seed certification are prescribed by laws and regulations, therefore it is very important for growers and seed producers to filter out seeds of dubious or poor quality.

The aim of the research was to develop a new test method (mass spectrometric method) for the genetic homogeneity of maize, soybean, sunflower and wheat seeds using the devices (MALDI-TOF and MALDI-TOF-TOF) and to verify the applicability of the method.

This method a special matrix-assisted laser desorption / ionization method, were used to study the reserve proteins of the seeds of 4 plant species. The peaks (proteins) with different mass numbers appearing in the mass spectra allow the selection of the marker proteins, as well as their monitoring and examination in the hybrids.

The MALDI-TOF and MALDI-TOF-TOF mass spectrometry methods have proven to be a suitable method not only with their speed, sensitivity and results, but also the data can be accessed electronically at any time, and can be viewed and carried for years.

The samples were obtained from different breeding houses, with different codings named after them, which were preserved and used for measurements. The variety name cannot be used. The spectra cannot be renamed through the measurements, so the name of the variety can be recognized for a few items, this has been indicated to the owner of the variety, who has authorized the publication of such measurements.

9. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. MALDI-TOF MS tartalékfehérje tömegspektrum alapú adatbázis létrehozása 10-10 búza, kukorica, napraforgó és szója fajta vetőmagjainak genetikai tisztaságára vonatkozóan, amelyből a vizsgált tételek genetikai homogenitása bármikor visszakereshető és évekre visszamenően összehasonlítható.
2. A módszer költséghatékony és környezet kímélőbb, mint az eddigi módszerek anyag használat tekintetében. A MALDI-TOF MS technológia lehetővé teszi, hogy rövid időn belül készülék típustól függően 102 vagy 362 mintát lemérjünk rövid idő alatt.
3. A munkánk során nem csak hibrideket, de szülői vonalakat is sikerült vizsgálni. Ennek nagy jelentősége van abból a szempontból, hogy a hibridvetőmag előállításnál fontos, hogy a szülői vonalak is homozigóták és genetikailag tiszták legyenek, mert ez az egyik fontos feltétele a hibrid fajta genetikai homogenitásának is.
4. A MALDI-TOF MS tömegspektrumok analízise során bebizonyosodott, hogy 2-30 kD molekulatömegű tartalékfehérjék vizsgálatkor azok a 2000-2500 m/z tartományban értékelhetők.
5. A kutatási eredményeink bizonyítják, hogy a MALDI-TOF MS készülékkel kapott tartalékfehérje tömegspektrumok alkalmasak különböző ön- és idegentermékenyülő növényfajok fajtáinak genetikai homogenitás vizsgálatára az 1-25000 m/z tartományban.

10. GYAKORLATBAN HASZNOSÍTHATÓ EREDMÉNYEK

1. Az általunk kifejlesztett módszer kukorica, búza, napraforgó, és szója vetőmagok esetében a mintaelőkészítés módjától függően, alkalmazható a vetőmag-minősítésben. Javasoljuk a vizsgált növényfajok eltérő magtípusú mintáinak a megdarálását az analízisek előtt.
2. A magas olaj-/zsírtartalmú növényfajoknál a homogenitási vizsgálat eredményeit befolyásolja az olaj- és/vagy a zsírtartalom, ezért a darálás után a napraforgó és a szója magokat 250 μ l ml hexán oldattal zsírtalanítani szükséges. Ennek hiányában a kapott eredmények nem a valóságot tükrözik.
3. Az analízisek alapján az említett növényfajok tartalékfehérjéinek vizsgálatához az SA- (3mg/250 μ l koncentrációban) vagy a HCCA mátrix (2,5mg/250 μ l koncentrációban) a legmegfelelőbbek.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. *ÁBRAHÁM, É. B. – PEPÓ, P.* (2021): A szója fajták fehérje- és olajtartalmának, valamint PO értékének változása eltérő tápanyag- és vízellátás mellet. *Növénytermelés*. 70 (1): 23-44.
2. *ADAMS, W. R. – HUANG, S. – KRIZ, A. L. – LUETHY, M. H.* (2004): Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of zeins in mature maize kernels. *Journal of agricultural and food chemistry*. 52 (7): 1842-1849.
3. *ADESEMOYE, A. O. - TORBERT, H. A. - KLOEPPER, J. W.* (2010): Increased plant uptake of nitrogen from ¹⁵N-depleted fertilizer using plant growth-promoting rhizobacteria. *Applied Soil Ecology*. 46 (1): 54-58.
4. *AGUSTINI, B. C. - SILVA L, P. – BLOCH, C. J. – BONFIM, T. M. B. – SILVA, G. A.* (2014): Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. *Applied Microbiology Biotechnology*. 98: 5645–5654.
5. *AHMAD, F. - BABALOLA, O. O. - TAK, H. I.* (2012): Potential of MALDI-TOF mass spectrometry as a rapid detection technique in plant pathology: identification of plant-associated microorganisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 404 (4): 1247-1255.
6. *ALBRETHSEN J.* (2011): The first decade of MALDI protein profiling: a lesson in translational biomarker research. *J. Proteomics*. 74: 765–773.
7. *ASBURY, G. R. - AL-SAAD, K. – SIEMS, W. F. – HANNAN, R. M. – HILL, JR. H. H.* (1999): Analysis of triacylglycerols and whole oils by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 10 (10): 983-991.
8. *BARNES, S. – COWARD, L. – KIRK, M. – SFAKIANOS, J.* (1998): HPLC-mass spectrometry analysis of isoflavones. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 217 (3): 254-262.
9. *BAU, H.-M.; VILLAUME, C. H.; MEJEAN, L* (2000): Effects of soybean (*Glycine max*) germination on biologically active components, nutritional values of seeds, and biological characteristics in rats. *Food/Nahrung*. 44 (1): 2-6.
10. *BAUCOM, R. S. – ESTILL, J. C. – CHAPARRO, C. – UPSHAW, N. – JOGI, A. – DERAGON, J.-M. – WESTERMAN, R. P. – SANMIGUEL, P. J. – BENNETZEN, J. L.* (2009): Exceptional Diversity, Non-Random Distribution, and Rapid Evolution of Retroelements in the B73 Maize Genome. *PLoS Genet* 5(11): e1000732.

11. *BENARD, S. – ARNHOLD, J. – LEHNERT, M. – SCHILLER, J. – ARNOLD, K. (1999):* Experiments towards quantification of saturated and polyunsaturated diacylglycerols by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry. *Chemistry and physics of lipids.* 100 (1-2): 115-125.
12. *BENEDUZI, A. – PASSAGLIA, L. M. P. (2011):* Genetic and Phenotypic Diversity of Plant Growth Promoting Bacilli. *Bacteria in Agrobiolology: Plant Growth Responses.* 1-20.
13. *BLACK, C. - CHEVALLIER, O. P. - ELLIOTT, C. T. (2016):* The current and potential applications of ambient mass spectrometry in detecting food fraud. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 82: 268-278.
14. *BONATTO, C. C. – SILVA, L. P. (2014):* Cocoa content influences chocolate molecular profile investigated by MALDI-TOF mass spectrometry. *Jornal of Science. Food Agric.* 95 (8): 1753-1756.
15. *BOUTAGHOU, M. N. - COLE, R. B. (2012):* 9, 10-Diphenylanthracene as a matrix for MALDI-MS electron transfer secondary reactions. *Journal of mass spectrometry.* 47 (8): 995-1003.
16. *BRAUN, M. – GALBÁCS, G. (2018):* Aktuális kutatási irányzatok az induktív csatolású plazma tömegspektrometriában. *Analitikai kémia.* 2: 1-5.
17. *BRAY, E. A. (1997):* Plant responses to water deficit. *Trends in plant science.* 2 (2): 48-54.
18. *BUGYI, Z. - TÖRÖK, K. - HAJAS, L. - ADONYI, Z. - POMS, R.E. - POPPING, B. - DIAZ-AMIGO, C. - KERBACH, S. - TÖMÖSKÖZI, S. (2012):* Development of incurred reference material for improving conditions of gluten quantification. *J. AOAC Int.* 95: 382–387.
19. *CALDERARO, A. – ARCANGELETTI, M.-C. – RODIGHIERO, I. – BUTTRINI, M. – GORRINI, C. – MOTTA, F. (2014):* Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. *Scientific Reports.* 4: 1-10.
20. *CALVANO, C. D. – VENTURA, G. – CATALDI, T. R. I. – PALMISANO, F. (2015):* Improvement of chlorophyll identification in foodstuffs by MALDI ToF/ToF mass spectrometry using 1, 5-diaminonaphthalene electron transfer secondary reaction matrix. *Analytical and bioanalytical chemistry.* 407.21: 6369-6379.
21. *CARUSO, G. - CAVALIERE, C. – FOGLIA, P. - GUBBIOTTI, R. - SAMPERI, R. – LAGANÀ, A. (2009):* Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Plant science.* 177 (6): 570-576.

22. CASTRO-PUYANA, M. - HERRERO, M. (2013): Metabolomics approaches based on mass spectrometry for food safety, quality and traceability. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 52: 74-87.
23. CAVANNA, D. – RIGHETTI, L. – ELLIOTT, C. – SUMAN, M. (2018): The scientific challenges in moving from targeted to non-targeted mass spectrometric methods for food fraud analysis: A proposed validation workflow to bring about a harmonized approach. *Trends in Food Science & Technology*. 80:223-241.
24. CHIVASA, S. – SIMON, W. J. – YU, X-L. – YALPANI, N. – SLABAS DR., A. R. (2005): Pathogen elicitor-induced changes in the maize extracellular matrix proteome. *Proteomics*. 5 (18): 4894-4904.
25. COZZOLINO, R. - DE GIULIO, B. (2010): Application of ESI and MALDI-TOF MS for triacylglycerols analysis in edible oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113 (2): 160-167.
26. CREYDT, M. - FISCHER, M. (2020): Food phenotyping: recording and processing of non-targeted liquid chromatography mass spectrometry data for verifying food authenticity. *Molecules*. 25 (17): 3972.
27. CUCU, T. - DE MEULENAER, B. - DEVREESE, B. (2012): MALDI based identification of soybean protein markers–Possible analytical targets for allergen detection in processed foods. *Peptides*. 33 (2): 187-196.
28. DARMAWAN, R. - BRINGE, N. A. - DE MEJIA, E. G. (2010): Antioxidant capacity of alcalase hydrolysates and protein profiles of two conventional and seven low glycinin soybean cultivars. *Plant foods for human nutrition*. 65 (3): 233-240.
29. DIECKMANN, R. – GRAEBER, I. – KAESLER, I. – SZEWZYK, U. - VON DÖHREN, H. (2005): Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by Intact-Cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). *Applied microbiology and biotechnology*. 67 (4): 539-548.
30. DIECKMANN, R. - HELMUTH, R. - ERHARD, M. - MALORNY B. (2008): Rapid Classification and Identification of Salmonellae at the Species and Subspecies Levels by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (24): 7767-7778.
31. DINGLE, T. C. - BUTLER-WU, S. M. (2013): MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification. *Clinics in laboratory medicine*. 33 (3): 589-609.
32. DUPONT, F. M. - ALTENBACH, S. B. (2003): Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *Journal of cereal science*. 38 (2): 133-146.

33. ELLIS, R. H. - HONG, T. D. - ROBERTS, E. H. (1995): Survival and vigour of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds stored at low and very-low moisture contents. *Annals of Botany*. 76 (5): 521-534.
34. ERNY, L. G. – MARINA, M. L. - CIFUENTES DR., A. (2007): CE-MS of zein proteins from conventional and transgenic maize. *Electrophoresis*. 28 (22): 4192-4201.
35. FENSELAU, C. - DEMIREV, P. A. (2001): Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*. 20 (4): 157-171.
36. FERREIRA, L. - SÁNCHEZ-JUANES, F. - GARCÍA-FRAILE, P. – RIVAS, R. – MATEOS, P. F. - MARTÍNEZ-MOLINA, F. - GONZÁLEZ-BUITRAGO, J. M. – VELÁZQUEZ, E. (2011): MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family Rhizobiaceae. *PLoS One*. 6 (5): e20223.
37. FRANC, V. – ŠEBELA, M. – ŘEHULKA, P – KONČITÍKOVÁ, R. – LENOBEL, R. – MADZAK, C. – KOPEČNÝ, D. (2012): Analysis of N-glycosylation in maize cytokinin oxidase/dehydrogenase 1 using a manual microgradient chromatographic separation coupled offline to MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Journal of proteomics*. 75 (13): 4027-4037.
38. FRANYÓ, D – ZUDORNÉ DR. DOMBRÁDI, ZS. R. (2015): MALDI-TOF tömegspektrometriás mérések optimalizálása, klinikai mintákból izolált *Staphylococcus lugdunensis* törzsek azonosításában. *Tavaszi Szél konferencia*. IV. kötet. 36-45.
39. FULDA, S. – MIKKAT, S. – STEGMANN, H. – HORN, R. (2011): Physiology and proteomics of drought stress acclimation in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Biology*. 13 (4): 632-642.
40. GAN, D. – ZHANG, J. – JIANG, H. – JIANG, T - ZHU, S. – CHENG, B. (2010): Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection. *Plant Cell Rep*. 29: 1261–1268.
41. GAO, B. – HOLROYD, E. S. – MOORE, C. J. – LAURVICK, K. – GENDEL, M. S. – XI, Z. (2019): Opportunities and Challenges Using Non-targeted Methods for Food Fraud Detection. *J. Agric. Food Chem*. 67 (31): 8425-8430.
42. GAO, L. – MA, W. – CHEN, J. – WANG, K. – LI, J. – WANG, S. – BEKES, F. – APPELS, R. – YAN, Y. (2010): Characterization and Comparative Analysis of Wheat High Molecular Weight Glutenin Subunits by SDS-PAGE, RP-HPLC, HPCE, and MALDI-TOF-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (5): 2777-2786.

43. GARCÍA-BENEYTEZ, E. - CABELLO, F. - REVILLA, E. (2003): Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (19): 5622-5629.
44. GHYSELINCK, J. – VAN HOORDE, K. – HOSTE, B. – HEYLEN, K. – DE VOS, P. (2011): Evaluation of MALDI-TOF MS as a tool for high-throughput dereplication. *Journal of microbiological methods*. 86 (3): 327-336.
45. GODOVAC-ZIMMERMANN, J. – BROWN, L. R. (2001): Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. *Mass spectrometry reviews*. 20 (1): 1-57.
46. GOTTLIEB, D. M. - SCHULTZ, J. - PETERSEN, M. - NESIC, L. - JACOBSEN, S. - SØNDERGAARD, I. (2002): Determination of wheat quality by mass spectrometry and multivariate data analysis. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 16 (21): 2034-2039.
47. GOU, H. – ZHANG, H. – LI, Y. – REN, J. – WANG, X. – NIU, H. – YIN, J. (2011): Identification of changes in wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds proteome in response to Anti-trx s gene. *PLoS ONE* 6(7): e22255.
48. HAJÓSNÉ, N. M. (1999): A genetikai variabilitás vizsgálata tartalékfehérjékkel In.: *Genetikai variabilitás a növénynevelésben (szerk)*. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 17- 21.
49. HAJÓSNÉ, N. M. (1999): Az izoenzim analízisek alkalmazásának lehetőségei In.: *Genetikai variabilitás a növénynevelésben (szerk)*. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 33-38.
50. HALÁSZ, Á. - HORVÁTH-SZANICS, E. - NAGY-GASZTONYI, M. - PAUK, J. - HAJÓS, GY. (2007): Traceability of enzyme activities and immune reactivity in albumin-globulin fractions of wide-range herbicide resistant transgenic (bar) wheat lines. *Cereal Research Communication*. 35: 1405–1413.
51. HASEGAWA, P. M. - BRESSAN, R. A. - ZHU, J. K. (2000): Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plant biology*. 51 (1): 463-499.
52. HASSOUN, A. - MÁGE, I. - SCHMIDT, W. F. - TEMIZ, H. T. - LI, L. - KIM, H-Y. - NILSEN, H. - BIANCOLILLO, A. - AÏT-KADDOUR, A. - SIKORSKI, M. - SIKORSKA, E. - GRASSI, S. - COZZOLINO, D. (2020): Fraud in animal origin food products: Advances in emerging spectroscopic detection methods over the past five years. *Foods*. 9 (8): 1069.
53. HAYNES, E. - JIMENEZ, E. - PARDO, M. A. - J.HELİYAR, J. S. (2019): The future of NGS (Next Generation Sequencing) analysis in testing food authenticity. *Food Control*, 101: 134-143.

54. HE, Z. H. - LIU, L. - XIA, X.C. - LIU, J. J. - PENA, R. J. (2005): Composition of HMW and LMW glutenin subunits and their effects on dough properties, pan bread, and noodle quality of Chinese bread wheats. *Cereal Chemistry*. 82 (4): 345-350.
55. HERMAN, E. M. – HELM, R. M. – JUNG, R. – KINNEY, A. J. (2003): Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant physiology*. 132(1): 36-43.
56. HILLENKAMP, F. – KARAS, M. – BEAVIS, R. C. – CHAIT, B. T. (1991): Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Analytical chemistry*. 63 (24): 1193A-1203A.
57. HOCHHOLDINGER DR, F. – WOLL, K. – GUO, L. – SCHNABLE, P. S. (2004): Lateral roots affect the proteome of the primary root of maize (*Zea mays* L.). *Plant Molecular Biology*. 56: 397–412.
58. HOCHHOLDINGER DR, F. – WOLL, K. – GUO, L. – SCHNABLE, P. S. (2005): The accumulation of abundant soluble proteins changes early in the development of the primary roots of maize (*Zea mays* L.). *Proteomics*. 5 (18): 4885-4893.
59. HOCHHOLDINGER DR, F. – WOLL, K. – GUO, L. – SCHNABLE, P. S. (2005): HOCHHOLDINGER, F. – GUO, L. – SCHNABLE, P. S. (2003): Cytoplasmic regulation of the accumulation of nuclear-encoded proteins in the mitochondrial proteome of maize. *The Plant Journal*. 37 (2): 199-208.
60. HOU, T.-Y. – CHIANG-NI, C. – TENG, S-H. (2019): Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of food and drug analysis*. 27 (2): 404-414.
61. HTTP1: https://www.ksh.hu/stadat_files/mez/hu/mez0021.html (letöltve: 2019.09.02)
62. HTTP2: https://www.ksh.hu/stadat_files/mez/hu/mez0022.html (letöltve: 2019.09.02)
63. HTTP3: https://ec.europa.eu/food/safety/food-fraud/whatdoes-it-mean_en (letöltve: 2019.08.17)
64. HTTP4: <https://pubsapp.acs.org/subscribe/archive/tcaw/12/i09/pdf/903chemchron.pdf> (letöltve: 2019.11.15)
65. HTTP5: European Commission. Food Fraud: What Does It Mean? Available online: https://ec.europa.eu/food/safety/food-fraud/whatdoes-it-mean_en (accessed on 21. May 2022).
66. HTTP6: RSTUDIO Team.:2022. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA. URL: <http://www.rstudio.com/> (letöltve: 2020.09.10)

67. *HTTP7: R CORE TEAM. (2022) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/> (letöltve: 2020.09.10)*
68. *HUANG, T. C. – FU, H. Y. - HO, C. T. (2003): Comparative studies on some quality attributes of firm tofu sterilized with traditional and autoclaving methods. Journal of agricultural and food chemistry. 51 (1): 254-259.*
69. *HUANG, Y. C. - KUO, M. I. (2015): Meng-I. Rheological characteristics and gelation of tofu made from ultra-high-pressure homogenized soymilk. Journal of Texture Studies. 46 (5): 335-344.*
70. *HURKMAN, W. J. - TANAKA, C. K. (1988): Polypeptide changes induced by salt stress, water deficit, and osmotic stress in barley roots: A comparison using two-dimensional gel electrophoresis. Electrophoresis. 9 (11): 781-787.*
71. *HUZSVAI L. – BALOGH P. (2015): Lineáris modellek az R-ben. Seneca Books, Debrecen. 28-34; 109–124.*
72. *ILINA E. N. - BOROVSKAYA A. D. - MALAKHOVA M. M. – VERESCHAGIN V. A. - KUBANOVA A. A. - KRUGLOV A. N. (2009): Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic Neisseria. Journal of Molecular Diagn. 11: 75–86.*
73. *JACKSON, E. A. - HOLT, L. M. - PAYNE, P. I. (1983): Characterisation of high molecular weight gliadin and low-molecular-weight glutenin subunits of wheat endosperm by two-dimensional electrophoresis and the chromosomal localisation of their controlling genes. Theoretical and Applied Genetics. 66 (1): 29-37.*
74. *JERGOVIĆ, A-M. – PERŠURIĆ, Z. – SAFTIĆ, L. – PAVELIĆ, S. K. (2017): Evaluation of MALDI-TOF/MS technology in olive oil adulteration. Journal of the American Oil Chemists' Society. 94 (6): 749-757.*
75. *JUHÁSZ, A. - COLGRAVE, M. L. - HOWITT, C. A. (2020): Developing gluten-free cereals and the role of proteomics in product safety. Journal of Cereal Science. 93: 102932.*
76. *KALÁSZ, H – BÁTHORI, M (1995): Chromatographic techniques in studies of the calcium channels and of calcium antagonists in physiological cells. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 14 (9): 442-449.*
77. *KAMAL, A. H. M. - KIM, K-H. - SHIN, D-H. - SEO, H-S. - SHIN, K-H. - PARK, C-S. - HEO, H-Y. - WOO, S-H. (2009): Proteomics profile of pre-harvest sprouting wheat by using MALDI-TOF mass spectrometry. Plant Omics. 2 (3): 110.*

78. KARAS, M. - BACHMANN, D. - BAHR, U. - HILLENKAMP, F. (1987): Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International journal of mass spectrometry and ion processes*, 1987, 78: 53-68.
79. KARAS, M. – HILLENKAMP, F (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons, *Anal. Chem.*, 60 (20): 2299-2301.
80. KAUFMANN, A. (2012). The current role of high-resolution mass spectrometry in food analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 403 (5): 1233-1249.
81. KEYS, C. J. - DARE, D. J. - SUTTON, H. - WELLS, G. - LUNT, M. - MCKENNA, T. - MCDOWALL, M. - SHAH, H. N. (2004): Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infection, Genetics and Evolution*. 4: 221–242.
82. KING, A. M. Y. - YOUNG, G. (1999): Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*. 99 (2): 213-218.
83. KONCZAK, I. - ZHANG, W. (2008): Anthocyanins—more than nature's colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2004 (5): 239.
84. KREBS, F. C. – JØRGENSEN, M. (2002): Controlling the Energy Levels of Conducting Polymers. Hydrogen versus Fluorine in Poly(dialkylterphenylenevinylene)s. *Macromolecules*. 35 (19): 7200-7206.
85. KUSSMANN, M. – NORDHOFF, E. – REHBEEK-NIELSEN, H. – HAEBEL, S. – ROSSEL-LARSEN, M. – JAKOBSEN, L. – GOBAN, J. – MIRGORODSKAYA, E. – KROLL-KRISTENSEN, A. – PALM, L. – ROEPSTORFF, P. (1997): Designed for Various Peptide and Protein Analytes. *Journal of Mass Spectrometry*. 32: 593-601.
86. LADE, B. S. - ROMÁN, C. - CUETO-GINZO, I. A. – SERRANO, L. – SIN, E. - ACHÓN, A. M. – MEDINA, V. (2018): Host-specific proteomic and growth analysis of maize and tomato seedlings inoculated with *Azospirillum brasilense* Sp7. *Plant Physiology and Biochemistry*. 129: 381-393.
87. LÁSZTITY, R (1981): Gabona fehérjék. Mezőgazda kiadó. Budapest.
88. LAVIGNE, J-P. - ESPINAL, P. - DUNYACH-REMY, C. - MESSAD, N. - PANTEL, A. – SOTTO, A. (2012): Mass spectrometry: a revolution in clinical microbiology? *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 51 (2): 257-270.
89. LÉVESQUE, S. – DUFRESNE, P. J. – SOUALHINE, H. – DOMINGO, M. C. – BEKAL, S. – LEFEBVRE, B. – TREMBLAY, C. (2015): A Side by Side Comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: Utility of MALDI-TOF MS Technology for Microorganism Identification in a Public Health Reference Laboratory. *PLoS ONE* 10 (12): e0144878.

90. LI, K. – XU, C. – ZHANG, K. – YANG, A. – PROFESSOR ZHANG, J. (2007): Proteomic analysis of roots growth and metabolic changes under phosphorus deficit in maize (*Zea mays* L.) plants. *Proteomics*. 7.9: 1501-1512.
91. LI, X. - BAI, H. – WANG, X. – LI, L. – CAO, Y. – WEI, J. – LIU, Y. – LIU, L. – GONG, X. - WU, L. – LIU, S. – LIU G. (2011): Identification and validation of rice reference proteins for western blotting. *Journal of experimental botany*. 62 (14): 4763-4772.
92. LI, Z. - NELSON, R. L. (2002): RAPD marker diversity among cultivated and wild soybean accessions from four Chinese provinces. *Crop science*. 42 (5): 1737-1744.
93. LIU, H. - DU, Z. - WANG, J. - YANG, R. (2007): Universal Sample Preparation Method for Characterization of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (6): 1899-1907.
94. LIU, H. H. - CHIEN, J. T. - KUO, M. I. (2013): Ultra high pressure homogenized soy flour for tofu making. *Food Hydrocolloids*. 32 (2): 278-285.
95. LIU, L. – IKEDA, T. M. – BRANLAND, G. – PEÑA, R. J. – ROGERS, W. J. – LERNER, S. E. – KOLMAN, M. A. – XIA, X. – WANG, L. – MA, W. – APPELS, R. – YOSHIDA, H. – WANG, A. – YAN, Y. – HE, Z. (2010): Comparison of low molecular weight glutenin subunits identified by SDS-PAGE, 2-DE, MALDI-TOF-MS and PCR in common wheat. *BMC Plant Biology*. 10 (124): 1-24.
96. LIU, L. – WANG, A. – APPELS, R. – MA, J. – XIA, X. – LAN, P. – HE, Z. – BEKES, F. – YAN, Y. – MA, W. (2009): A MALDI-TOF based analysis of high molecular weight glutenin subunits for wheat breeding. *Journal of Cereal Science*. 50 (2): 295-301.
97. LONOSKY, P. M. – ZHANG, X. – HONAVAR, V. G. – DOBBS, D. L. – FU, A. – RODERMEL, S. R. (2004): A Proteomic Analysis of Maize Chloroplast Biogenesis. *Plant Physiology*. 134 (2): 560-574.
98. LOPES, R. B. – FARIA, M. – SOUZA, D. A. – BLOCH, C. JR. – SILVA, L. P. – HUMBER, R. A. (2014): MALDI-TOF mass spectrometry applied to identifying species of insect-pathogenic fungi from *Metarhizium anisopliae* complex. *Mycologia*. 106: 865–878.
99. LÓPEZ, M. C. G. - GARCIA-CAÑAS, V. – ALEGRE, L. M. (2009): Reversed-phase high-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry profiling of transgenic and non-transgenic maize for cultivar characterization. *Journal of Chromatography A*. 1216 (43): 7222-7228.
100. MACRITCHIE, F. (1992): Physicochemical properties of wheat proteins in relation to functionality. In: *Advances in food and nutrition research*. Academic Press. 1-87.

101. *MARGIOTTA, B. – COLAPRICO, G. - D'OIDIO, R. – LAFIANDRA, D.* (1993): Characterization of high Mr subunits of glutenin by combined chromatographic (RP-HPLC) and electrophoretic separations and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses of their encoding genes. *Journal of Cereal Science.* 17 (3): 221-236.
102. *MAZZA, G. – KAY, C. D. – COTTRELL, T. – HOLUB, B. J.* (2002): Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *J. Agric Food Chem.* 50: 7731-7737.
103. *MCGRATH, C. S. – SCHIELTZ, M. D. – MCWILLIAMS, G. L. – PIRKLE, L. J. – BARR, R. J.* (2011): Detection and Quantification of Ricin in Beverages Using Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 83 (8): 2897-2905.
104. *MENNA, P. - BARCELLOS, F. G. - HUNGRIA, M.* (2009): Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of Bradyrhizobium strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and glnII, recA, atpD and dnaK genes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* 59 (12): 2934-2950.
105. *MIKA, A. - BUCK, F. - LÜTHJE, S.* (2008): Membrane-bound class III peroxidases: identification, biochemical properties and sequence analysis of isoenzymes purified from maize (*Zea mays* L.) roots. *Journal of Proteomics.* 71 (4): 412-424.
106. *MILLER, C. O. – SKOOG, F. – VON SALTZA, M. H. – STRONG, F. M.* (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid¹. *Journal of the American Chemical Society.* 77 (5): 1392-1392.
107. *MILOSAVLJEVIĆ V. - ZUGIC PETROVIC, T. - MLADENOVIC, K. - GRUJOVIĆ, M. - KOLAŠINAC R. - OROVIĆ D.* (2021): Quality assessment, antimicrobial activity organic sunflower honey and use of Maldi-tof mass spectrometry for the identification bacteria isolated from honey. *Progress in Nutrition.* 23 (2): 1-9.
108. *MORISASA, M. - SATO, T - KIMURA, K. - MORI, T. - GOTO-INOUE N.* (2019): Application of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging for Food Analysis. *Foods.* 8 (12): 633.
109. *MOSHAVERINIA, A. – ROOHPOUR, N. – CHEE, W. W. L. – SCHRICKER, S. R.* (2012): A review of polyelectrolyte modifications in conventional glass-ionomer dental cements. *Journal of materials chemistry.* 22 (7): 2824-2833.
110. *MUNNS, R. - JAMES, R. A. - LÄUCHLI, A.* (2006): Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of experimental botany.* 57 (5): 1025-1043.

111. NG, P. K. W. - BUSHUK, W. (1987): Glutenin of marquis wheat as a reference for estimating molecular weights of glutenin subunits by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chemistry*. 64 (5): 324-327.
112. O'KENNEDY, K. - FOX, G. - MANLEY, M. (2017): Zein characterisation of south african maize hybrids and their respective parental lines using MALDI-TOF MS. *Food analytical methods*. 10 (6): 1661-1668.
113. OBERT, J. C. - RIDLEY, W. P. - SCHNEIDER, R. W. - RIORDAN, S. G. - NEMETH, M. A. - TRUJILLO, W. A. - BREEZE, M. L. - SORBET, R. - ASTWOOD, J. D. (2004): The composition of grain and forage from glyphosate tolerant wheat MON 71800 is equivalent to that of conventional wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(5): 1375-1384.
114. OCAÑA, M. F. - FRASER, P. D. - PATEL, R. K. P. - HALKET, J. M. - BRAMLEY, P. M. (2007): Mass spectrometric detection of CP4 EPSPS in genetically modified soya and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*. 21(3): 319-328.
115. OSWALD-RICHTER, K. A. - BEACHBOARD, D. C. - SEELEY, E. H. - ABRAHAM, S. - SHEPHERD, B. E.-JENKINS, C. A. (2012): Dual analysis for mycobacteria and propionibacteria in sarcoidosis BAL. *J. Clinical Immunology*. 32: 1129-1140.
116. PANDEY, A. - MANN, M. (2000): Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 405 (6788): 837-846.
117. PARK, M. - KIM, C. - YANG, J. - LEE, H. - SHIN, W. - KIM, S - SA, T. (2005): Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*. 160 (2): 127-133.
118. PATEL, R. (2015): MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clinical chemistry*, 61 (1): 100-111.
119. PECHANOVA, O. - PECHAN, T. - OZKAN, S. - MCCARTHY, F. M. - WILLIAMS, P. - LUTHE, D. S. (2010): Proteome profile of the developing maize (*Zea mays* L.) rachis. *Proteomics*. 10(16): 3051-3055.
120. PICARIELLO, G. - PADUANO, A. - SACCHI, R. - ADDEO, F. (2009): MALDI-TOF mass spectrometry profiling of polar and nonpolar fractions in heated vegetable oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 (12): 5391-5400.

121. PINTO, T. C. A. – COSTA, N. S. – CASTRO, L. F. S. – RIBERIO, R. L. – BOTELHO, A. C. N. – NEVES, F. P. G. – PERALTA, J. M. – TEIXEIRA, L. M. (2017): Potential of MALDI-TOF MS as an alternative approach for capsular typing *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Scientific Reports*. 7: 45572.
122. PORUBLEVA, L. – VELDEN, K. V. – KOTHARI, S. – OLIVER, D. J. - CHITNIS DR., P. R. (2001): The proteome of maize leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide mass fingerprints. *Electrophoresis*. 22 (9): 1724-1738.
123. POWER, A.C. - NÉILL, C. N. - GEOGHEGAN, S. - CURRIVAN, S. - DEASY, M. - COZZOLINO, D. (2020): A brief history of whiskey adulteration and the role of spectroscopy combined with chemometrics in the detection of modern whiskey fraud. *Beverages*. 6 (3): 49.
124. QIAN, Y. – PRESTON, K. – KROKHIN, O. – MELLISH, J. – EN, W. (2008): Characterization of wheat gluten proteins by HPLC and MALDI TOF mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 19 (10): 1542-1550.
125. RAJAKARUNA, L. - HALLAS, G. - MOLENAAR, L. - DARE, D. - SUTTON, H. - ENCHEVA, V. - CULAK, R. - INNES, I. - BALL, G. - SEFTON, A. M. - EYDMANN, M. - KEARNS, A. M. - SHAH, H. N. (2009): High throughput identification of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* using MALDI-TOF-MS of intact cells. *Infection, Genetics and Evolution*. 9: 507–513.
126. RODIONOVA, O. Y. - POMERANTSEV, A. L. (2020): Chemometric tools for food fraud detection: The role of target class in non-targeted analysis. *Food chemistry*. 317: 126-448.
127. RODRÍGUEZ, Á. – JOSÉ, A. (2010): Characterization of Main Anthocyanins Extracted from Pericarp Blue Corn by MALDI-ToF MS. *Food Analytical Methods*. 3: 1216.
128. RODRÍGUEZ, E. - KATIME, I. (2003): Some Mechanical Properties of Poly [(acrylic acid)-co-(itaconic acid)] Hydrogels. *Macromolecular Materials and Engineering*. 288 (8): 607-612.
129. RODRIGUEZ-SAONA, L. E. – ALLENDORF, M. E. (2011): Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. *Food Science and Technology*. 2:467–83
130. ROLIM, L. – SANTIAGO, T. R. – DOS REIS JUNIOR, F. B. – DE CARVALHO, M. I. - DO VALE, H. M. M. – HUNGRIA, M. - SILVA L. P. (2019): Identification of soybean Bradyrhizobium strains used in commercial inoculants in Brazil by MALDI-TOF mass spectrometry. *Brazilian Journal of Microbiology*. 50 (4): 905-914.

131. ROSSI, F. – FELIS, F. G. – MARTINELLI, A. – CALCAVECCHIA, B. – TORRIANI, S. (2016): Microbiological characteristics of fresh tofu produced in small industrial scale and identification of specific spoiling microorganisms (SSO). *LWT*. 70: 280-285.
132. ROSSI, S. – SERRANO, A. – GERBINO, V. – GIORGI, A. – DI FRANCESCO, L. – NENCINI, M. – BOZZO, F. – SCHININÀ, M. E. – BAGNI, C. – CESTRA, G. – CARRÌ, M. T. – ACHSEL, T. – COZZOLINO, M. (2015): Nuclear accumulation of mRNAs underlies G4C2-repeat-induced translational repression in a cellular model of C9orf72 ALS. *Journal of Cell Science*. 128 (9): 1787-1799.
133. SANDRIN T. R. - GOLDSTEIN J. E. (2013). MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrom. Rev.* 32: 188–217.
134. SAUER, M. – JAKOB, A. – NORDHEIM, A. – HOCHHOLDINGER, F. (2006): Proteomic analysis of shoot-borne root initiation in maize (*Zea mays* L.). *Proteomics*. 6 (8): 2530-2541.
135. SCHILLER, J. – ARNHOLD, J. – BERNARD, S. – MÜLLER, M. – REICH, S. – ARNOLD, K. (1999): Lipid analysis by matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry: A methodological approach. *Analytical biochemistry*. 267 (1): 46-56.
136. SCHILLER, J. – SÜß, R. – PETKOVI, M. – ARNOLD, K. (2002): Triacylglycerol analysis of vegetable oils by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (maldi-Tof) mass spectrometry and 31p Nmr spectroscopy. *Journal of food lipids*. 9 (3): 185-200.
137. SENG, P. – DRANCOURT, M. – GOURIET, F. – LA SCOLA, B. – FOURNIER, P-E. – ROLAIN, J. M. – RAOULT, D. (2009): Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*. 49 (4): 543-551.
138. SERRAZANETTI, D. I. – NDAGIJIMANA, M. – MISEROCCHI, C. – PERILLO, L. M. – GUERZONI, E. (2013): Fermented tofu: Enhancement of keeping quality and sensorial properties. *Food Control*. 34 (2): 336-346.
139. SHAH, D. M. - HORSCH, R. B. - KLEE, H. J. - KISHORE, G. M - WINTER, J. A - TUMER, N. G. E. - HIRONAKA, C. M. - SANDERS, P. R - GASSER, C. S - AYKENT, S. - SIEGEL, N. R. - ROGERS, S. G. - FRALEY, R. T. (1986): Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science*. 233 (4762): 478-481.
140. SIDRANSKY, D. – IRIZZARY, R. – CALIFANO, J. A. – LI, X. – REN, H. – BENOIT, N. (2003): Serum protein MALDI profiling to distinguish upper aerodigestive tract cancer patients from control subjects. *J. Natl. Cancer. Inst.* 95: 1711–1717.

141. *SIGNOR, L. - Erba, E. B.* (2013): Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometric Analysis of Intact Proteins Larger than 100 kDa. *Journal of Visualized Experiments.* 79: 1-7.
142. *SKOOG, F. - ARMSTRONG, D. J.* (1970): Cytokinins. *Annual review of plant physiology.* 21 (1): 359-384.
143. *SKYLAS, D. J. – COPELAND, L. – RATHMELL, W. G. – WRIGLEY, C. W.* (2001): The wheat-grain proteome as a basis for more efficient cultivar identification. *PROTEOMICS: International Edition.* 1 (12): 1542-1546.
144. *SKYLAS, D. J. – MACKINTOSH, J. A. – CORDWELL, S. J. – BASSEAL, D. J. – WALSH, B. J. – HARRY, J. – BLUMENTHAL, C. – COPELAND, L. – WRIGLEY, C. W. – RATHMELL, W.* (2000): Proteome approach to the characterisation of protein composition in the developing and mature wheat-grain endosperm. *Journal of Cereal Science.* 3 (2): 169-188.
145. *SOBOLEV, P. A. – THOMAS, F. – DONARSKI, J. – INGALLINA, C. – CIRCI, S. – MARINCOLA, F. C. – DONATELLA CAPITANI, D. – MANNINA, L.* (2019): Use of NMR applications to tackle future food fraud issues. *Trends in Food Science & Technology.* 91: 347-353.
146. *SØRENSEN, K. M. - KHAKIMOV, B. - ENGELSEN, S. B.* (2016): The use of rapid spectroscopic screening methods to detect adulteration of food raw materials and ingredients. *Current Opinion in Food Science.* 10: 45-51.
147. *SPARBIER K. - LANGE C. - JUNG J. - WIESER A. - SHUBERT S. KOSTRZEWA M.* (2013): Biotyper-based rapid resistance detection by stable-isotope labeling. *J. Clin. Microbiol.* 51: 3741–3748.
148. *STACHNIUK, A. - SUMARA, A. - MONTOWSKA, M. - FORNAL, E.* (2021): Liquid chromatography–mass spectrometry bottom-up proteomic methods in animal species analysis of processed meat for food authentication and the detection of adulterations. *Mass Spectrom. Rev.* 40: 3–30.
149. *STÁJER, A. – IBRAHIM, B. – GAJDÁCS, M. – BARÁTH, Z. – URBÁN, E.* (2020): A cervicofaciális actinomycosisok jellemzői és korszerű diagnosztikája: összefoglaló az irodalmi adatok alapján. *FOGORVOSI SZEMLE.* 113 (3): 96-104.
150. *ȘTEFĂNESCU, R. - BĂNCILĂ, S.* (2017): MALDI-TOF Mass Spectrometric Analysis of Zeins Extracted from Maize Seeds. *Acta Chem. Iasi.* 25: 73-86.
151. *STETS, M. I. – PINTO JR, A. S. – HUERGO, L. F. – DE SOUZA, F. M. – GUIMARÃES, V. F. – ALVES, A. C. – STEFFENS, M. B. R. – MONTEIRO, R. A. – DE OLIVEIRA*

- PEDROSA, F. – CRUZ, L. M.* (2013): Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. 165 (3-4): 167-174.
152. *SUAREZ, S. – FERRONI, A. – LOTZ, A. – JOLLEY, K. A. – GUÉRIN, P. – LETO, J. – DAUPHIN, B. – JAMET, A. – MAIDEN, M. C. J. – NASSI, X. – ARMENGAUD, J.* (2013): Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Journal of microbiological methods*. 94.3: 390-396.
153. *TATHAM, A. S. – FIELD, J. M. – KEEN, J. N. – JACKSON, P. J. – SHEWRY, P. R.* (1991): Purification and characterization of HMW glutenin subunits encoded by chromosome 1B of durum wheat (*Triticum durum*). *Journal of cereal science*. 14 (2): 111-116.
154. *TODA, F. – TANAKA, K.* (1988): Design of a new chiral host compound, trans-4,5-bis(hydroxydiphenylmethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxacyclopentane. An effective optical resolution of bicyclic enones through host-guest complex formation. *Tetrahedron Letters*. 29 (5): 551-554.
155. *TÖRÖK, K., HORVÁTH, V., HORVÁTH, Á., HAJAS, L., BUGYI, Z., TÖMÖSKÖZI, S.* (2014): Investigation of incurred single - and multi - component model food matrices for determination of food proteins triggering allergy and coeliac disease. *Eur. Food Res. Technol.* 239, 923–932.
156. *VALAND, R. - TANNA, S. - LAWSON, G. - BENGTSTRÖM, L.* (2020): A review of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy used in food adulteration and authenticity investigations. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 37 (1): 19-38.
157. *VERNAZA, M. G. – DIA, V. P. - DE MEJIA, E. G. – CHANG, Y. K.* (2012): Antioxidant and antiinflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. *Food chemistry*. 134 (4): 2217-2225.
158. *WANG, A. – LIU, L. – ISLAM, S. – APPLEBEE, M. – APPELS, R. – YAN, Y. – MA, W.* (2015): Identification of low molecular weight glutenin alleles by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *PloS one*. 10 (9): e0138981.
159. *WANG, C. – ZHOU, S. – DU, Q. – QIN, W. – WU, D. – RAHEEM, D. – YANG, W. – ZHANG, Q.* (2019): Shelf life prediction and food safety risk assessment of an innovative whole soybean curd based on predictive models. *Journal of food science and technology*. 56 (9): 4233-4241.
160. *WANG, H. – CAO, G. – PRIOR, R. L.* (1997): Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of agricultural and Food Chemistry*. 45(2): 304-309.

161. WANG, J. – KLIKS, M. M. – QU, W. – JUN, S. – GONGYI, S. – LI, Q. X. (2009): Rapid determination of the geographical origin of honey based on protein fingerprinting and barcoding using MALDI TOF MS. *J. Agric. Food Chem.* 57: 10081–10088.
162. WANG, J. - SPORNS, P. (2000): MALDI-TOF MS analysis of isoflavones in soy products. *Journal of agricultural and food chemistry.* 48 (12): 5887-5892.
163. WANG, J-F., GEIL, P. H. – KOLLING, D. R. J. – PADUA, G. W. (2003): Analysis of zein by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry.* 51 (20): 5849-5854.
164. WEISE, C. - ACHSTETTER, T. - KLOECK, G. - ARREY, T. - MOEHRING, T. - ZELLER, M. - STRUPAT, K. (2012): Characterization of triacylglycerides in vegetable oils upon MALDI LTQ orbitrap XL. Thermo Fisher Scientific, United States. Thermo Scientific. 1-7.
165. WELKER, M. - MOORE, E. R. B. (2011): Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Systematic and Applied Microbiology.* 34 (1): 2-11.
166. WIESER, A. – SCHNEIDER, L. – JUNG, J. – SCHUBERT, S. (2012): MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied microbiology and biotechnology.* 93 (3): 965-974.
167. WIESER, H. - ANTES, S. - SEILMEIER, W. (1998): Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal chemistry.* 75 (5): 644-650.
168. WU, L. – WANG, S. – CHEN, X. – WANG, X. – WU, L. - ZU, X. – CHEN, Y. (2013): Proteomic and phytohormone analysis of the response of maize (*Zea mays* L.) seedlings to sugarcane mosaic virus. *PLoS ONE* 8(7): e70295.
169. XING-DONG, X. - LI-YAN, X. - ZHONG-YING, S. - WEI-JIA, C. - JIAN-MIN L. - YA-LI H. - EN-MIN, L. (2002): Identification of differentially expressed proteins between human esophageal immortalized and carcinomatous cell lines by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF-mass spectrometry. 8 (5): 777-781.
170. YAHATA, E. - MARUYAMA-FUNATSUKI, W. - NISHIO, Z. - TABIKI, T. - TAKATA, K. - YAMAMOTO, Y. - TANIDA, M. - SARUYAMA DR., H. (2005 a): Wheat cultivar-specific proteins in grain revealed by 2-DE and their application to cultivar identification of flour. *Proteomics.* 5 (15): 3942-3953.

171. YAHATA, E. - MARUYAMA-FUNATSUKI, W. - NISHIO, Z. - TABIKI, T. - TAKATA, K. - YAMAMOTO, Y. - TANIDA, M. - SARUYAMA DR., H. (2005 b): Wheat cultivar-specific proteins in grain revealed by 2-DE and their application to cultivar identification of flour. *Proteomics*. 5 (15): 3942-3953.
172. ZAMBONIN, C. (2021): MALDI-TOF Mass Spectrometry Applications for Food Fraud Detection. *Appl. Sci.* 11 (8): 3374.
173. ZAPATA, I. - ZERBY, H. N. - WICK, M. (2009): Functional proteomic analysis predicts beef tenderness and the tenderness differential. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57 (11): 4956-4963.
174. ZEIMARAN, E. - KADIR, M. R. A. - NOR, H. M. - KAMARUL, T. - DJORDJEVIC, I. (2013): Synthesis and characterization of polyacids from palm acid oil and sunflower oil via addition reaction. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 23 (24): 6616-6619.
175. ZHANG, Q. - DONG, Y. - AN, X. - WANG, A. - ZHANG, Y. - LI, X. (2008): Characterization of HMW glutenin subunits in common wheat and related species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Journal of Cereal Science*. 47 (2): 252-261.
176. ZHAO, L. - JIA, L. - MA, B. - ZHONG, W. - HUANG, Y. - DUAN, F. (2021): Heat-resistant bacteria contamination investigation in Chinese soybean curd industrial processing using high-throughput gene sequencing and MALDI-TOF-MS. *LWT*. 147: 111618.
177. ZHENG, W. - PENG, Y. - MA, J. - APPELS, R. - SUN, D. - MA, W. (2011): High frequency of abnormal high molecular weight glutenin alleles in Chinese wheat landraces of the Yangtze-River region. *Journal of cereal science*. 54 (3): 401-408.
178. ZHU, J. - CHEN, S. - ALVAREZ, S. - ASIRVATHAM, V. S. - SCHACHTMAN, D. P. - WU, Y. - SHARP, R. E. (2006): Cell Wall Proteome in the Maize Primary Root Elongation Zone. I. Extraction and Identification of Water-Soluble and Lightly Ionically Bound Proteins. *Plant Physiology*. 140 (1): 311-325.
179. ZHU, Q. - WU, F. - SAITO, M. - TATSUMI, E. - YIN, L. (2016): Effect of magnesium salt concentration in water-in-oil emulsions on the physical properties and microstructure of tofu. *Food Chemistry*. 201: 197-204.
180. ZIEGLER, D. - POTHIER, J. F. - ARDLEY, J. - FOSSOU, R. K. - PFLÜGER, V. - DE MEYER, S. - VOGEL, G. - TONOLLA, M. - HOWIESON, J. - REEVE, W. - PERRET, X. (2015): Ribosomal protein biomarkers provide root nodule bacterial identification by MALDI-TOF MS. *Applied microbiology and biotechnology*. 99 (13): 5547-5562.

181. *ZIMMERMANN, S.* (2015): Modern Techniques for pathogen detection. Markono Print Media Pte Ltd. Singapore. 221-222.

12. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/260/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bojté Csilla
Doktori Iskola: Kerpely Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10056782

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Magyar nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (3)

1. **Bojté, C.**, Helenkár, A., Nagy, N. E., Tóth, B., Hajósné Novák, M., Micsinai, A., Parádi, I., Szemán-Nagy, G., Tálás, L., Bojtó, C., Nagy, J.: Búza (*Triticum aestivum* L.) vetőmagok minősítése MALDI-TOF MS módszerrel.
Növénytermelés. 70 (1), 45-57, 2021. ISSN: 0546-8191.
2. Kaszab, E., Háhn, J., **Bojté, C.**, Jiang, D., Kriszt, B., Szoboszlai, S.: Rhodococcus típusörzések atrazine biodegradációjára utaló biomarkerinek azonosítása MALDI-TOF MS módszerrel.
Ökotoxikol. 2 (2), 15-16, 2020. EISSN: 2732-2556.
3. **Bojté, C.**, Lovász, C., Lajkó, L., Tímár, E., Micsinai, A., Tóth, S. Z.: MALDI-TOF módszer alkalmazhatóságának vizsgálata napraforgó genetikai azonosság vizsgálatokban.
Agrártud. Közl. 72, 33-38, 2017. ISSN: 1587-1282.

Idegen nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

4. **Bojté, C.**, Lovász, C., Tímár, E., Lajkó, L., Nagy, J., Nagy, N. E., Bodnár, K. B., Czerődiné Kempf, L., Horváth, B., Micsinai, A., Tóth, S. Z.: Development of seed analyses by means of various matrix solutions and the MALDI-TOF MS technique.
Agrártud. Közl. 2019 (1), 53-57, 2019. ISSN: 1587-1282.
DOI: <http://dx.doi.org/10.34101/actaagrar/1/2370>

Magyar nyelvű konferencia közlemények (1)

5. Hajósné Novák, M., Daood, H. G., **Bojté, C.**: A klasszikus mutációs szójanemesítés (*Glycine max* L Merrill) eredményei a SZIE genetikai és biotechnológia intézetében az 1990-es és 2010-es évek között.
In: Növénynevelés a 21. század elején: kihívások és válaszok : XXV. Növénynevelési Tudományos Nap 2019. Szerk.: Karsai Ildikó, MTA Agrártudományok Osztályának Növénynevelési Tudományos Bizottsága, Budapest, 313-317, 2019. ISBN: 9789638351456





Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (4)

6. Hajdú, E., Hajósné Novák, M., Szűcsné Varga, G., Vinogradov, S., **Bojté, C.**: A C. 50x Csereszegi fűszeres hibridpopuláció morfológiai és termesztési értékeinek értékelése.
In: XXVI. Növénynevelési Tudományos Napok : összefoglaló kötet. Szerk.: Bóna Lajos, Karsai Ildikó, Matuz János, Pauk János Polgár Zsolt, Veisz Ottó, Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft., Szeged, 85, 2020. ISBN: 9789635089307
7. **Bojté, C.**, Bojtor, C., Hajósné Novák, M., Illés, Á., Horváth, B., Lovász, C., Nagy, J., Czerődiné Kempf, L., Nagy, N. E., Tímár, E., Micsinai, A.: A szója (*Glycine max* L.) vetőmagok genetikai homogenitás vizsgálata MALDI-TOF Készülékkel.
In: Hungalimenteria 2019 : "Ésszel a kosárba" : konferencia és kiállítás, Wessling Hungary Kft., Budapest, 24-25, 2019.
8. **Bojté, C.**, Lovász, C., Tímár, E., Lajkó, L., Lukács, J., Micsinai, A., Tóth, S. Z.: Minta-előkészítési eljárások fejlesztése napraforgó vetőmagok MALDI-TOF MS vizsgálatára.
In: Tavasz szél konferencia 2018 Nemzetközi multidiszciplináris konferencia : Absztraktkötet. Szerk.: Keresztes Gábor, Doktoranduszok Országos Szövetsége, Budapest, 65, 2018. ISBN: 9786155586262
9. **Bojté, C.**, Lovász, C., Tímár, E., Lajkó, L., Lukács, J., Micsinai, A., Tóth, S. Z.: Napraforgó magvak vizsgálata MALDI-TOF MS módszerrel.
In: XXIV. Növénynevelési Tudományos Nap : Összefoglalók. Szerk.: Karsai Ildikó, Polgár Zsolt, Keszthelyi Burgonyáért Egyesület, Keszthely, 68, 2018. ISBN: 9786150014692

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (2)

10. Kaszab, E., Dongze, J., **Bojté, C.**, Micsinai, A., Kriszt, B., Szoboszlai, S.: The application of maldi-tof ms in the characterization of opportunistic pathogen *pseudomonas aeruginosa*.
In: A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2020. évi Nagygyűlése és a XIV. Fermentációs Kollokvium : Absztraktfűzet, Magyar Mikrobiológiai Társaság, Keszthely, 16, 2008.
11. **Bojté, C.**, Lovász, C., Tímár, E., Lajkó, L., Lukács, J., Micsinai, A., Tóth, S. Z.: Homogeneity testing of sunflower (*Helianthus annuus*) seeds by MALDI-TOF MS technique.
In: Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája. Szerk.: Tamás László, Zelenyánszki Helga, JATEPress, Szeged, 112, 2018. ISBN: 9789633153703





További közlemények

Magyar nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

12. Nagy, N. E., **Bojté, C.**, Tatárvári, K.: Eltérő szójatermesztési technológiák összehasonlító elemzése az igen korai éréscsoportban.
Gradus. 6 (2), 47-52, 2019. ISSN: 2064-8014.

Idegen nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

13. Huzsvai, L., Fejér, P., Illés, Á., Bojtó, C., **Bojté, C.**, Horváth, É., Demeter, C.: Analysis of sweet corn nutritional values using multivariate statistical methods.
Agrártud. Közl. 1, 103-108, 2021. ISSN: 1587-1282.
DOI: <http://dx.doi.org/10.34101/ACTAAGRAR/1/8587>

Magyar nyelvű konferencia közlemények (2)

14. Nagy, N. E., Popovics, T., **Bojté, C.**, Tatárvári, K.: Napjainkban elfogadott helyes agrotechnológia hatása a közép-magyarországi régióban termesztett gmo mentes szójabab termésátlagára, fehérje- és olajtartalmára.
In: XXXVII. Óvári Tudományos Napok, 2018. november 9-10. : Fenntartható agrárium és környezet, az Óvári Akadémia 200 éve - múlt, jelen, jövő. Szerk.: Szalka Éva, VEAB Agrártudományi Szakbizottság, Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Mosonmagyaróvár, 302-308, 2018. ISBN: 9786155837159
15. Nagy, N. E., Pepó, P., Tatárvári, K., **Bojté, C.**: Szójatermesztésben alkalmazható csávázó- és oltóanyagok hatása a termésátlagra és beltartalomra kisparcellás körülmények között.
In: XXXVII. Óvári Tudományos Napok, 2018. november 9-10. : Fenntartható agrárium és környezet, az Óvári Akadémia 200 éve - múlt, jelen, jövő. Szerk.: Szalka Éva, VEAB Agrártudományi Szakbizottság, Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Mosonmagyaróvár, 158-165, 2018. ISBN: 9786155837159

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (1)

16. Illés, Á., Bojtó, C., **Bojté, C.**, Nagy, J.: Effects of biostimulant foliar fertilization on maize (*Zea mays* L.) hybrid zinc content and yield parameter.
In: 4th Biostimulants World Congress : Abstract book for Oraland poster presentations, [s.n.], [Barcelona], 203, 2019.

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.05.25.



13.ÁBRÁK JEGYZÉKE

1. ábra: prottein mix kalibráló standard spektrumja
2. ábra: A napraforgó hántolt kaszatok hexános kezelése - kék spektrum előtte és piros spektrum utána
3. ábra: Szója baba esetében hexános kezelése - kék spektrum előtte és piros spektrum utána
4. *ábra:* 60% EtOH vizsgálat mintaelőkészítés folyamatábrája
5. ábra: Búza minták tartalékfehérjéinek M/Z értékei eltérő extrahálószer alkalmazása esetén
6. ábra: Kukorica minták tartalékfehérjéinek M/Z értékei eltérő extrahálószer esetén
7. ábra: Napraforgó kaszat minták tartalékfehérjéinek M/Z értékei eltérő extrahálószer esetén
8. ábra: Szója minták vizsgálati eredményei eltérő extrahálószer esetén
9. ábra: Napraforgó kaszatok NaCl semleges oldatának tömegspektruma (hántolva, darálva)
10. ábra: Napraforgó kaszatok NaCl savas oldatának tömegspektruma (hántolva darálva)
11. ábra: Napraforgó kaszatok 1- propanol oldatának tömegspektruma (hántolva darálva)
12. ábra: Napraforgó kaszatok 60% EtOH oldatának tömegspektruma (hántolva darálva)
13. ábra: Kukorica minták NaCl semleges oldatának tömegspektruma (hántolva, darálva)
14. ábra: Kukorica minták NaCl savas oldatának tömegspektruma (hántolva, darálva)
15. ábra: Kukorica minták 1-propanolos oldatának tömegspektruma (hántolva, darálva)
16. ábra: Kukorica minták 2-propanolos oldatának tömegspektruma (hántolva, darálva)
17. ábra: Kukorica minták 60%-os EtOH oldatának tömegspektruma (hántolva, darálva)
18. ábra: Szója minták NaCl semleges oldatának tömegspektruma (hántolva, darálva)
19. ábra: Szója minták NaCl savas oldatának tömegspektruma (hántolva, darálva)
20. ábra: Szója minták 1-propanolos oldatának tömegspektruma (hántolva, darálva)
21. ábra: Szója minták 2-propanolos oldatának tömegspektruma (hántolva, darálva)
22. ábra: Szója minták 60%-os EtOH oldatának tömegspektruma (hántolva, darálva)
23. ábra: Búza minták NaCl semleges oldatának tömegspektruma (hántolva, darálva)
24. ábra: Búza minták NaCl savas oldatának tömegspektruma (hántolva, darálva)
25. ábra: Búza minták 1-propanolos oldatának tömegspektruma (hántolva, darálva)
26. ábra: Búza minták 2-propanolos oldatának tömegspektruma (hántolva, darálva)
27. ábra: Búza minták 60%-os EtOH oldatának tömegspektruma (hántolva, darálva)
28. ábra: Darált Napraforgó kaszatok Spektrum elemzése
29. ábra: Darálatlan Napraforgó kaszatok Spektrum elemzése

30. ábra: Darált Búza minta Spektrum elemzése
31. ábra: Darálatlan Búza minta Spektrum elemzése
32. ábra: Darált Szója minta Spektrum elemzése
33. ábra: Darálatlan Szója minta Spektrum elemzése
34. ábra: Darált Kukorica minta Spektrum elemzése
35. ábra: Darálatlan Kukorica minta Spektrum elemzése

14. TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

1. táblázat: Búza vetésterületek és vetőmag felhasználás alakulása hazánkban a vizsgált időszakban (2016-2020. év)
2. táblázat: Szója vetésterületek és vetőmag felhasználás alakulása hazánkban a vizsgált időszakban (2016-2020. év)
3. táblázat: Kukorica vetésterületek és vetőmag felhasználás alakulása hazánkban a vizsgált időszakban (2016-2020. év)
4. táblázat: Napraforgó vetésterületek és vetőmag felhasználás alakulása hazánkban a vizsgált időszakban (2016-2020. év)
5. táblázat: Kalibrációs standard oldatok összetétele
6. táblázat: A kukorica (*Zea mays*) minták extraktumainak eltarthatósága (%) 4 °C-on 1 hónapig
7. táblázat: A szója (*Glycine max* (L.) Merr.) minták extraktumainak eltarthatósága (%) 4 °C-on 1 hónapig
8. táblázat: A napraforgó (*Heliantus annuus*) minták extraktumainak eltarthatósága (%) 4 °C-on 1 hónapig
9. táblázat: A búza (*Triticum aestivum*) minták extraktumainak eltarthatósága (%) 4 °C-on 1 hónapig
10. táblázat: Napraforgó kaszat – 1. minta- M/Z értékeinek kiértékelése (%)
11. táblázat: Napraforgó kaszat – 2. minta- M/Z értékeinek kiértékelése (%)
12. táblázat: Napraforgó kaszat – 3. minta- M/Z értékeinek kiértékelése (%)
13. táblázat: Napraforgó kaszat – 4. minta- M/Z értékeinek kiértékelése (%)
14. táblázat: Napraforgó kaszat – 5. minta- M/Z értékeinek kiértékelése (%)
15. táblázat: Napraforgó kaszat – 6. minta- M/Z értékeinek kiértékelése (%)
16. táblázat: Napraforgó kaszat – 7. minta- M/Z értékeinek kiértékelése (%)
17. táblázat: Napraforgó kaszat – 8. minta- M/Z értékeinek kiértékelése (%)
18. táblázat: Napraforgó kaszat – 9. minta- M/Z értékeinek kiértékelése (%)
19. táblázat: Napraforgó kaszat – 1. minta- M/Z értékeinek kiértékelése (%)
20. táblázat: Búza – 1. minta- M/Z értékeinek kiértékelése (%)
21. táblázat: Búza – 2. minta- M/Z értékeinek kiértékelése (%)
22. táblázat: Búza – 3. minta- M/Z értékeinek kiértékelése (%)
23. táblázat: Búza – 4. minta- M/Z értékeinek kiértékelése (%)
24. táblázat: Búza – 5. minta- M/Z értékeinek kiértékelése (%)

25. táblázat: Búza – 7. minta- M/Z értékeinek kiértékelése (%)
26. táblázat: Búza – 8. minta- M/Z értékeinek kiértékelése (%)
27. táblázat: Búza – 9. minta- M/Z értékeinek kiértékelése (%)
28. táblázat: Búza – 10. minta- M/Z értékeinek kiértékelése (%)
29. táblázat: Szója - 1. minta M/Z értékek kiértékelése
30. táblázat: Szója - 2. minta M/Z értékek kiértékelése
31. táblázat: Szója - 3. minta M/Z értékek kiértékelése
32. táblázat: Szója - 4. minta M/Z értékek kiértékelése
33. táblázat: Szója - 5. minta M/Z értékek kiértékelése
34. táblázat: Szója - 6. minta M/Z értékek kiértékelése
35. táblázat: Szója - 7. minta M/Z értékek kiértékelése
36. táblázat: Szója -8. minta M/Z értékek kiértékelése
37. táblázat: Szója - 9. minta M/Z értékek kiértékelése
38. táblázat: Szója - 10. minta M/Z értékek kiértékelése
39. táblázat: Kukorica - 1. minta M/Z értékek kiértékelése
40. táblázat: Kukorica - 2. minta M/Z értékek kiértékelése
41. táblázat: Kukorica - 3. minta M/Z értékek kiértékelése
42. táblázat: Kukorica - 4. minta M/Z értékek kiértékelése
43. táblázat: Kukorica - 5. minta M/Z értékek kiértékelése
44. táblázat: Kukorica - 6. minta M/Z értékek kiértékelése
45. táblázat: Kukorica - 7. minta M/Z értékek kiértékelése
46. táblázat: Kukorica - 8. minta M/Z értékek kiértékelése
47. táblázat: Kukorica - 9. minta M/Z értékek kiértékelése
48. táblázat: Kukorica - 10. minta M/Z értékek kiértékelése
49. táblázat: A búza mintákhoz alkalmazott extrahálószeres és az M/Z értékek közötti kapcsolat vizsgálata Pearson-féle analízissel
50. táblázat: A kukorica mintákhoz alkalmazott extrahálószeres és az M/Z értékek közötti kapcsolat vizsgálata Pearson-féle analízissel
51. táblázat: A napraforgó mintákhoz alkalmazott extrahálószeres és az M/Z értékek közötti kapcsolat vizsgálata Pearson-féle analízissel
52. táblázat: A szója mintákhoz alkalmazott extrahálószeres és az M/Z értékek közötti kapcsolat vizsgálata Pearson-féle analízissel

15.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom elsőként témavezetőimnek, **Dr. Micsinai Adriennek** és **Dr. Tóth Szilárdnak**, aki állandó irányításával és szakmai tanácsaival, meglátásaival segítette kutatómunkámat, hozzájárulva a disszertációm sikeres elkészüléséhez. Köszönöm **Dr. Lajkó Lászlónak** a témafelvetésért.

Köszönetem fejezem ki opponenseimnek, **Prof. Dr. Marton L. Csaba** tudományos főmunkatársnak és **Prof. Dr. Jolánkai Márton** professzor úrnak, a munkahelyi, valamint a nyilvános vitára elkészült doktori disszertációm lelkiismeretes és körültekintő bírálatáért.

Hatalmas köszönet **Lovász Csaba** okleveles vegyésznek, aki WESSLING Hungary volt munkatársa, hogy biológusként, sok analitikai eljárásra és vizsgálatra meg tanított.

Külön kiemelten köszönöm **Prof. Dr. Nagy János** professzor úrnak, valamint **Dr. Ragán Péternek** és **Dr. Ragánné Dr. Szabó Évának** a statisztikai elemzésekben nyújtott lelkiismeretes oktatásért és a dolgozatomban lévő statisztikai eredmények számítások vélelmezésért. Leírhatatlanul Köszönöm, **Prof. Dr. Kéki Sándornak** és munkatársainak, hogy lehetőségét adtak a vizsgálatim reprodukálásához emellett szakmai és emberi jó hangulatot biztosítva. Hatalmas köszönet **Dr. Szemán Nagy Gábornak** és munkatársainak a sok biztatásért.

Külön köszönöm **Hanuferné Dr. Horváth Brigittának** a barátságát a közös szakmai érdeklődés a MALDI-TOF vizsgálatok iránt. Köszönöm sors társamnak **Szarka Máténak**, akivel sokat biztattuk egymást a hosszú évek alatt.

Tisztelettel köszönöm **Dr. Helenkár Andrásnak** a szakmai segítségért a MALDI-TOF MS technológia megismerésért a fejlesztésekben való segítségért és munkatárásának **Dr. Turza Sándornak** a Flextra-Lab Kft ügyvezető igazgatójának a sok támogatásért.

Köszönettel tartozom Széles **Sándorné Gabika** néninek, **Dr. Kithné Nagy Fruzsínának** **Dorogi Zsuzsannának** és **Elek Erzsébetnek**, akik elengedhetetlen segítséget nyújtottak a doktori képzés alatt annak technikai megvalósításában, az adminisztrációs feladatok elvégzésében.

Végül, de nem utolsósorban köszönettel tartozom a **kisfiamnak**, **férjemnek** és **családomnak** az értekezés elkészítéséhez nyújtott teljes körű támogatásukért és türelmükért.

16.NYILATKOZATOK

NYILATKOZAT

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Kerpely Kálmán Doktori Iskola keretében készítettem, a Debreceni Egyetem doktori (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2022. 09. 21.

.....
a jelölt aláírása

Bojté Csilla

NYILATKOZAT

Tanúsítom, hogy **Bojté Csilla** doktorjelölt 2016-2019. között a fent megnevezett Doktori Iskola keretében irányítással végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javaslom.

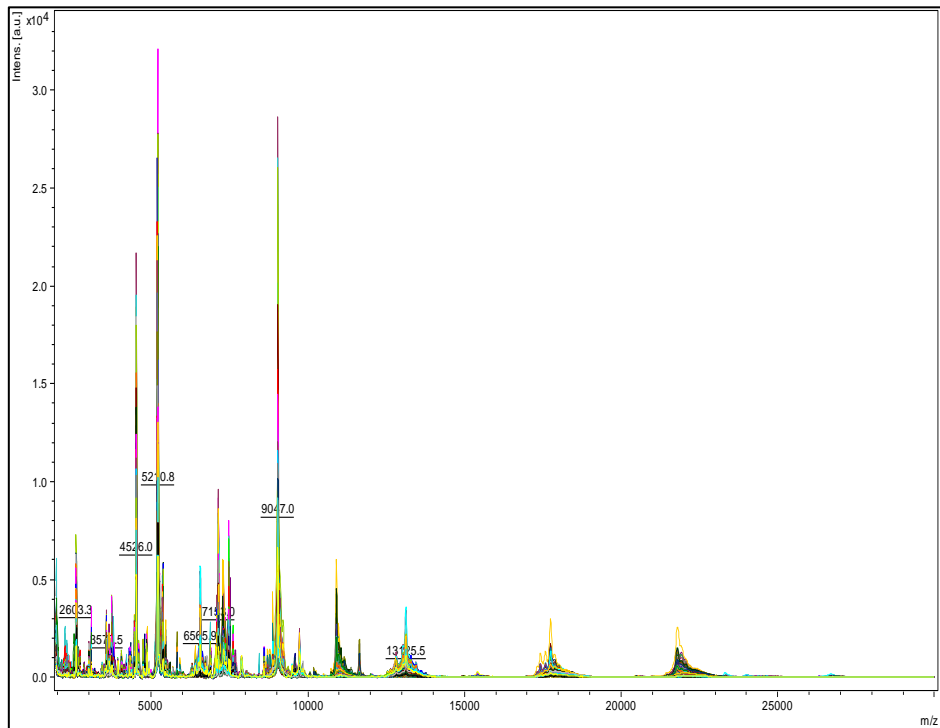
Debrecen, 2022. 09. 21.

.....
témavezető aláírása

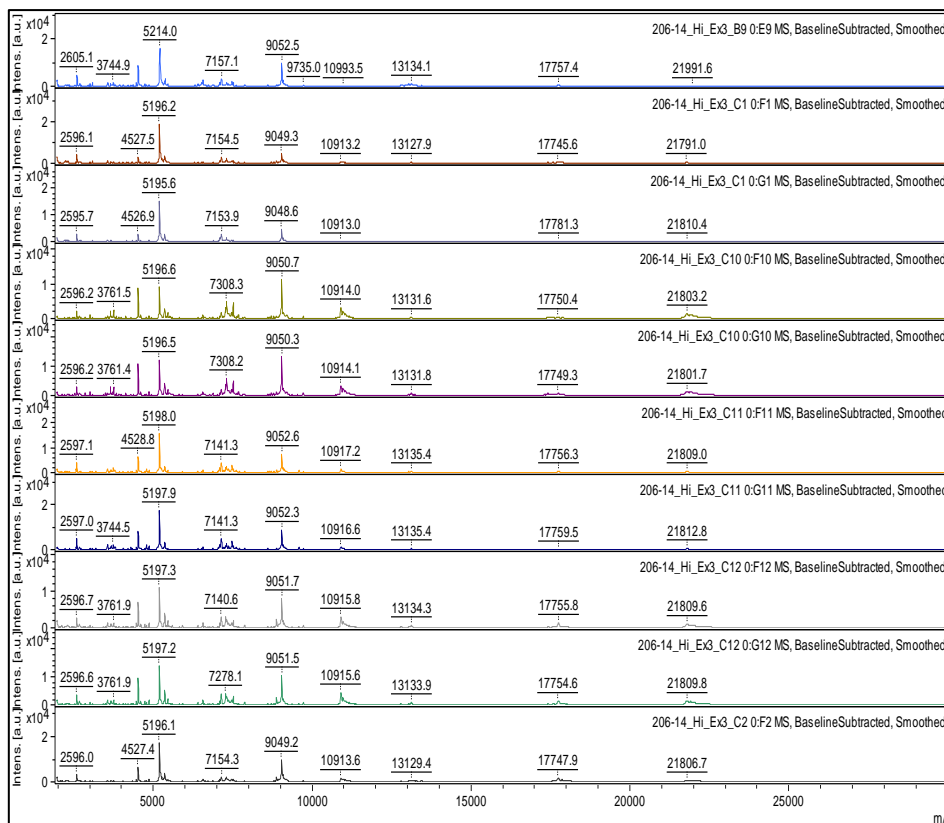
.....
társtémavezető aláírása

17.MELLÉKLETEK

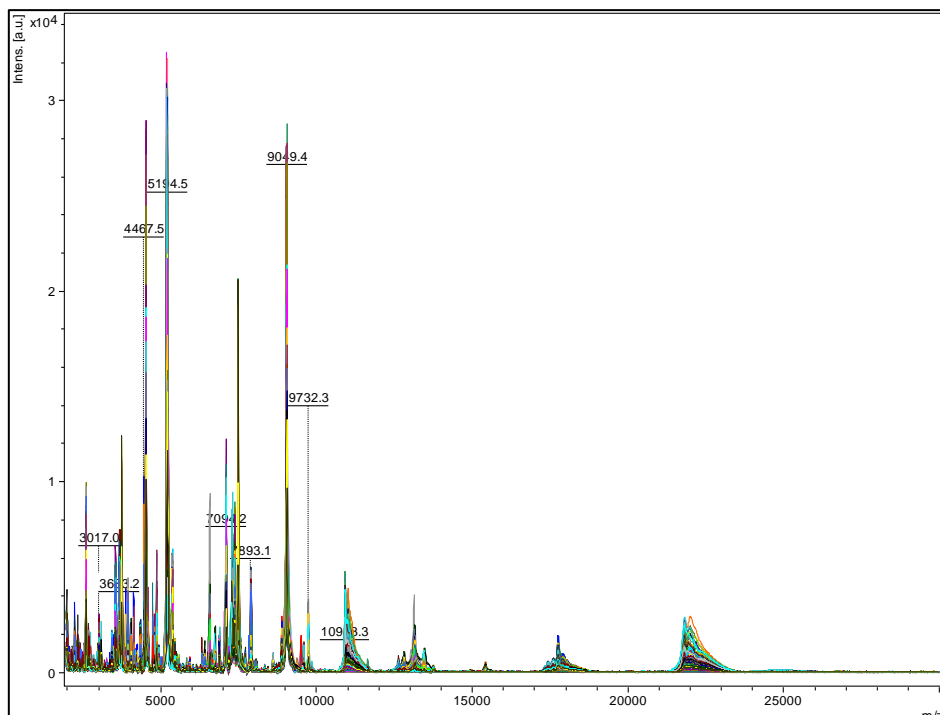
1. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 1. tétel – vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



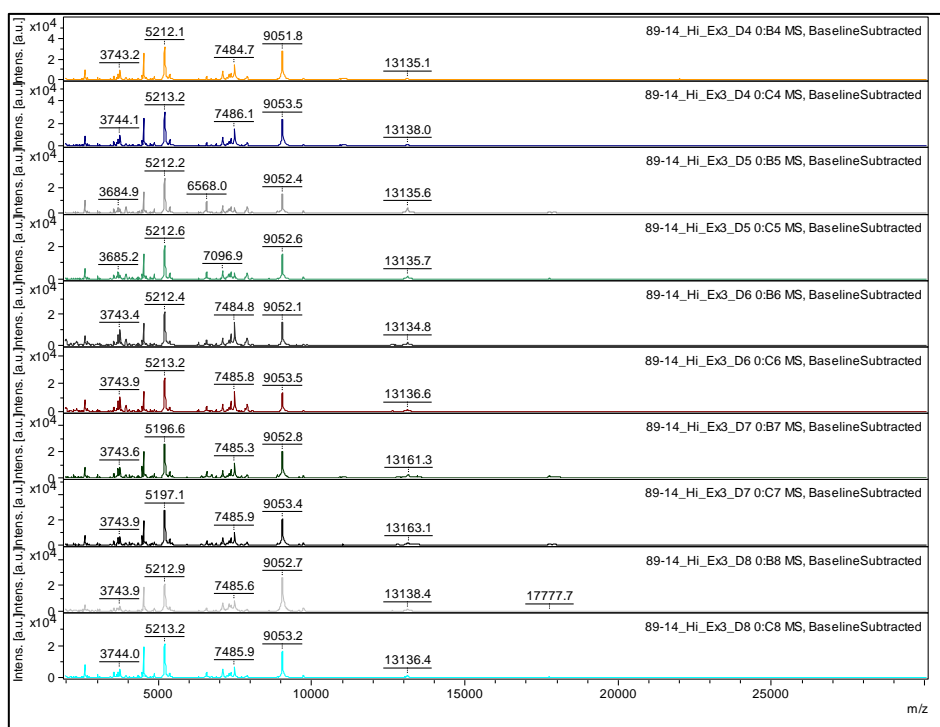
2. melléklet: *Kukorica (Zea mays)* – 1. tétel – 10 szem spektruma lista nézetben



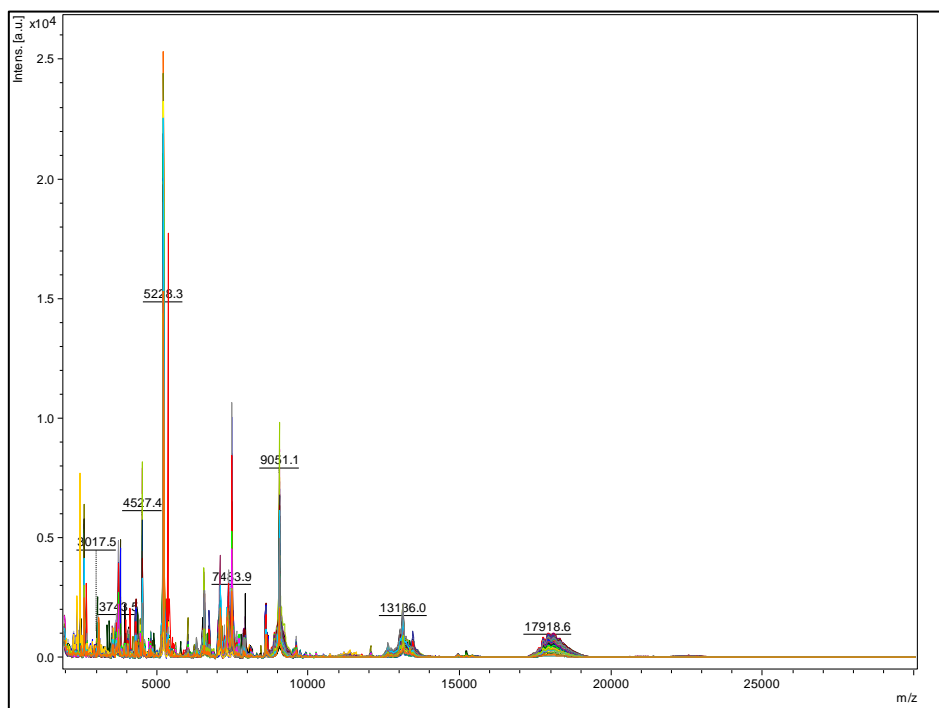
3. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 2. tétel – vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



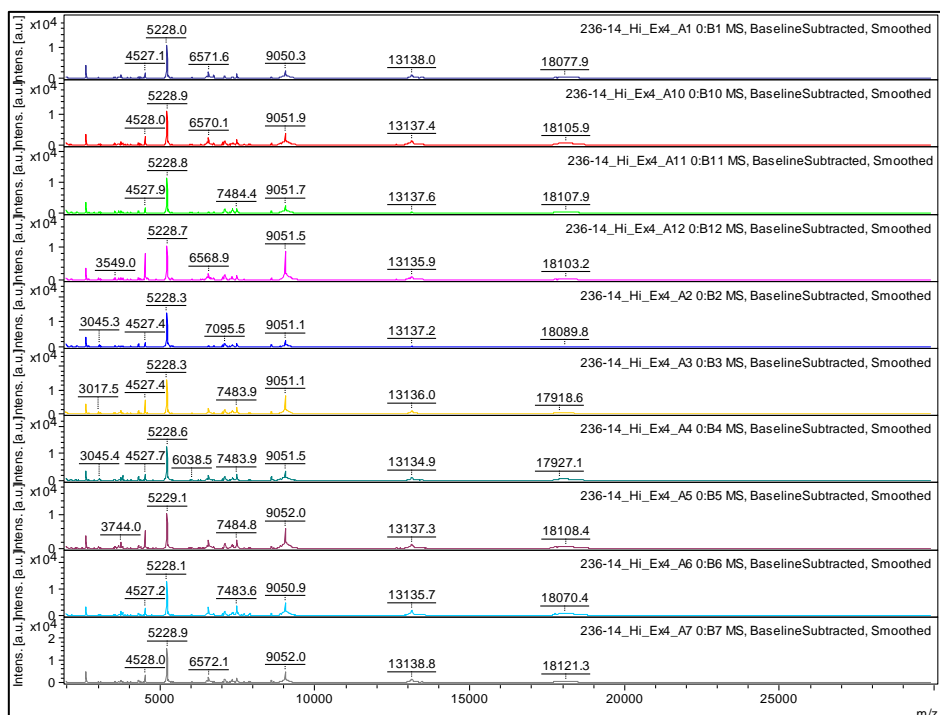
4. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 2. tétel – 10 szem spektruma lista nézetben



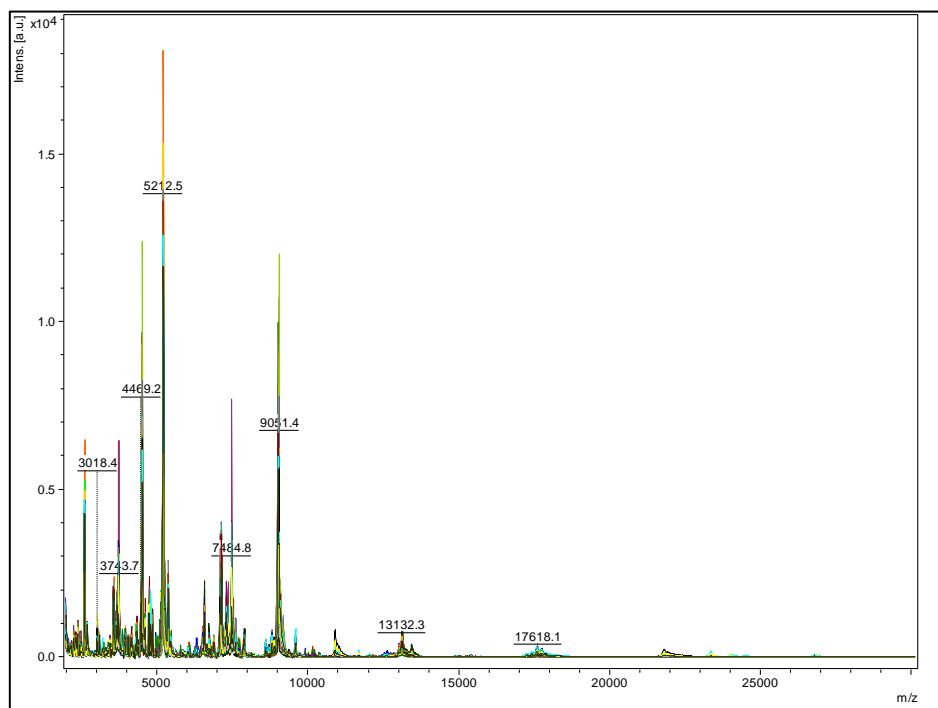
5. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 3. tétel – vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



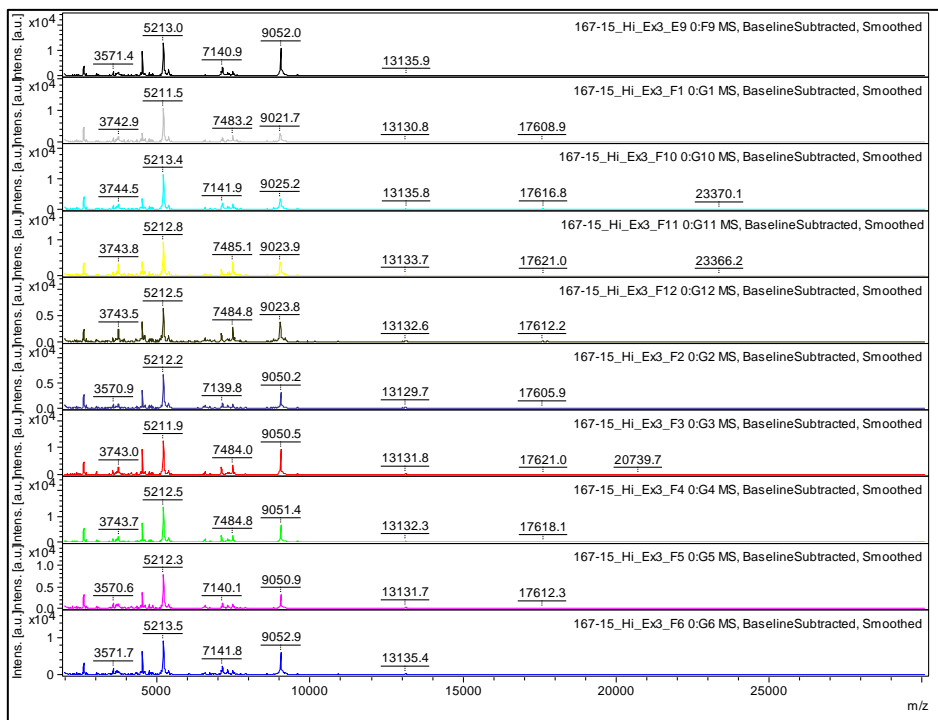
6. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 3. tétel – 10 szem spektruma lista nézetben



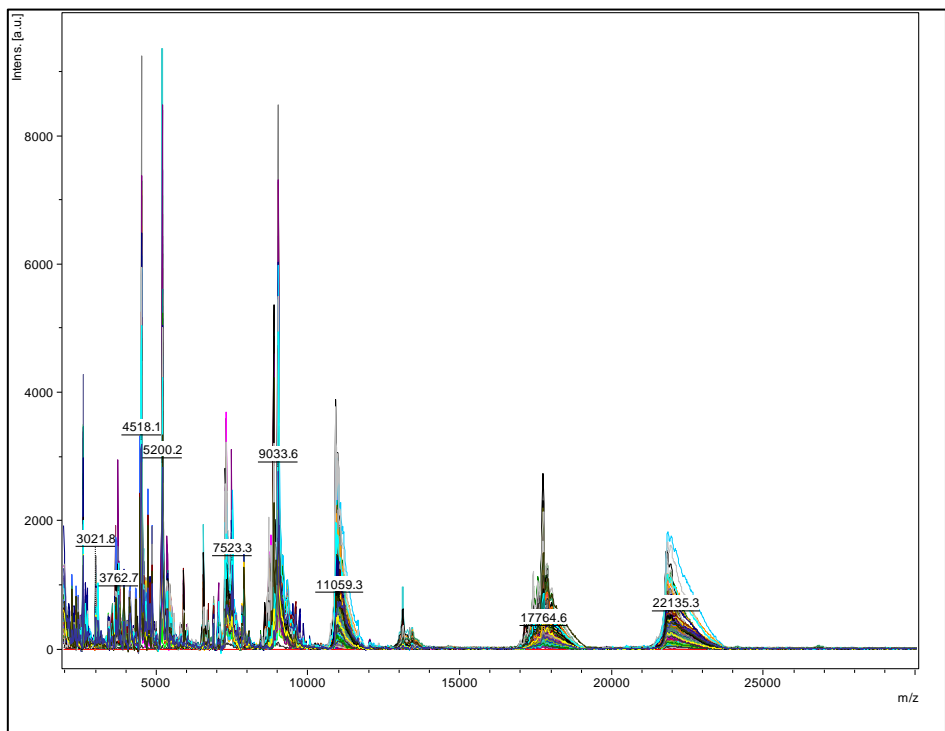
7. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 4. tétel – vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



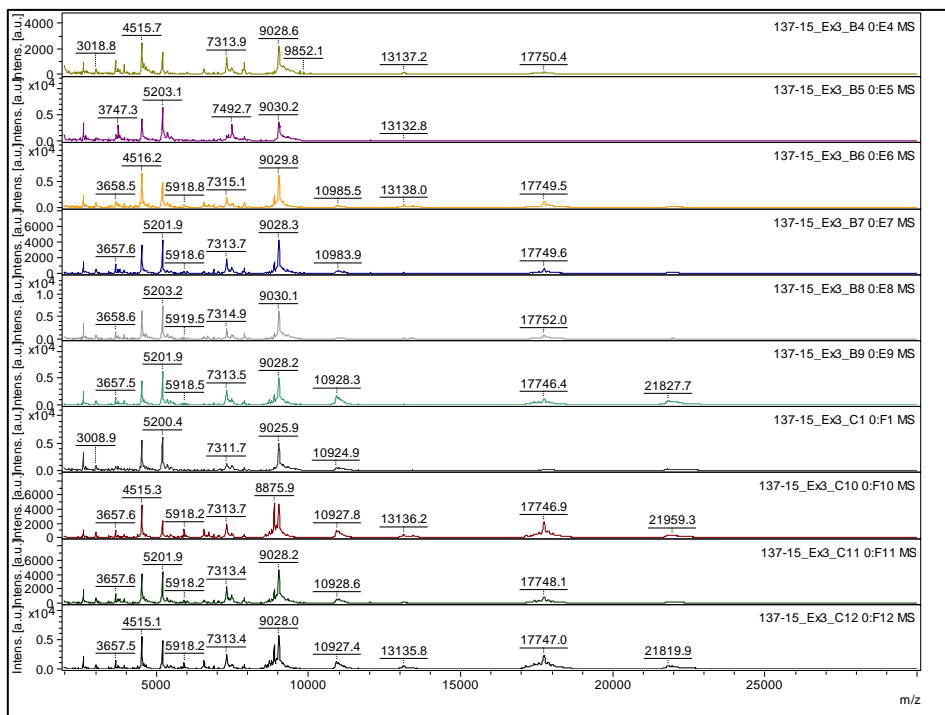
8. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 4. tétel – 10 szem spektruma lista nézetben



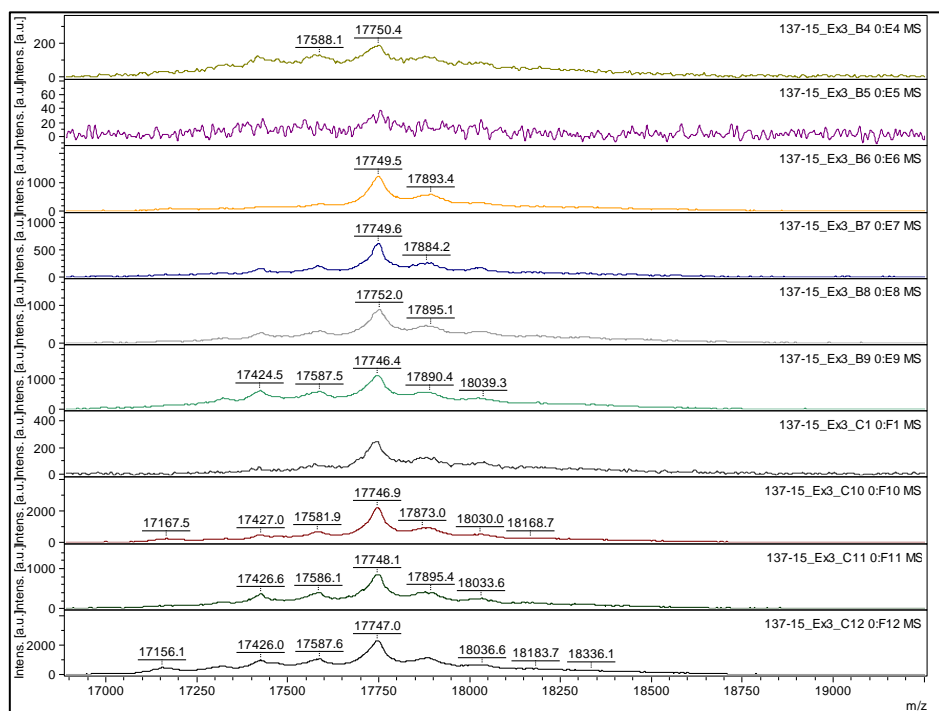
9. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 5. tétel – vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



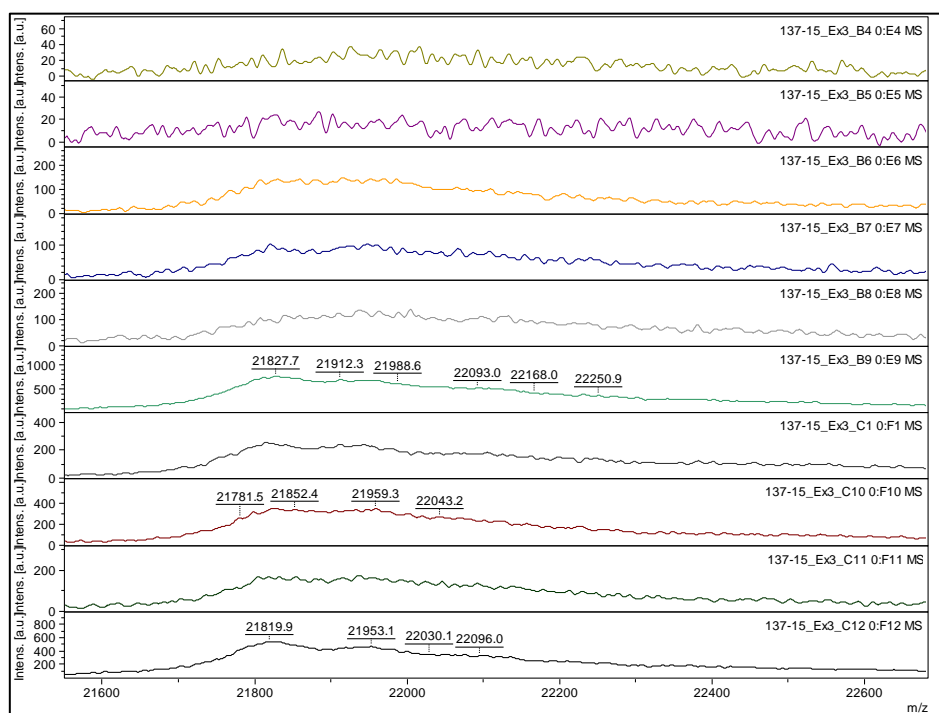
10. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 5. tétel – 10 szem spektruma lista nézetben



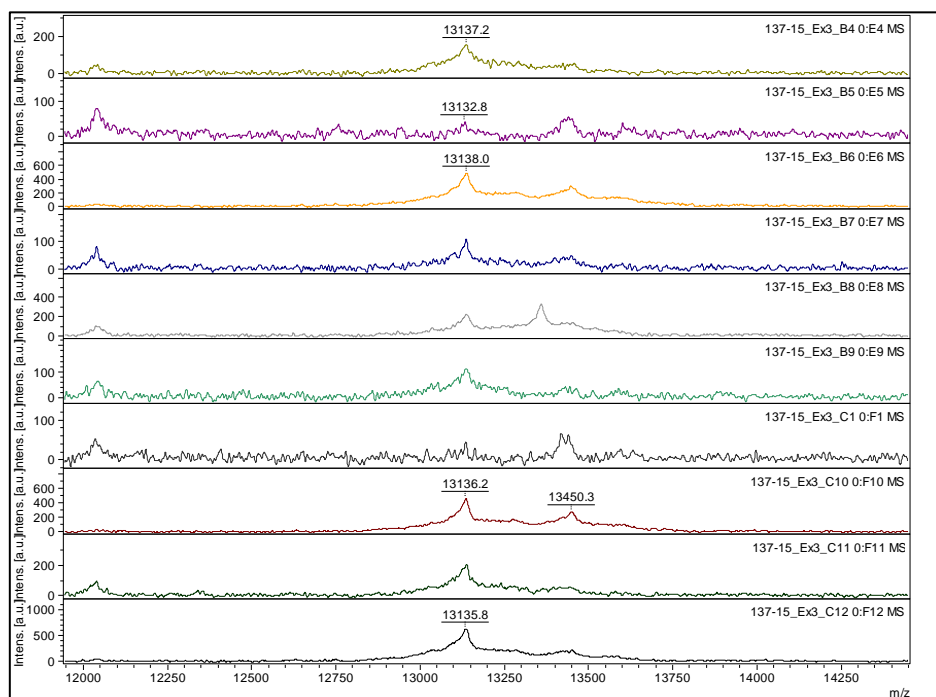
11. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 5. tétel – 10 szem spektruma lista nézetben



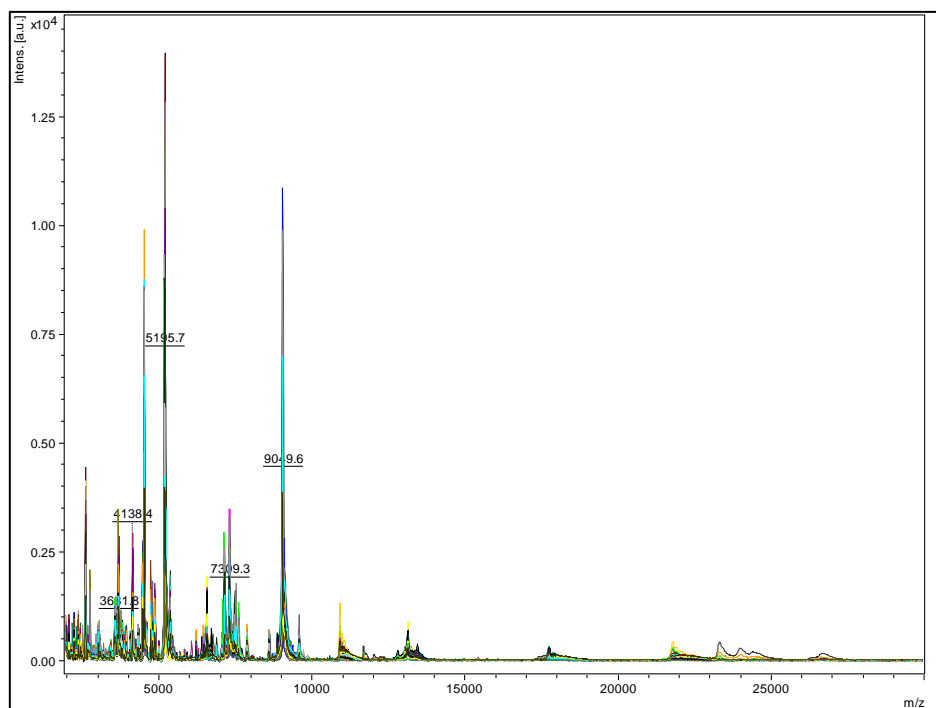
12. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 5. tétel – 10 szem spektruma lista nézetben



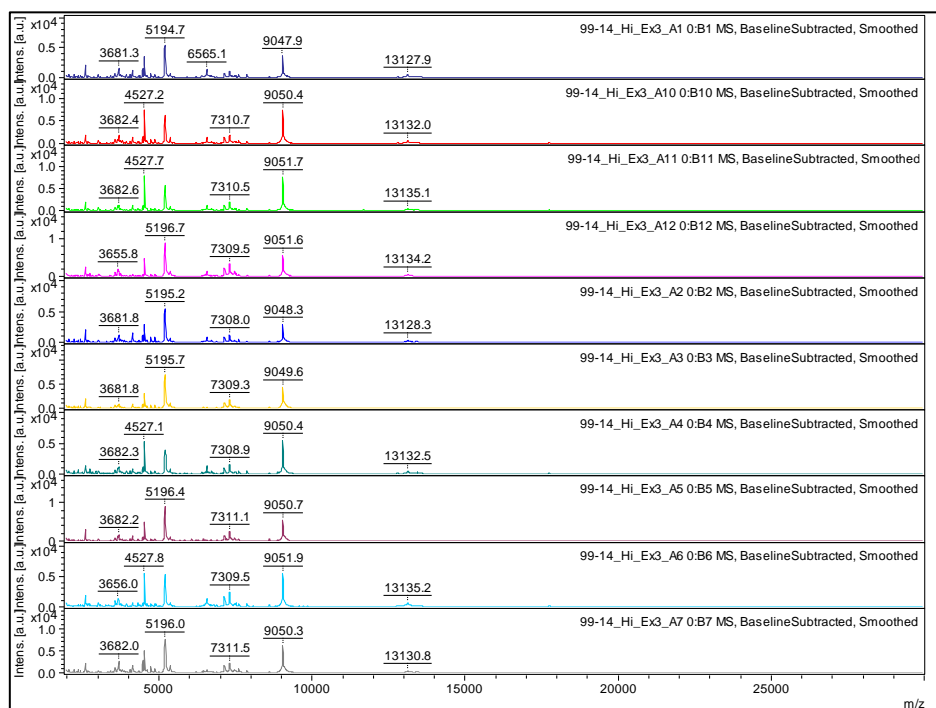
13. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 5. tétel – 10 szem spektruma lista nézetben



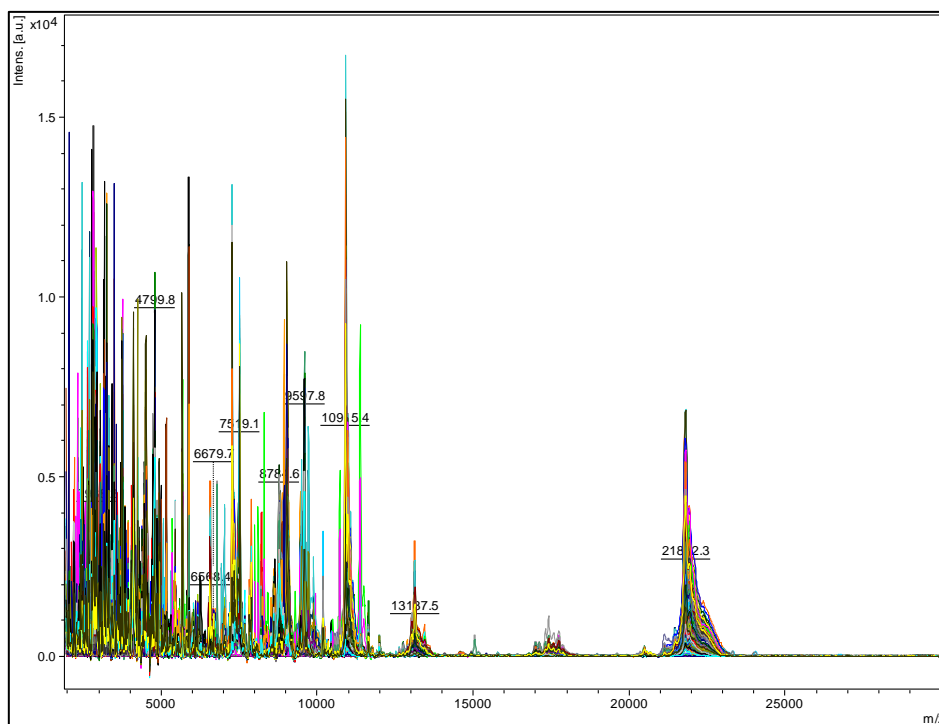
14. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 6. tétel – vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



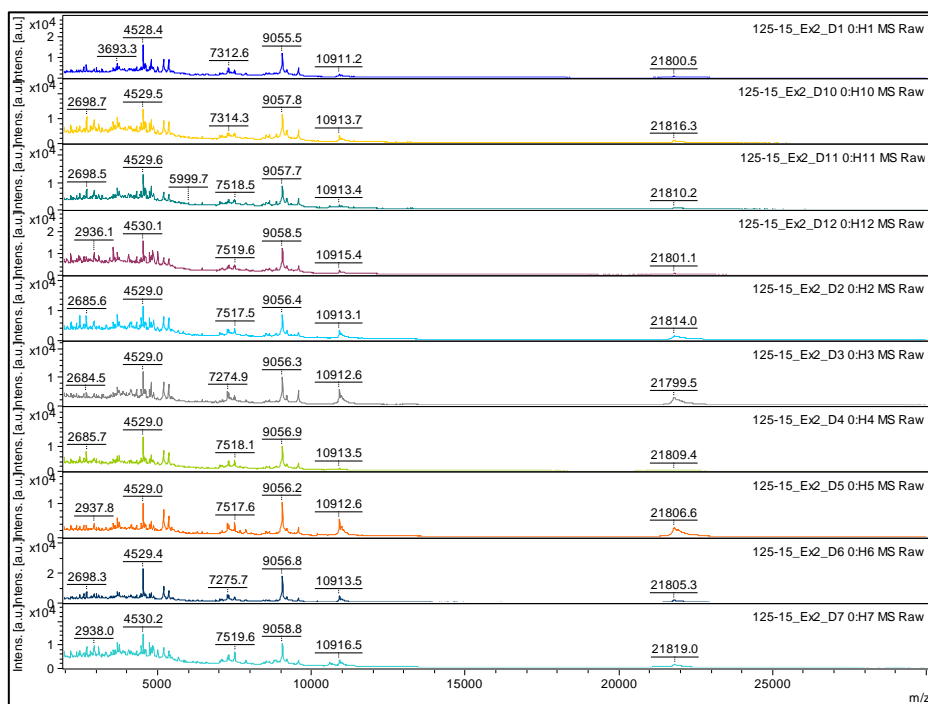
15. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 6. tétel – 10 szem spektruma lista nézetben



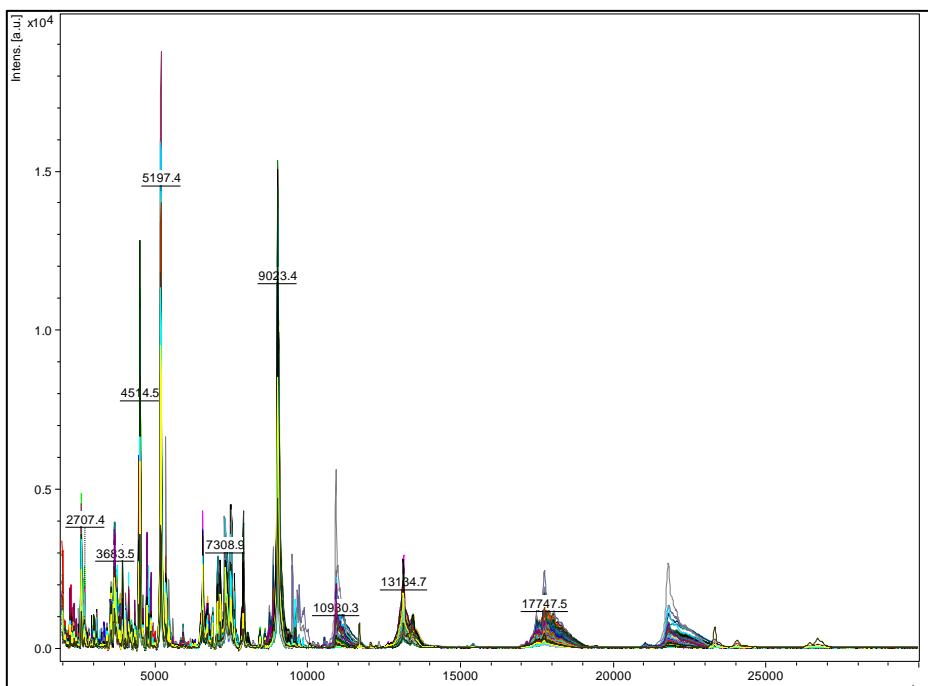
16. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 7. tétel – vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



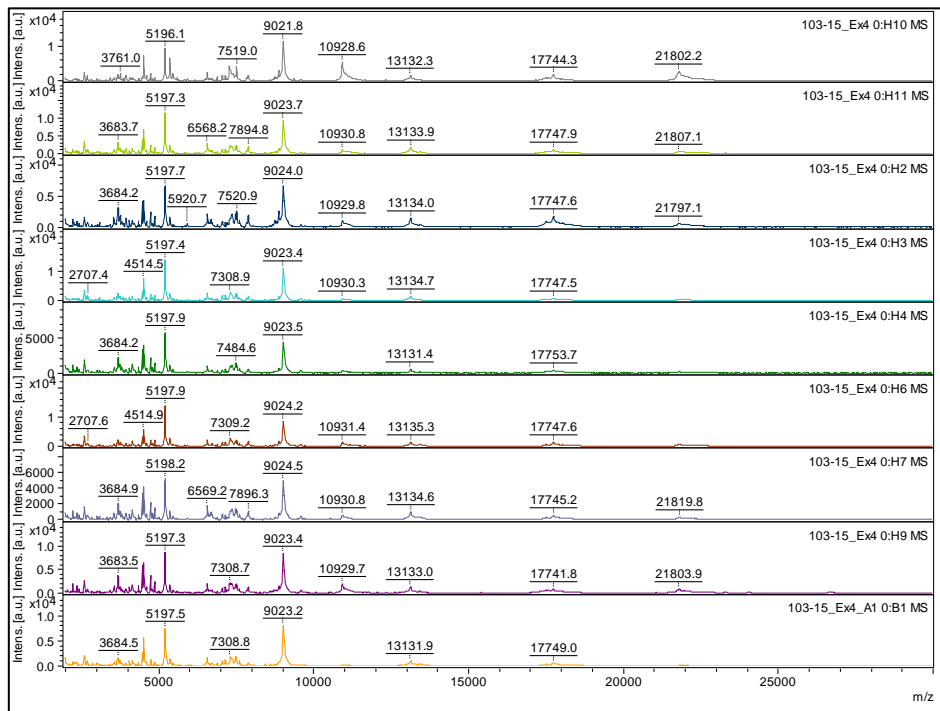
17. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 7. tétel – 10 szem spektruma lista nézetben



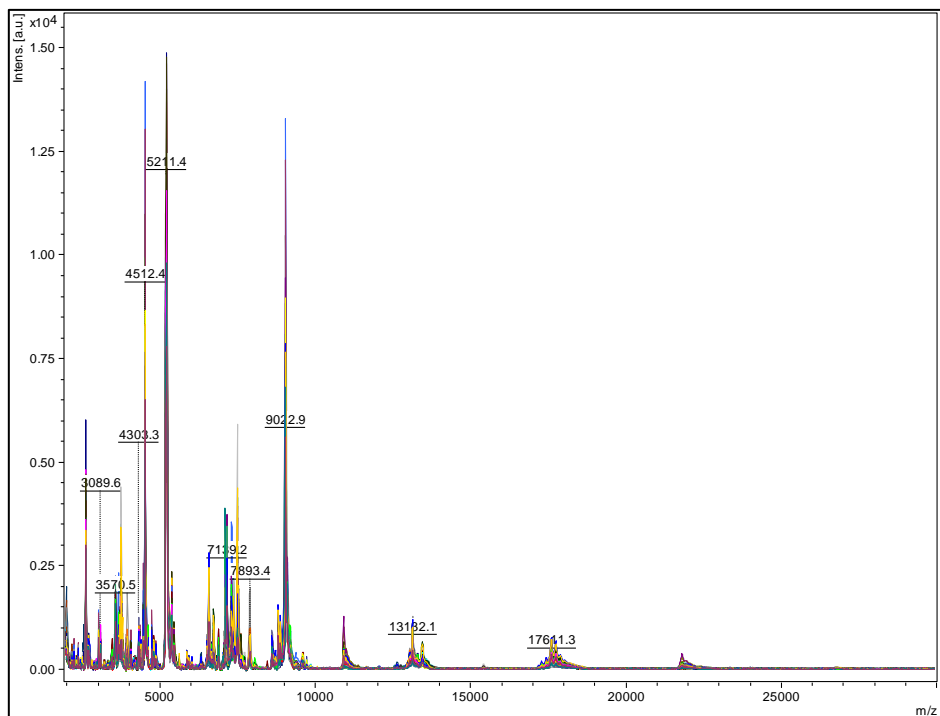
18. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 8. tétel – vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



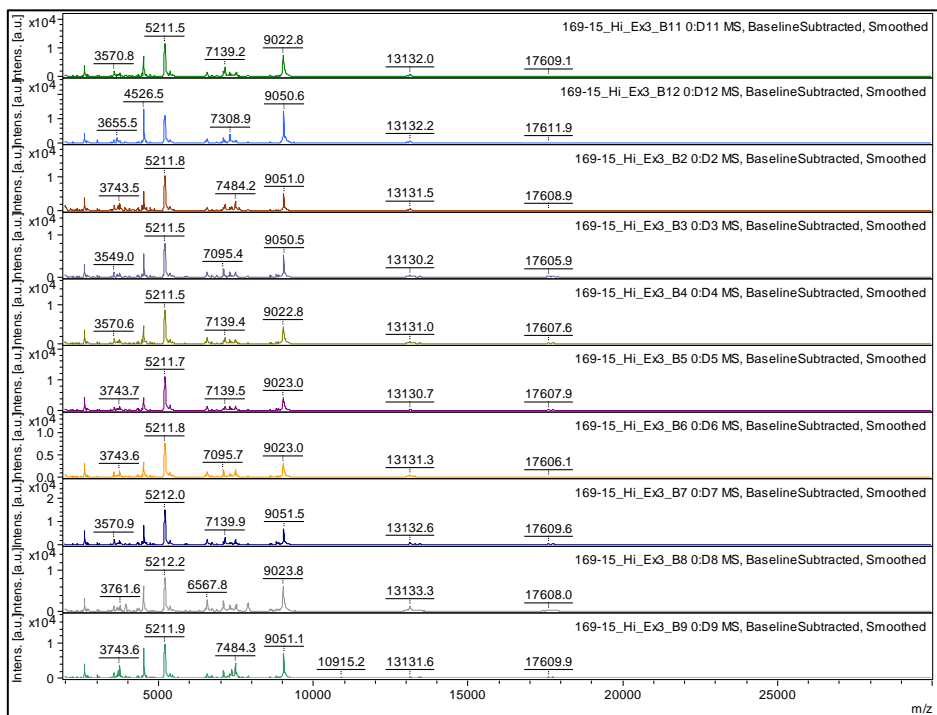
19. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 8. tétel – 10 szem spektruma lista nézetben



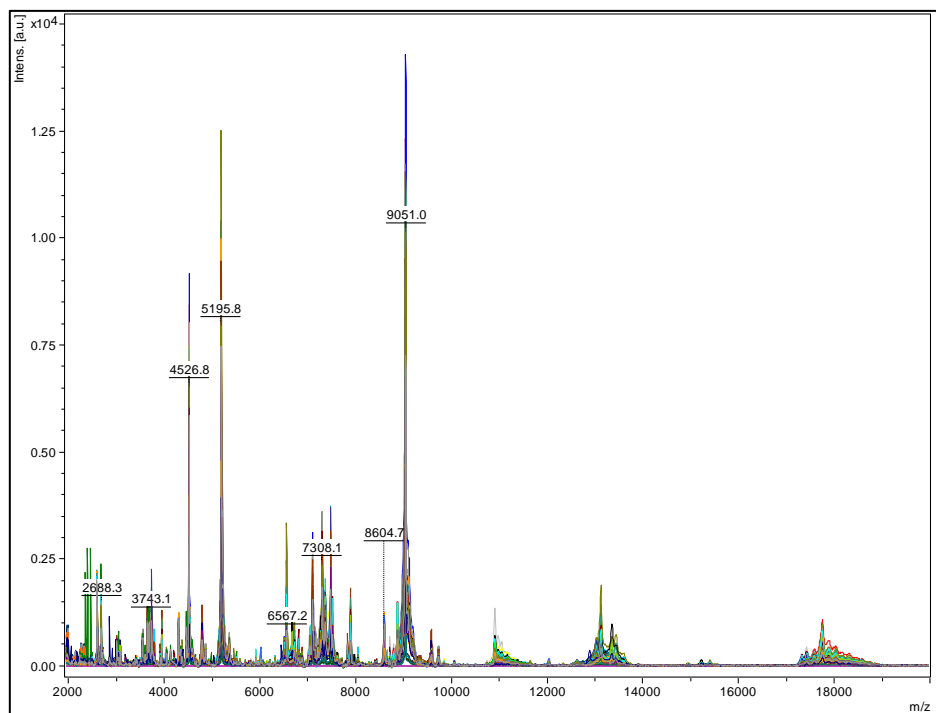
20. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 9. tétel – vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



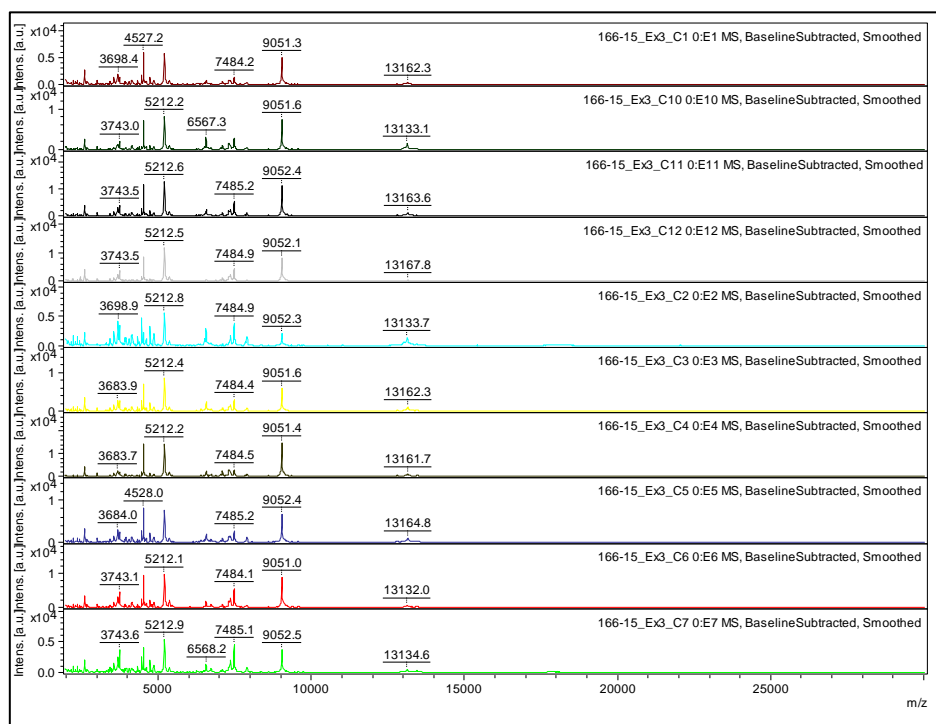
21. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 9. tétel – 10 szem spektruma lista nézetben



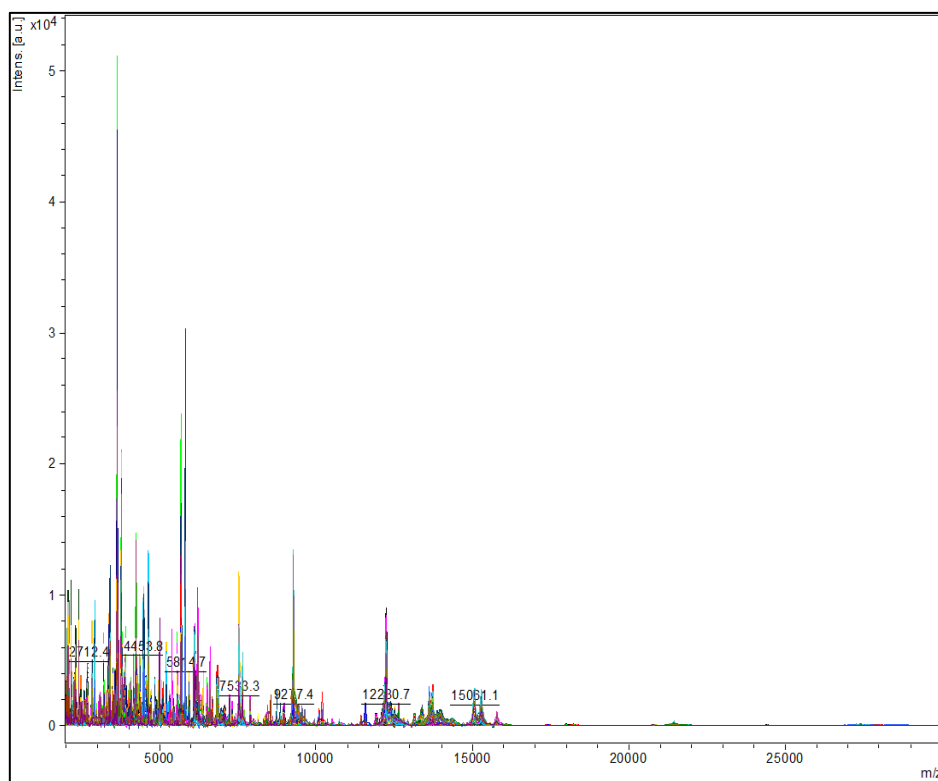
22. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 10. tétel – vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



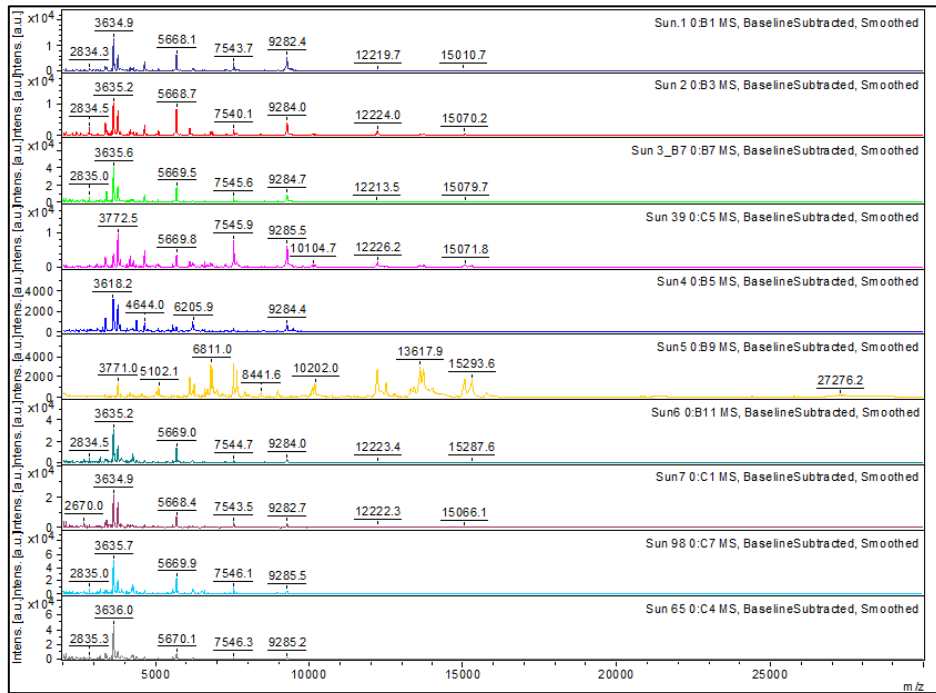
23. melléklet: Kukorica (*Zea mays*) – 9. tétel – 10 szem spektruma lista nézetben



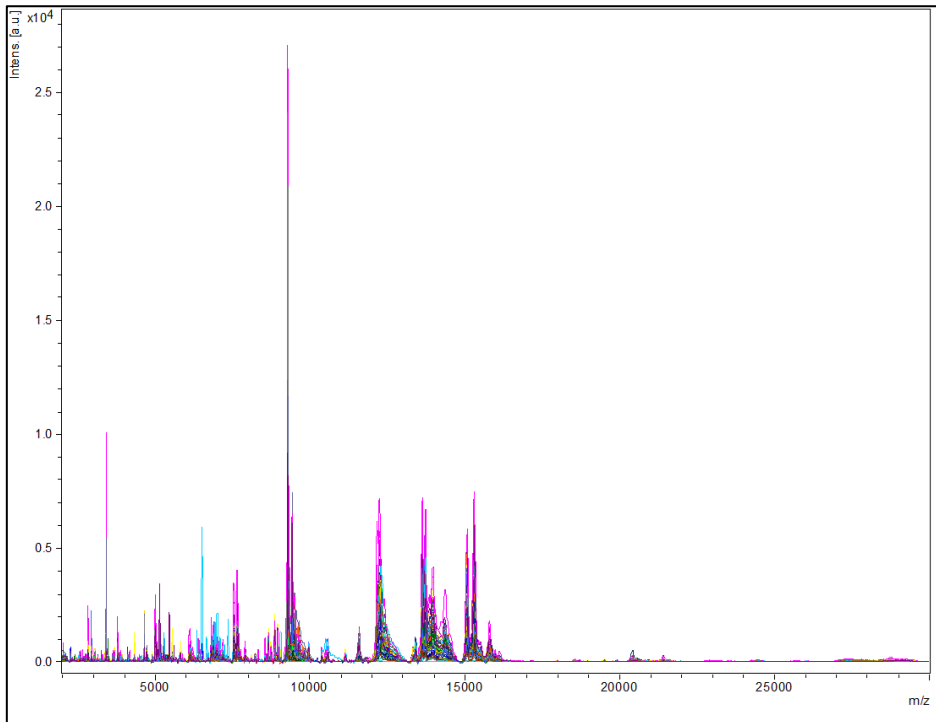
24. melléklet: Napraforgó (*Heliantus annus*) – 1. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



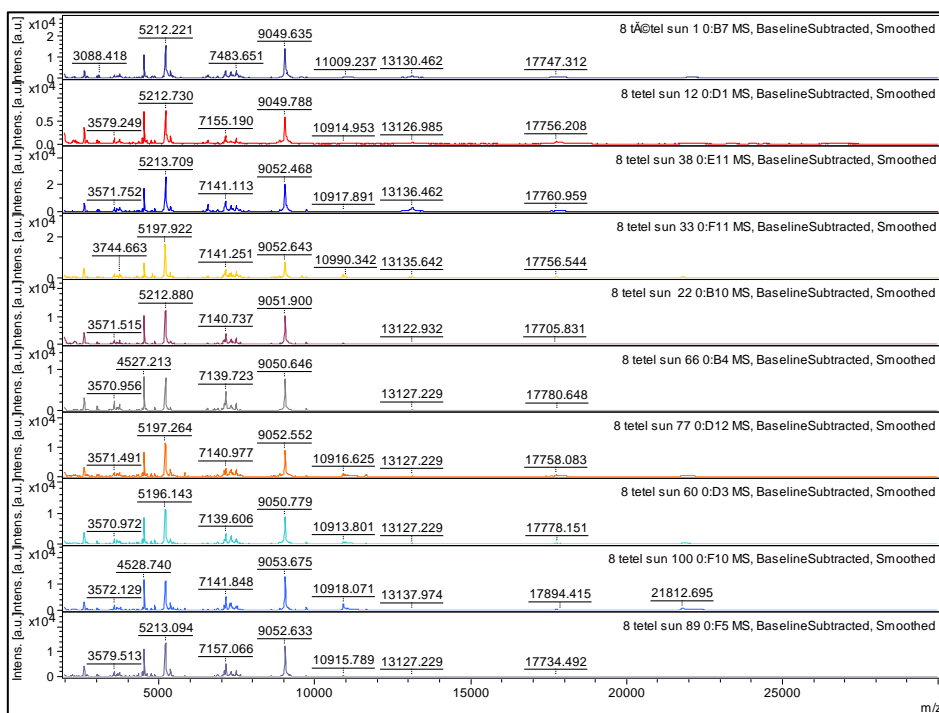
25. melléklet: Napraforgó (*Heliantus annus*) – 1. tétel -10 szem spektruma lista nézetben



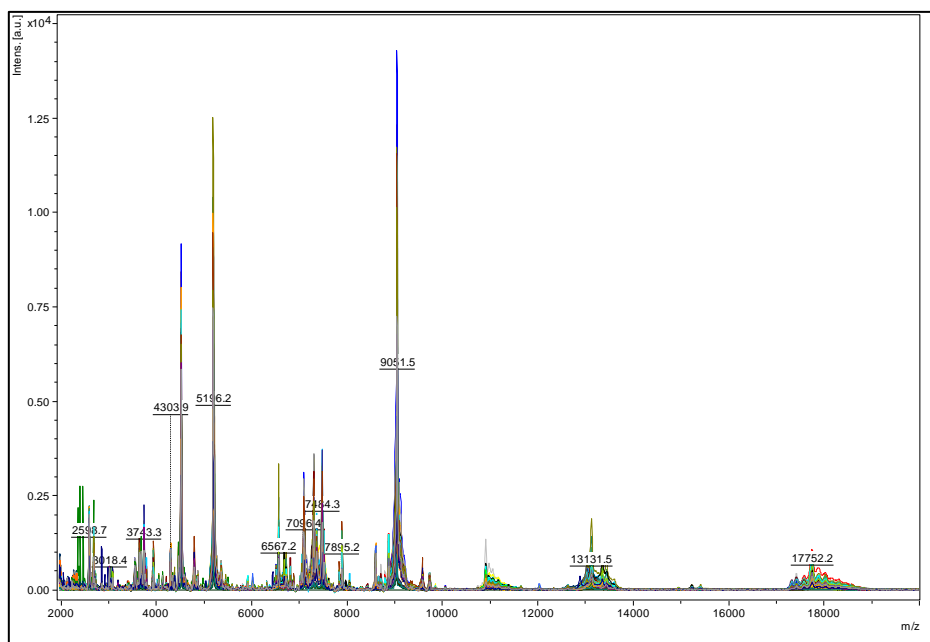
26. melléklet: Napraforgó (*Heliantus annus*) – 2. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



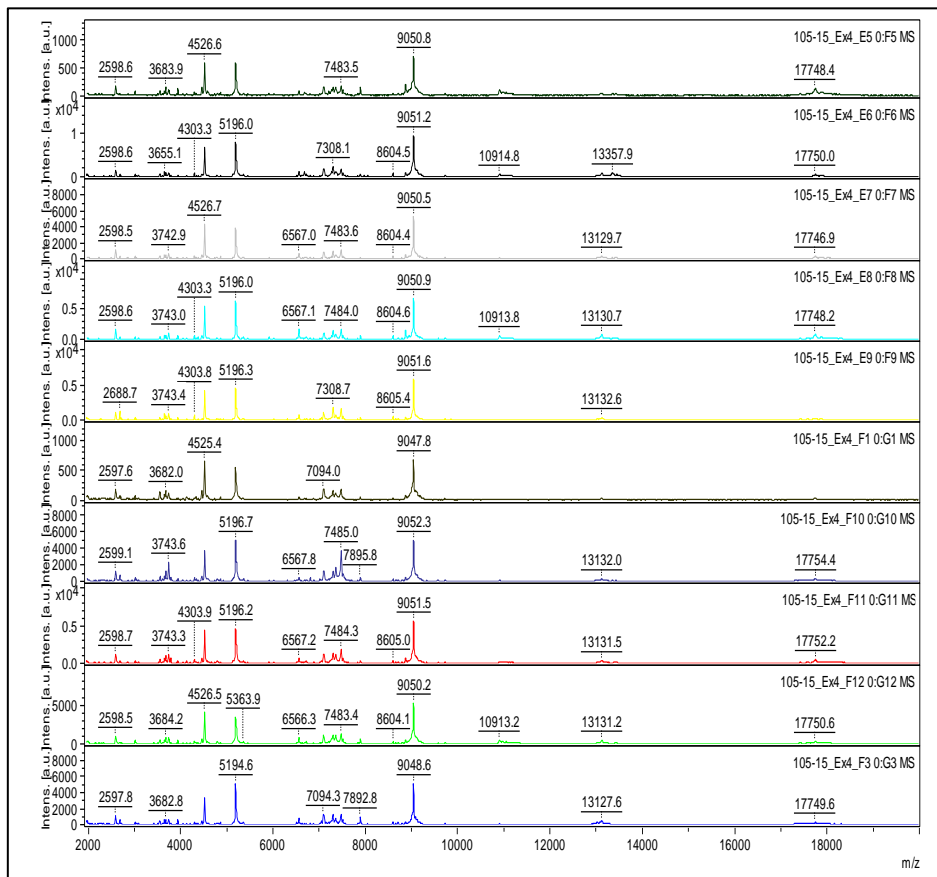
29. melléklet: Napraforgó (*Heliantus annus*) – 3. tétel -10 szem spektruma lista nézetben



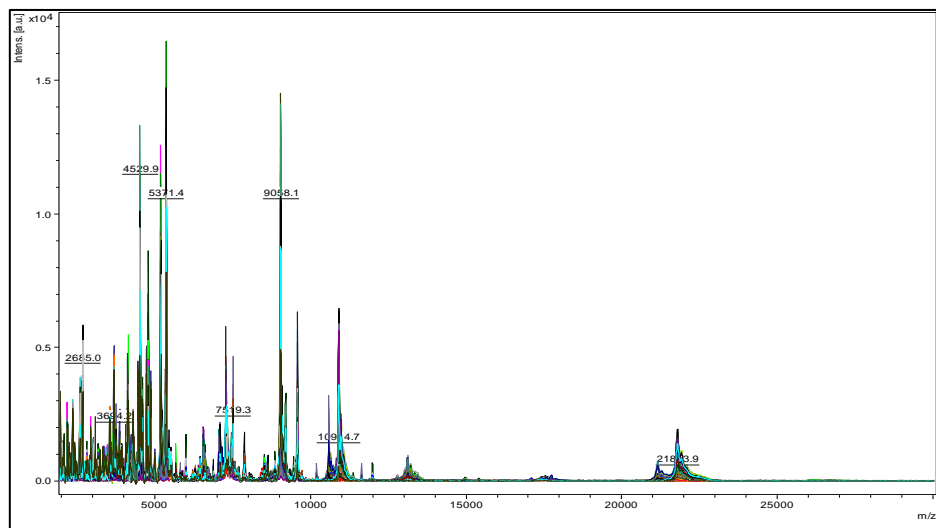
30. melléklet: Napraforgó (*Heliantus annus*) – 4. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



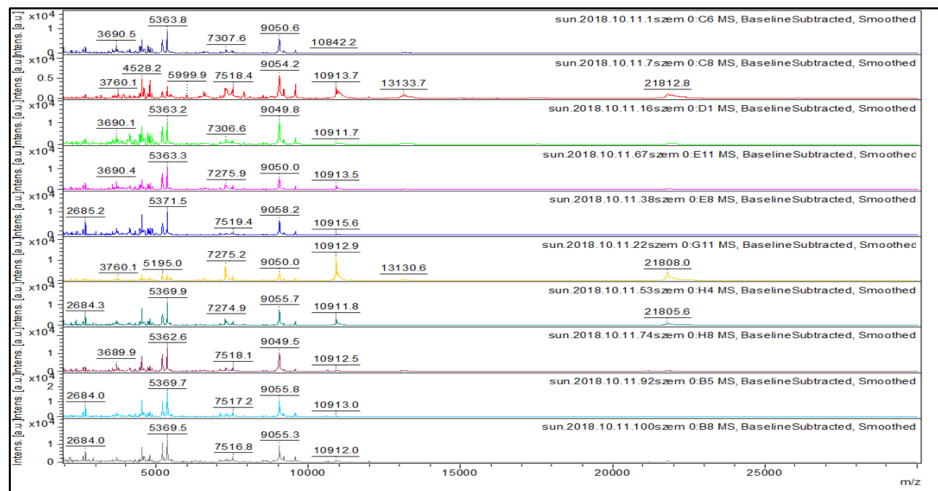
31. melléklet: Napraforgó (*Heliantus annuus*) – 4. tétel -10 szem spektruma lista nézetben



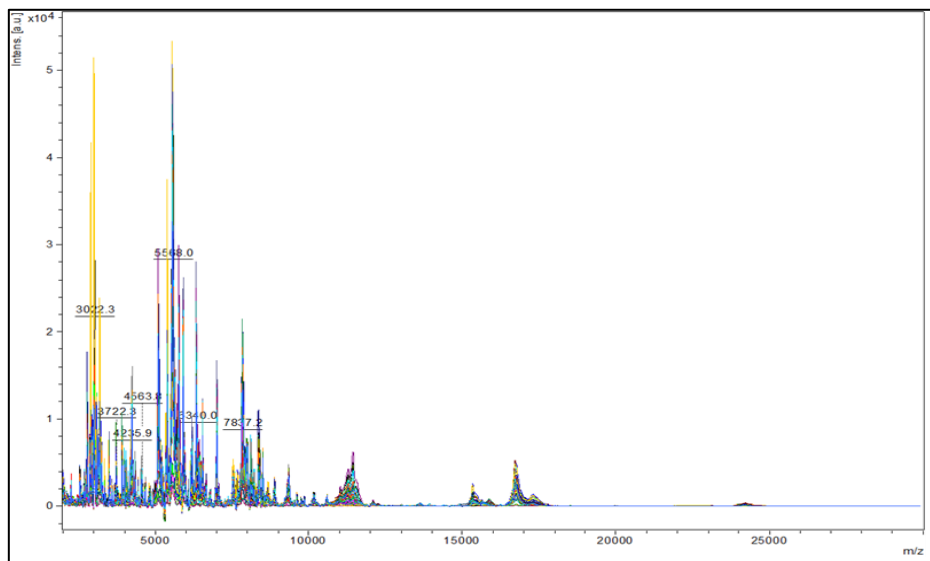
32. melléklet: Napraforgó (*Heliantus annuus*) – 5. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



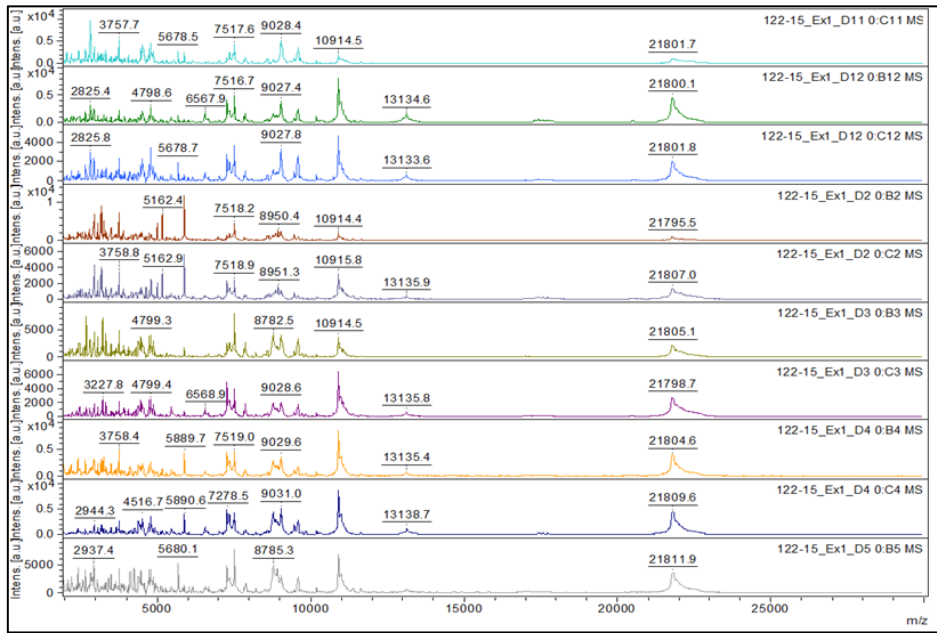
33. melléklet: Napraforgó (*Heliantus annuus*) – 5. tétel -10 szem spektruma lista nézetben



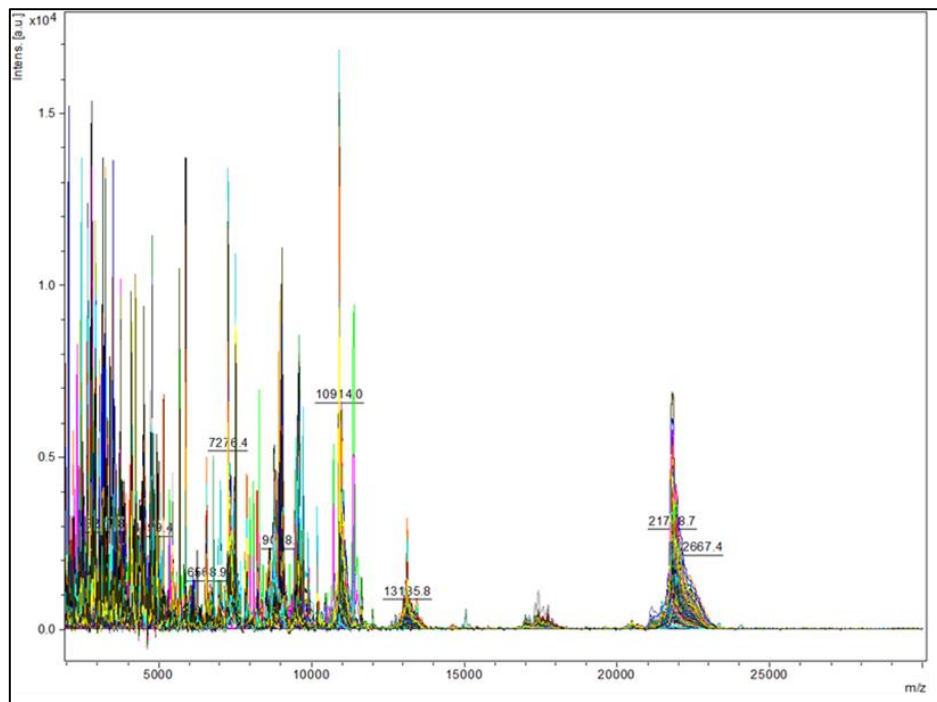
34. melléklet: Napraforgó (*Heliantus annuus*) – 6. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



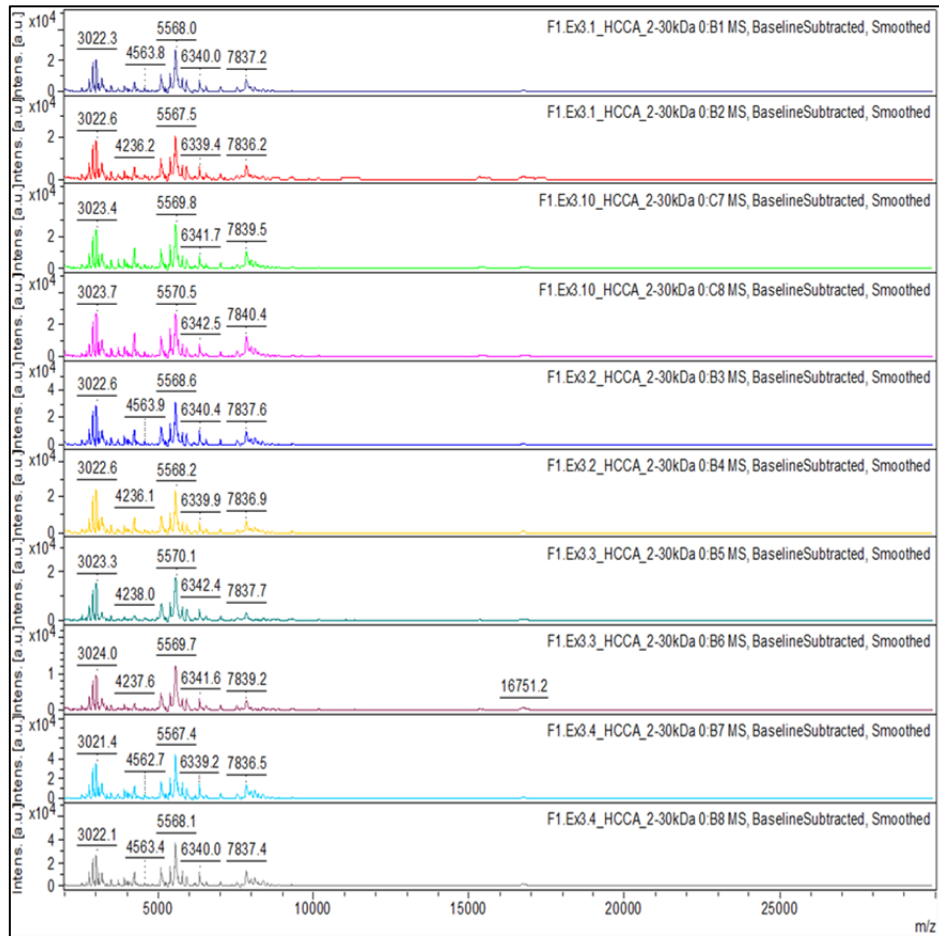
35. melléklet: Napraforgó (*Heliantus annus*) – 6. tétel -10 szem spektruma lista nézetben



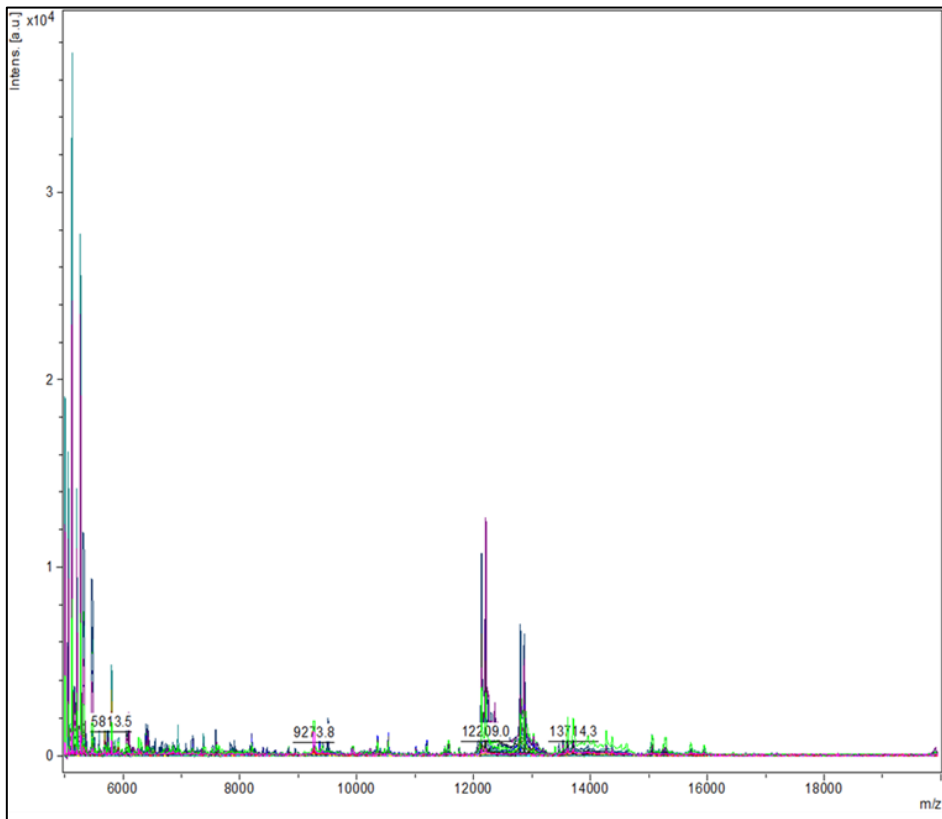
36. melléklet: Napraforgó (*Heliantus annus*) – 7. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



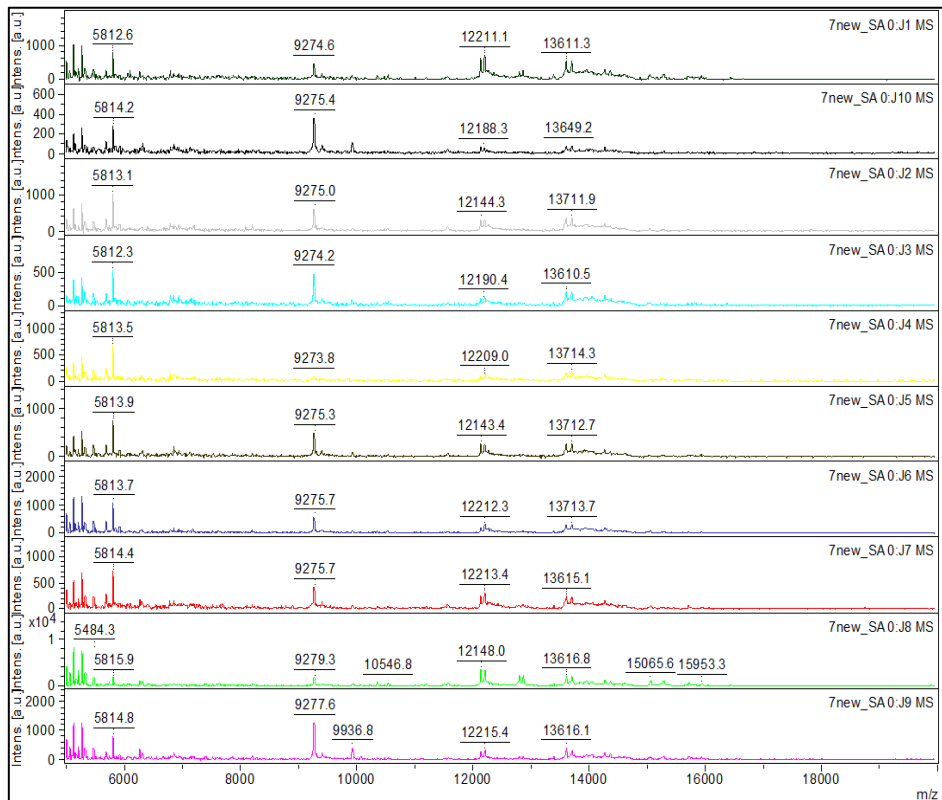
37. melléklet: Napraforgó (*Heliantus annuus*) – 7. tétel -10 szem spektruma lista nézetben



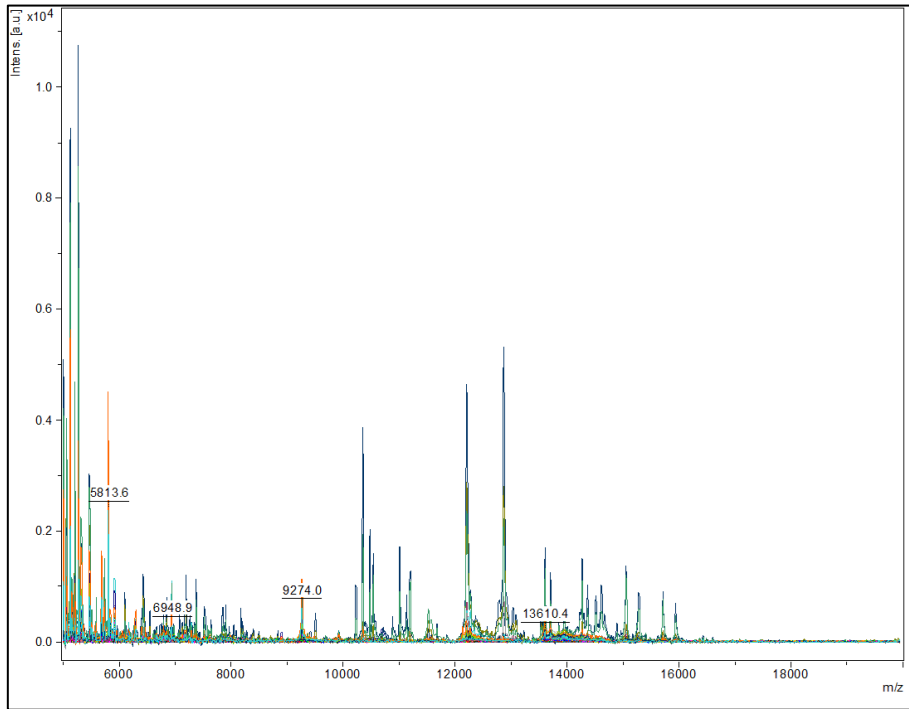
38. melléklet: Napraforgó (*Heliantus annuus*) – 8. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



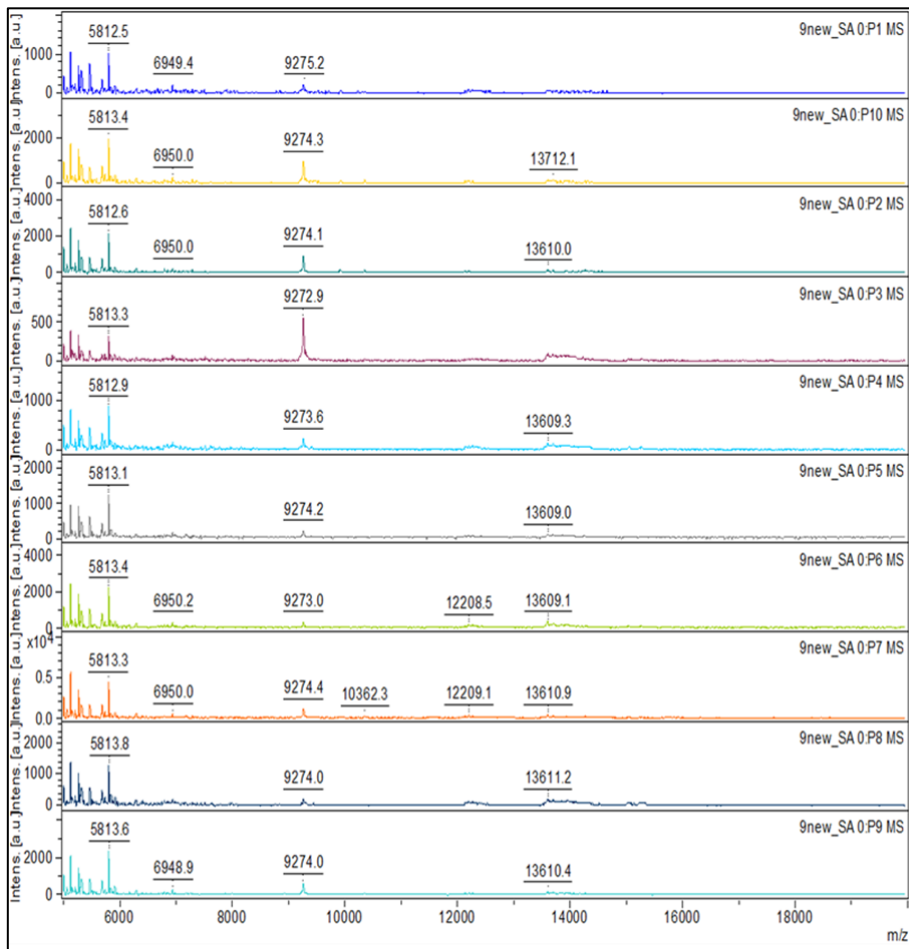
39. melléklet: Napraforgó (*Heliantus annuus*) – 8. tétel -10 szem spektruma lista nézetben



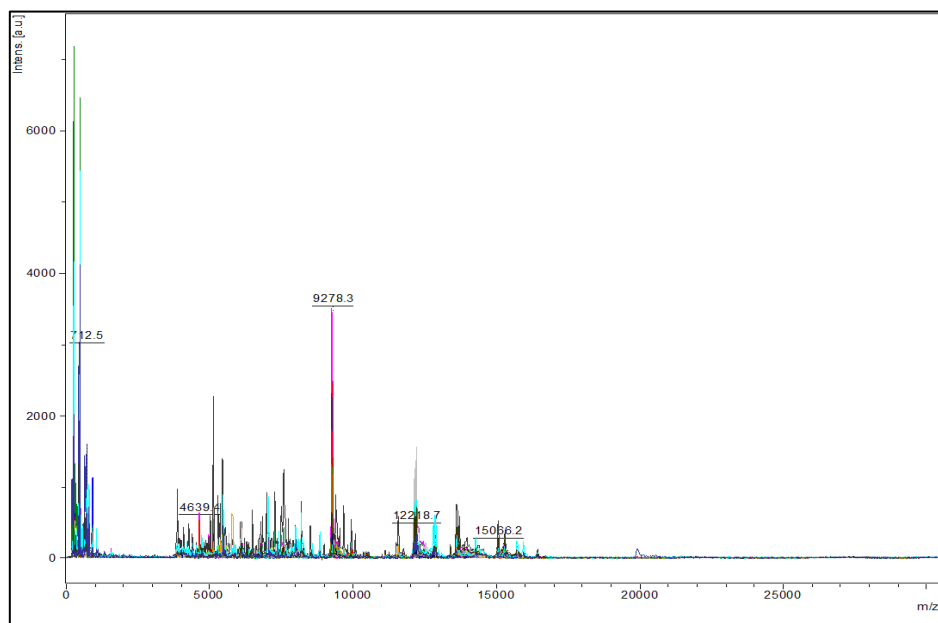
40. melléklet: Napraforgó (*Heliantus annuus*) – 9. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



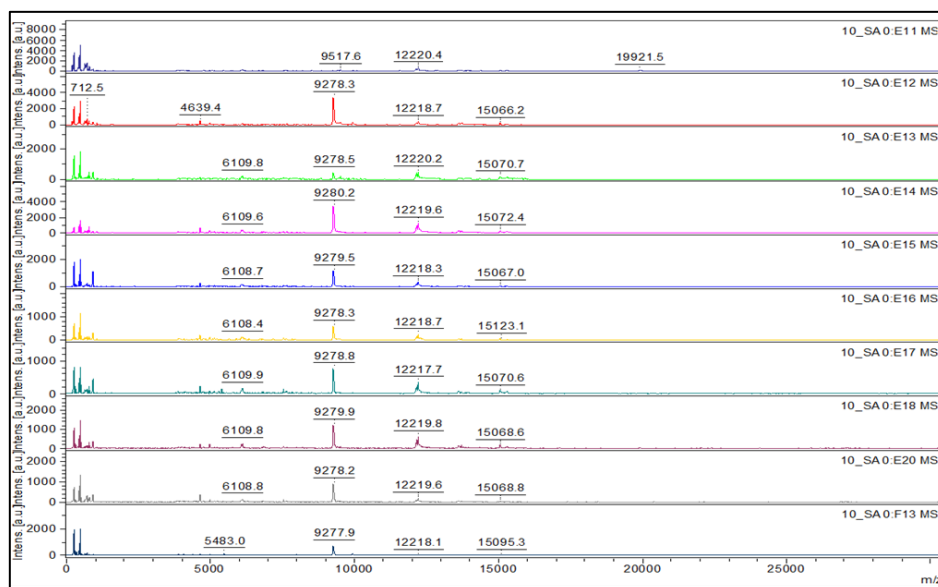
41. melléklet: Napraforgó (*Heliantus annuus*) – 9. tétel -10 szem spektruma lista nézetben



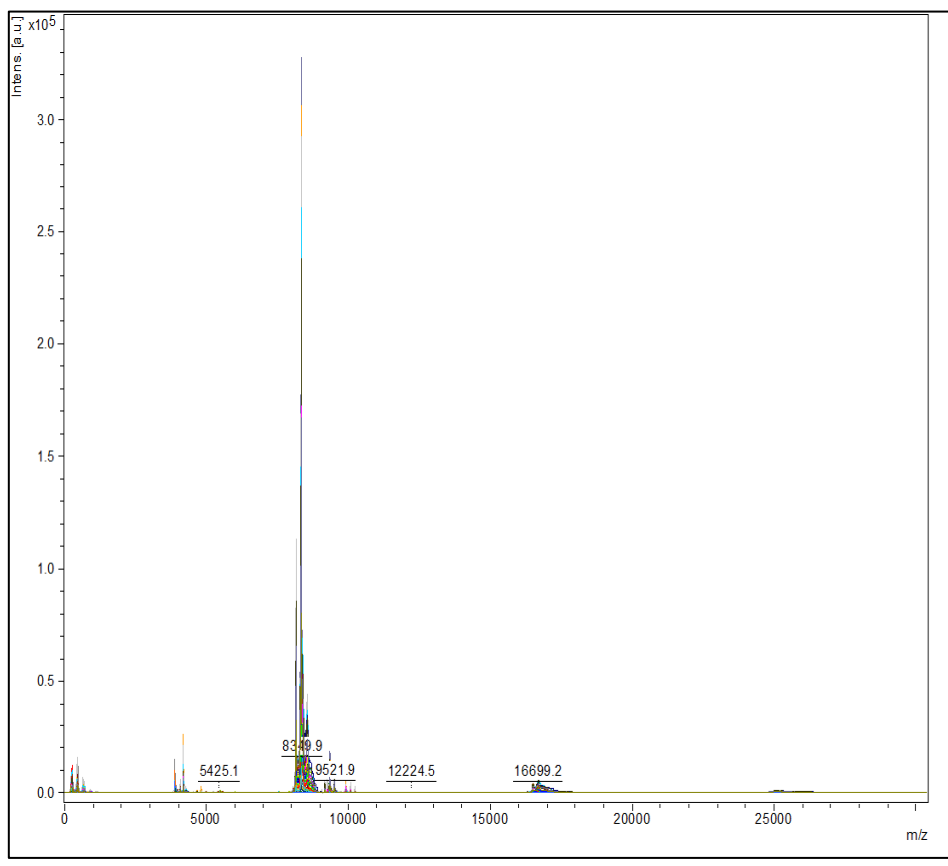
42. melléklet: Napraforgó (*Heliantus annus*) – 10. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



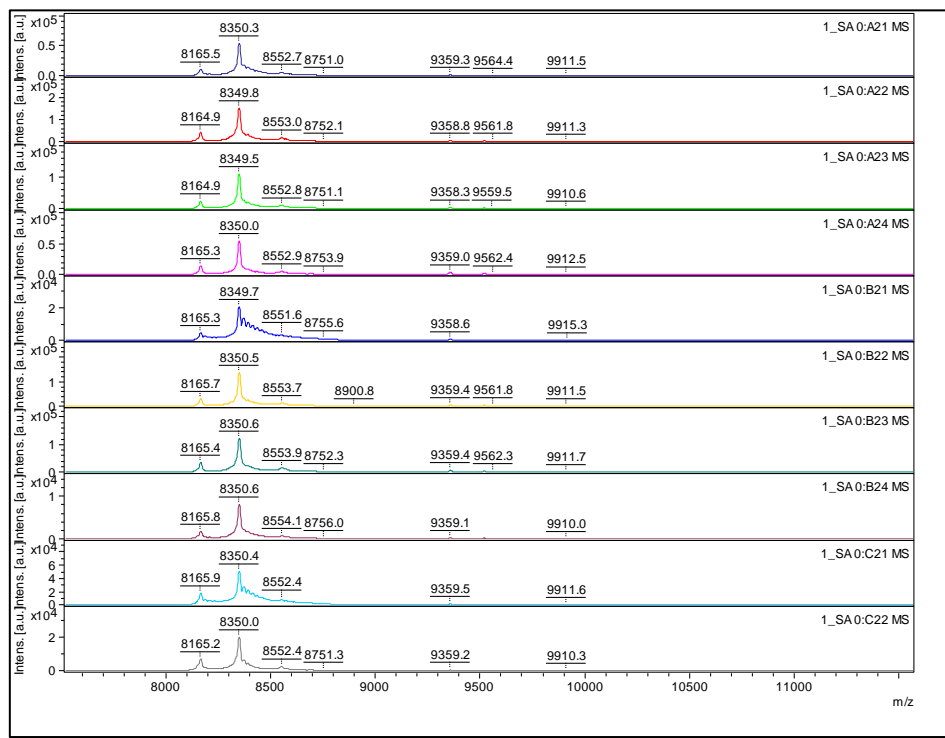
43. melléklet: Napraforgó (*Heliantus annus*) – 10. tétel -10 szem spektruma lista nézetben



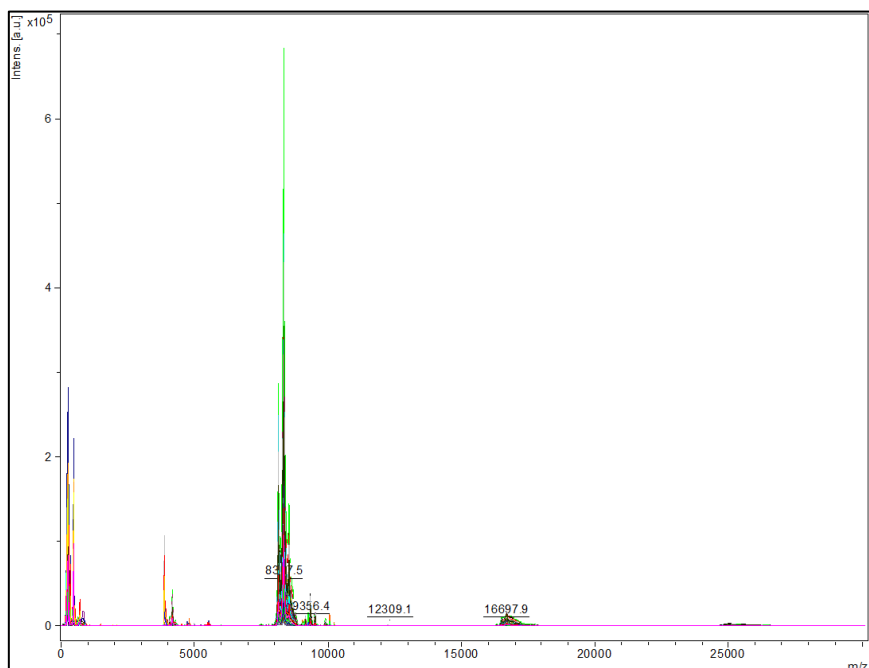
44. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 1. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



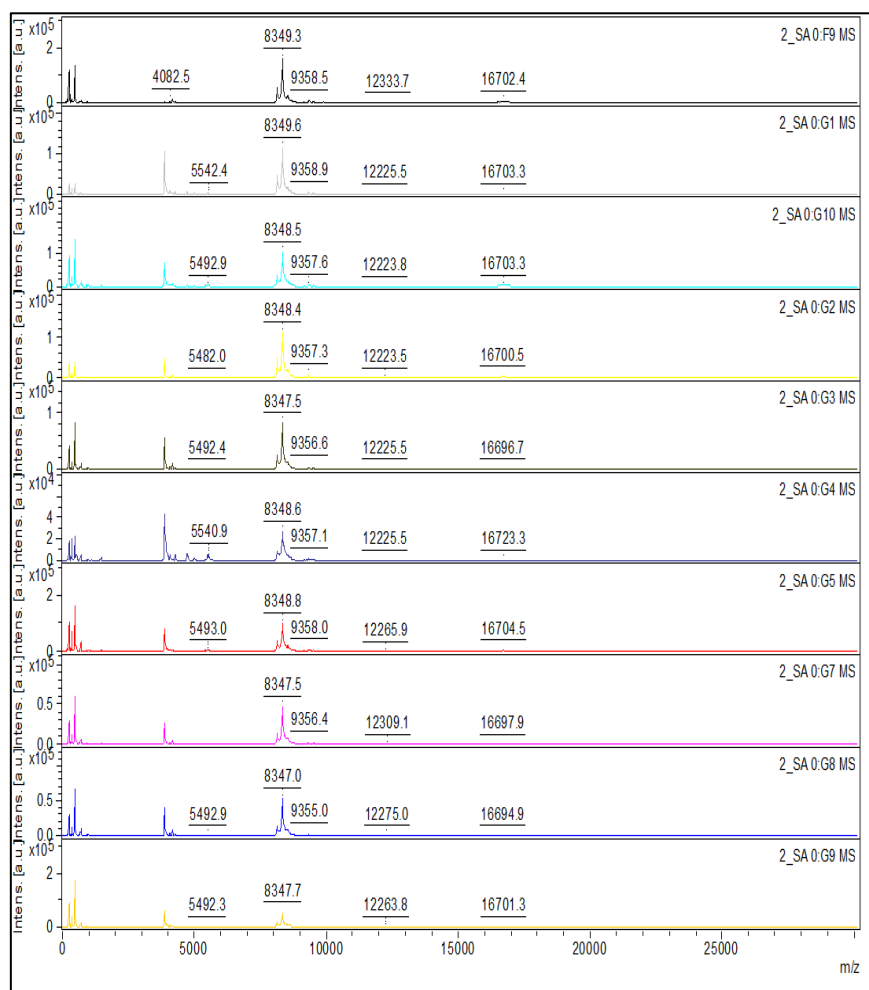
45. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 1. tétel - 10 szem spektruma lista nézetben



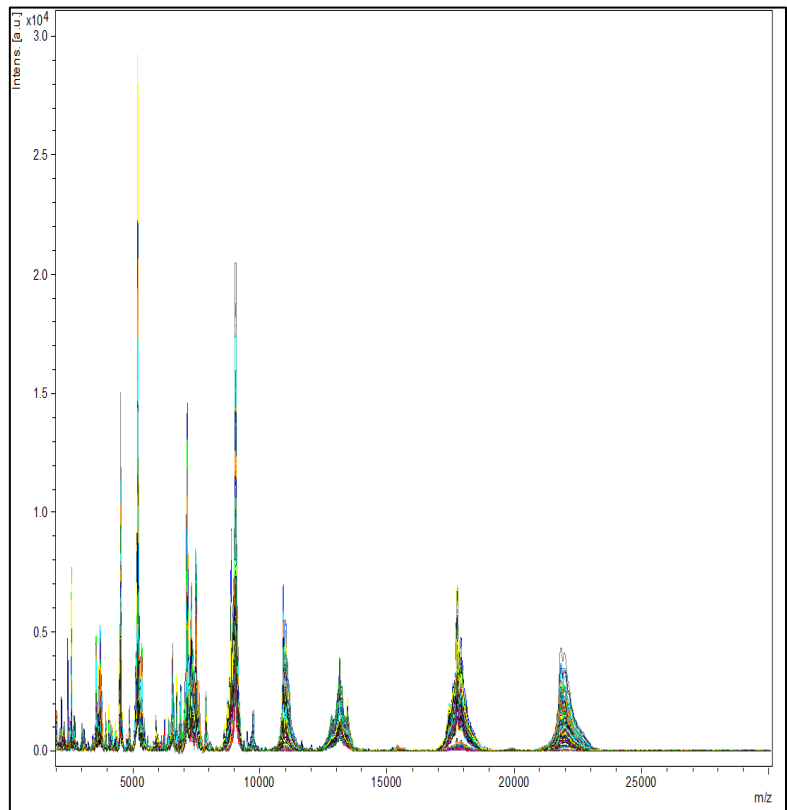
46. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 2. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



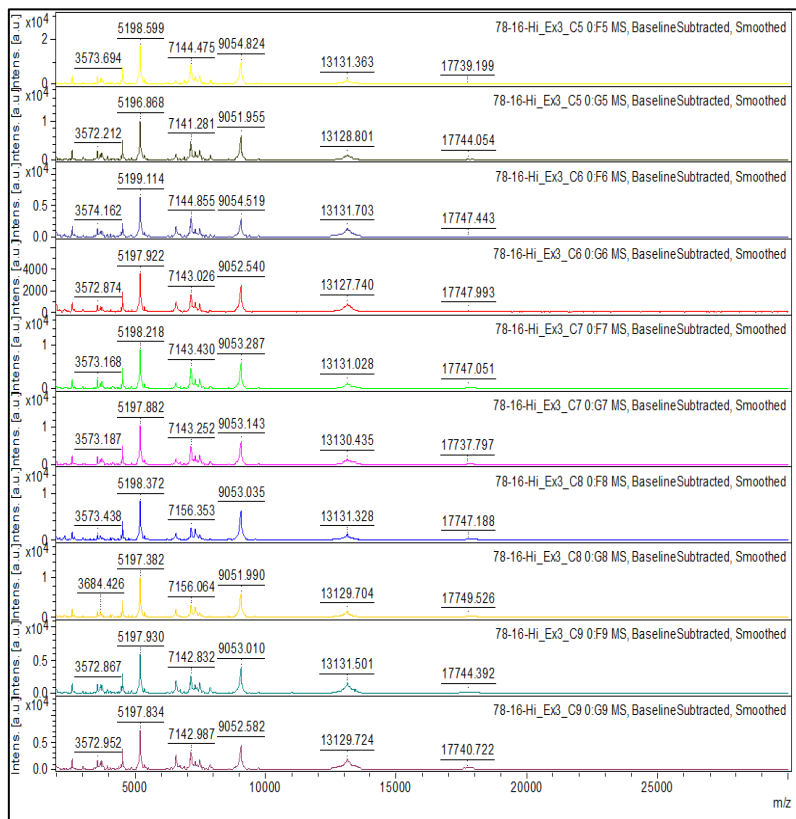
47. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 2. tétel - 10 szem spektruma lista nézetben



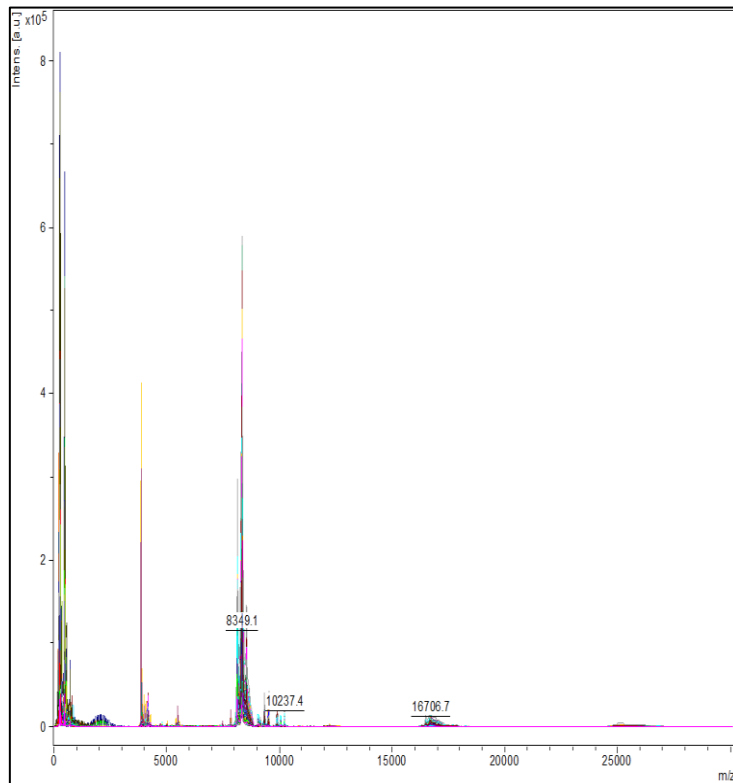
48. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 3. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



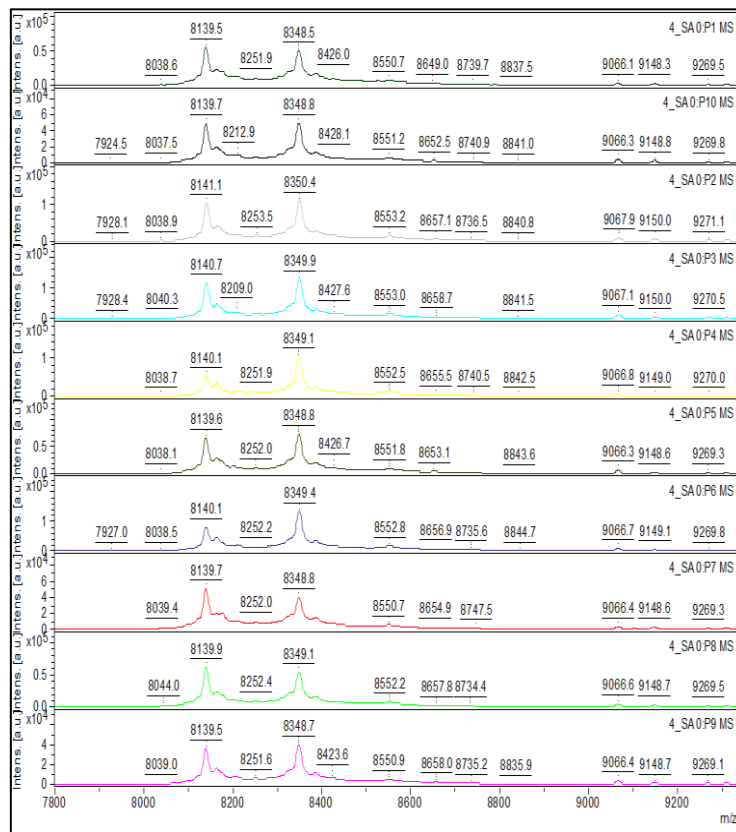
49. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 3. tétel - 10 szem spektruma lista nézetben



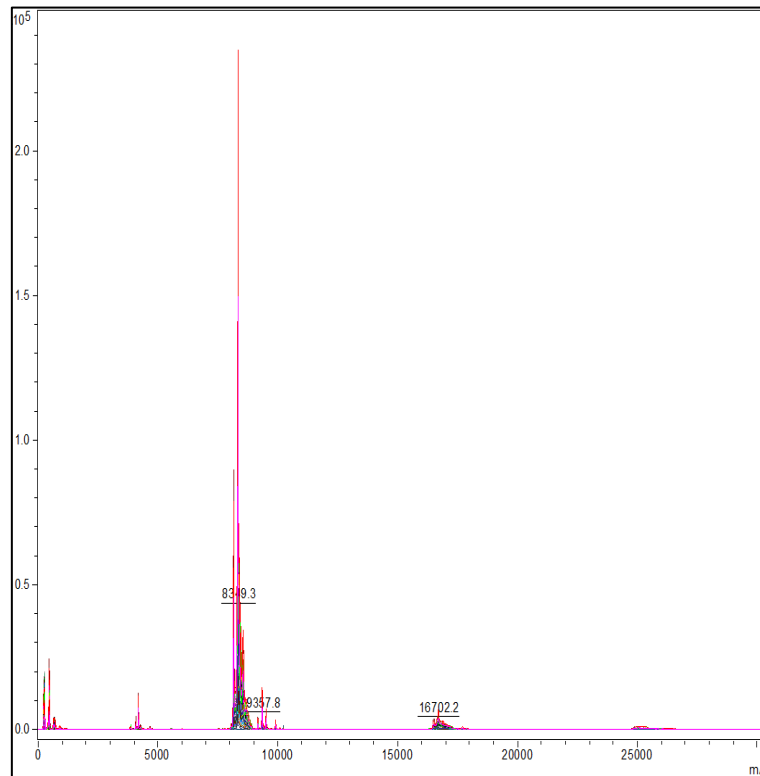
50. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 4. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



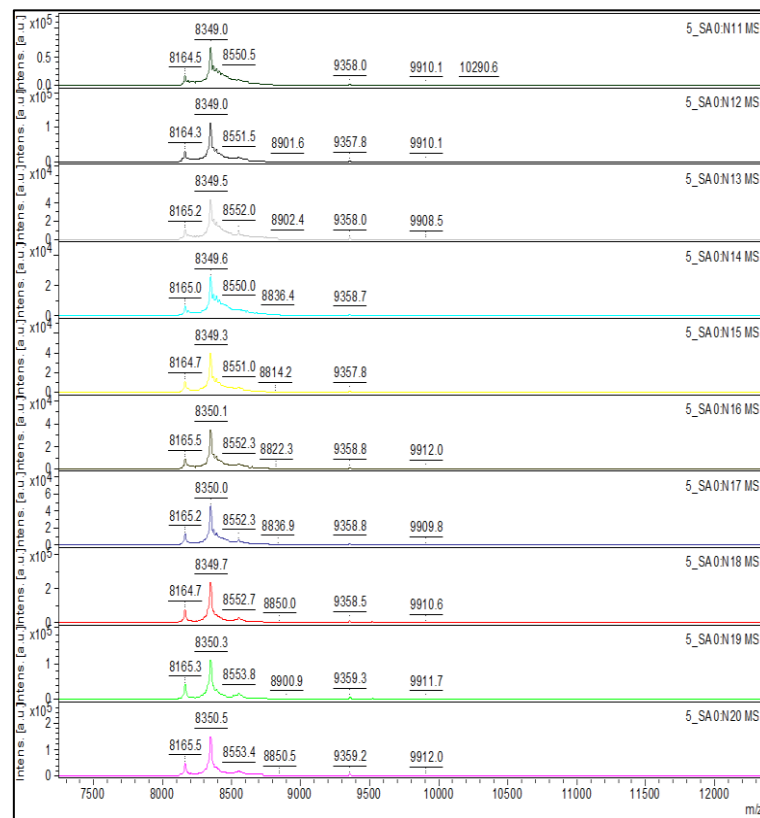
51. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 4. tétel - 10 szem spektruma lista nézetben



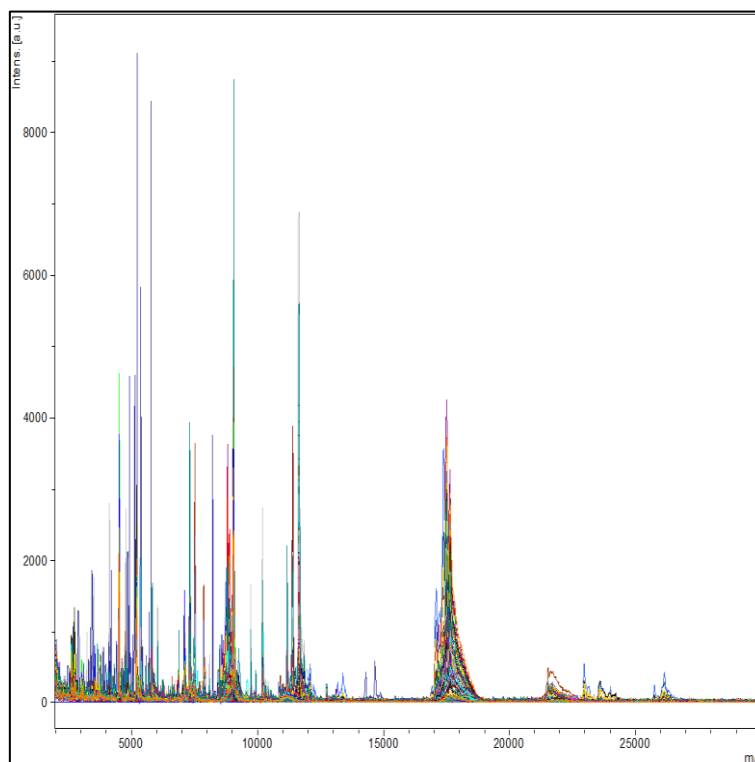
52. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 5. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



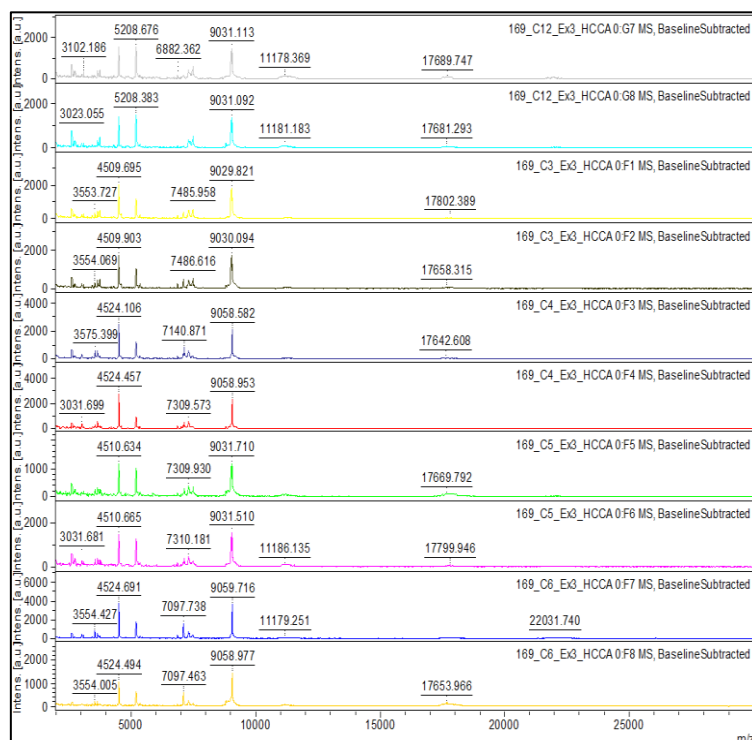
53. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 5. tétel - 10 szem spektruma lista nézetben



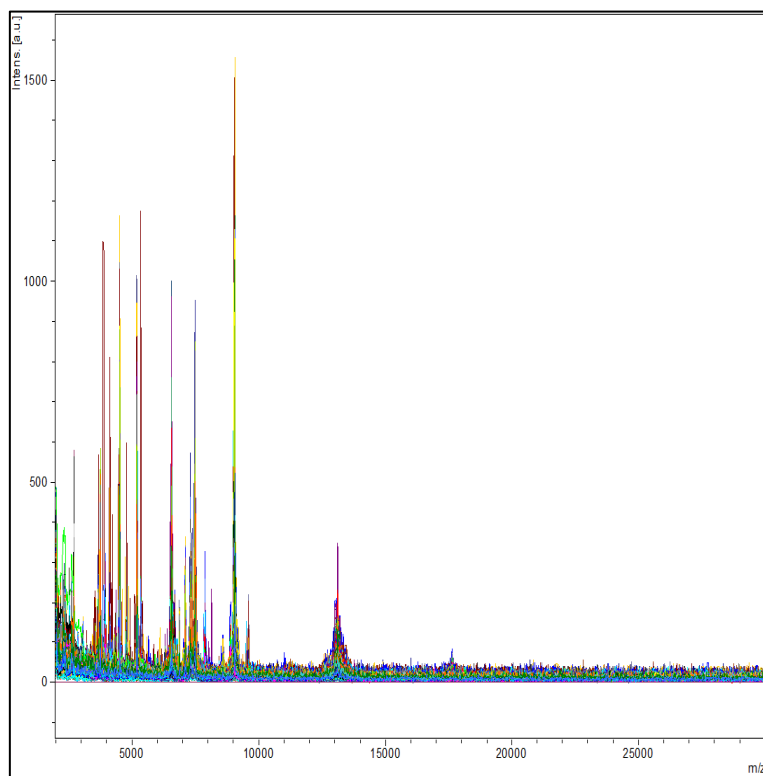
54. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 6. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



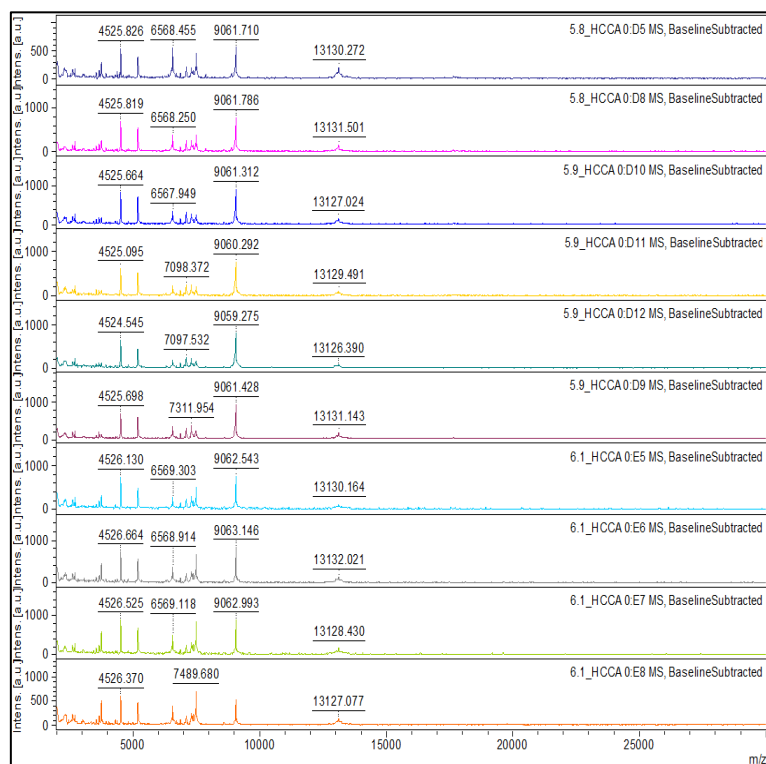
55. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 6. tétel - 10 szem spektruma lista nézetben



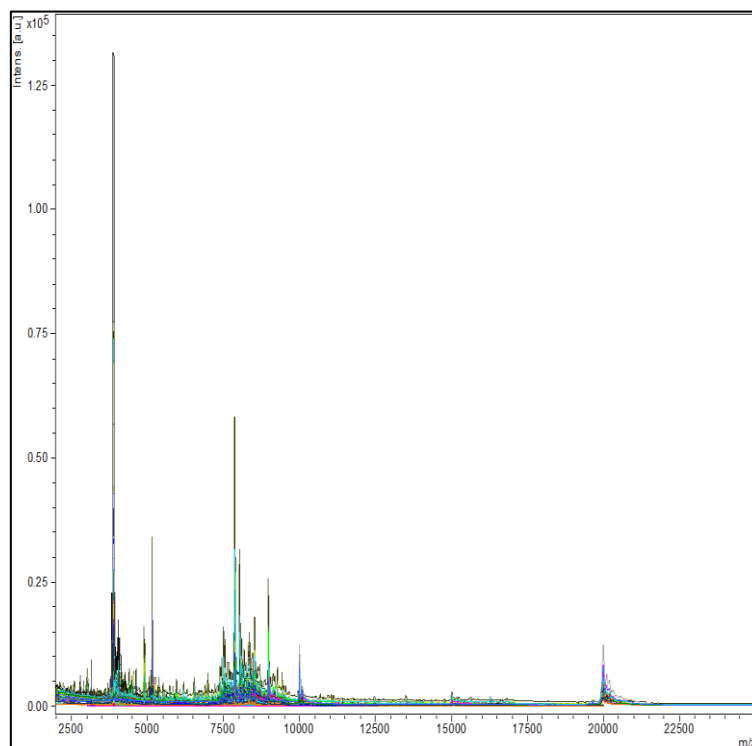
56. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 7. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



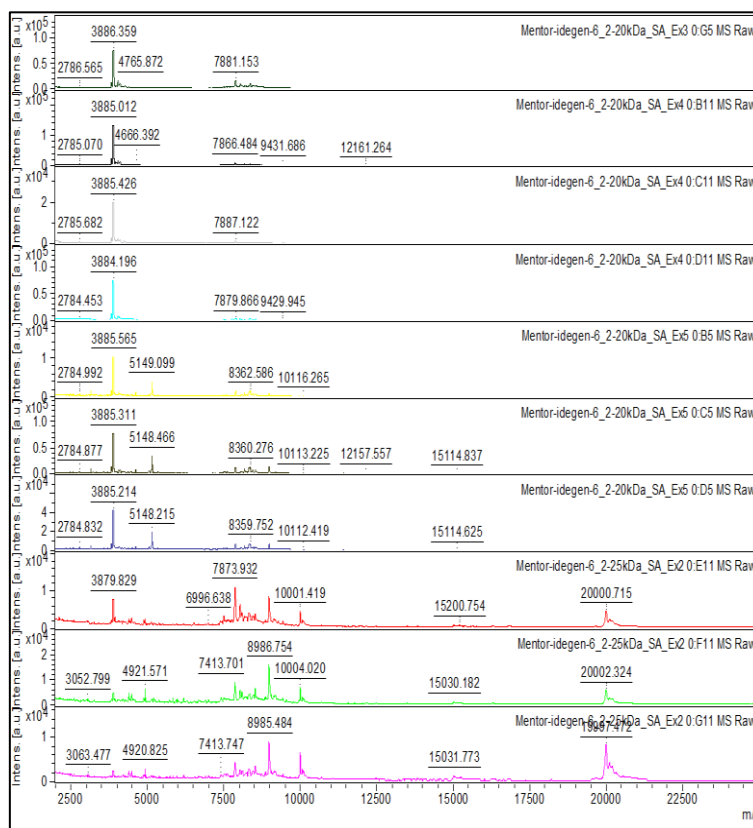
57. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 7. tétel - 10 szem spektruma lista nézetben



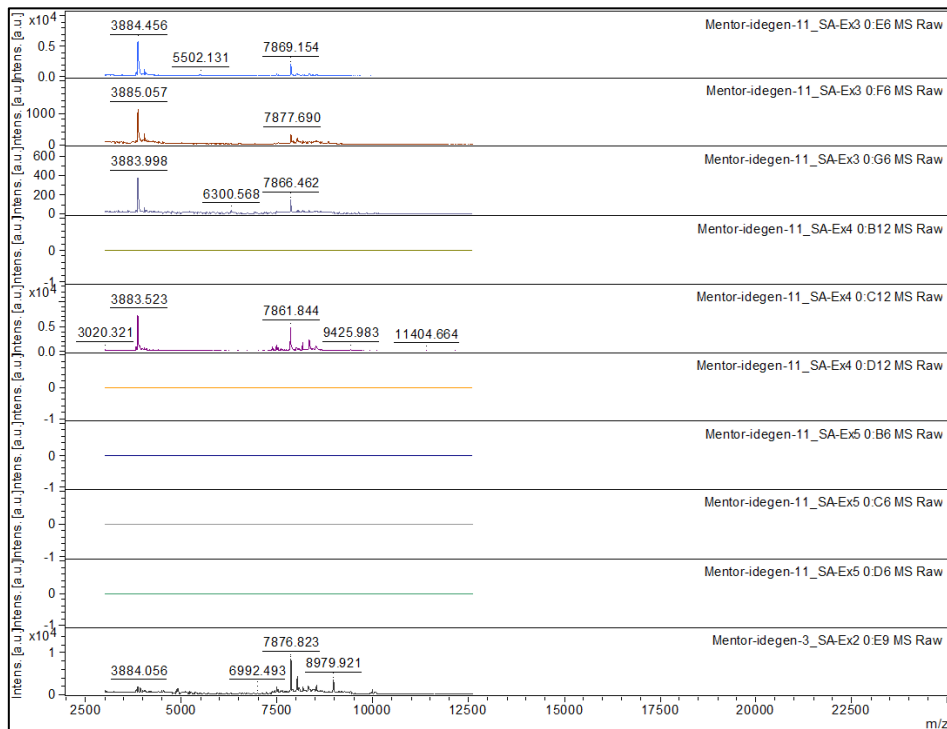
58. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 8. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



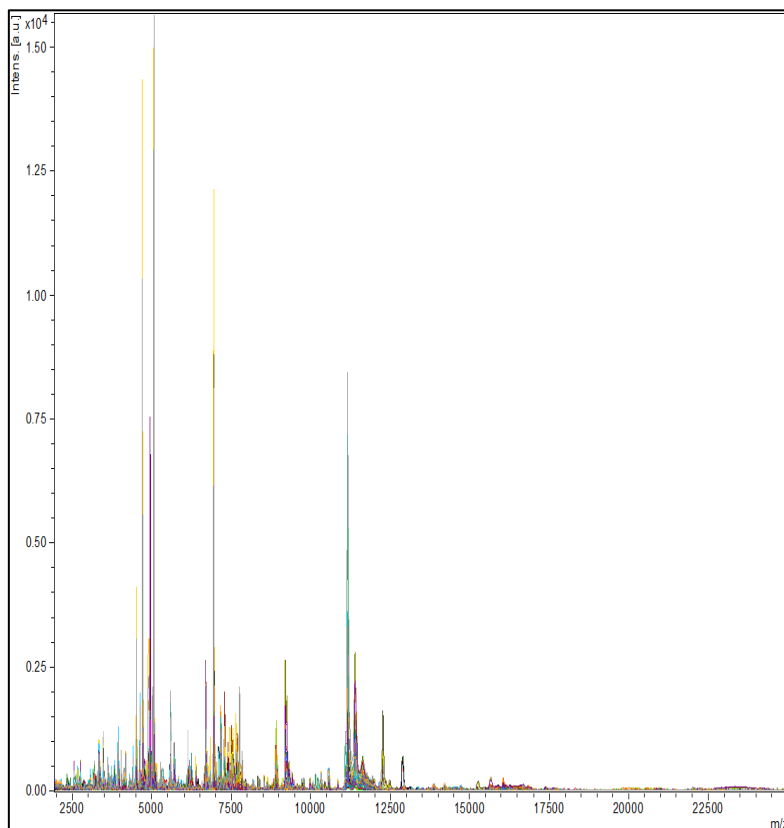
59. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 8. tétel - 10 szem spektruma lista nézetben



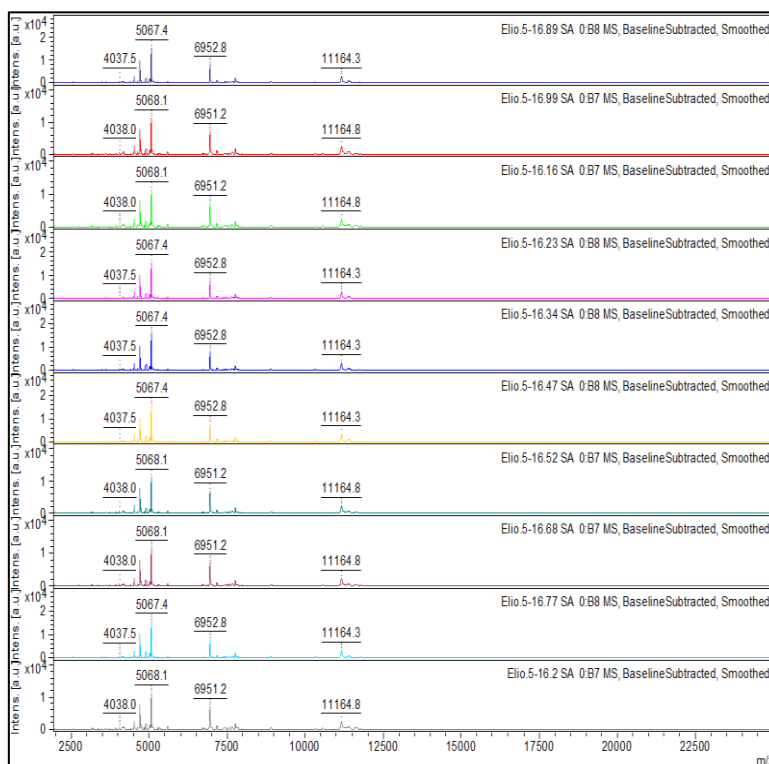
60. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 8. tétel - 10 szem spektruma lista nézetben



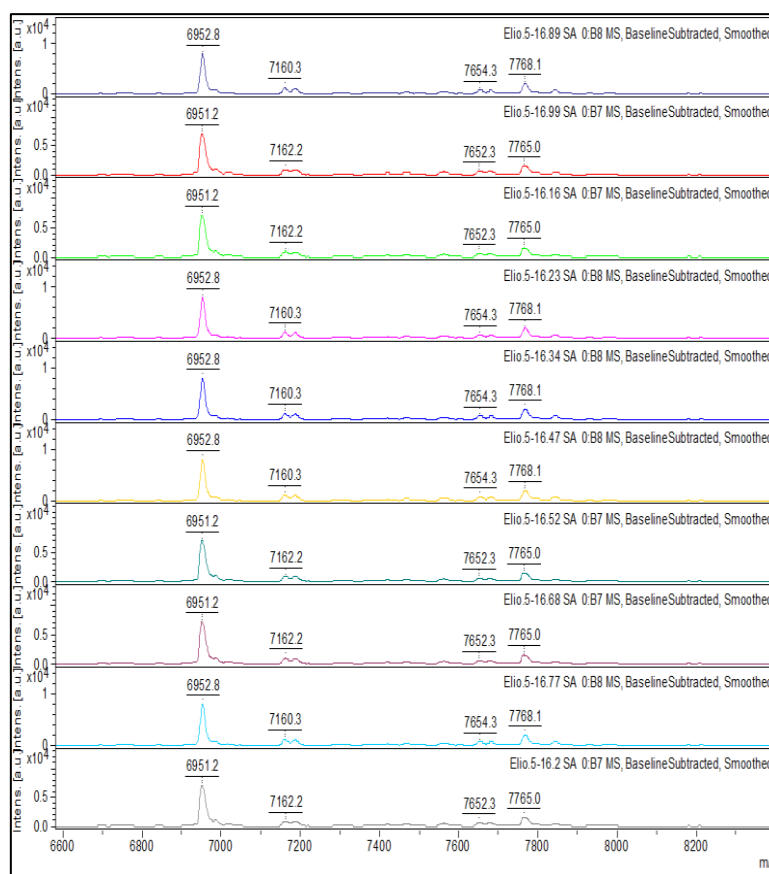
61. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 9. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



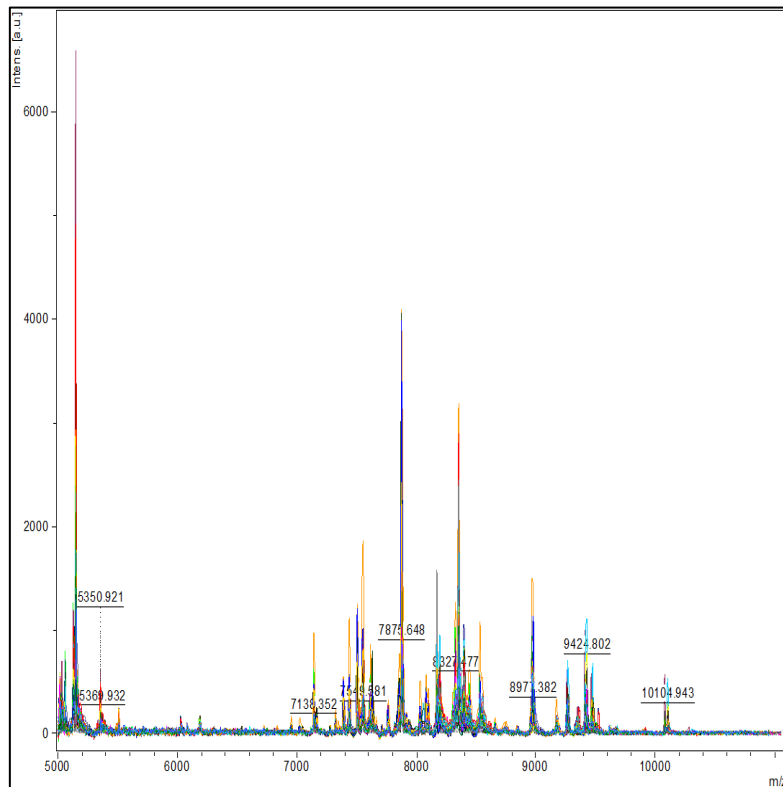
62. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 9. tétel - 10 szem spektruma lista nézetben



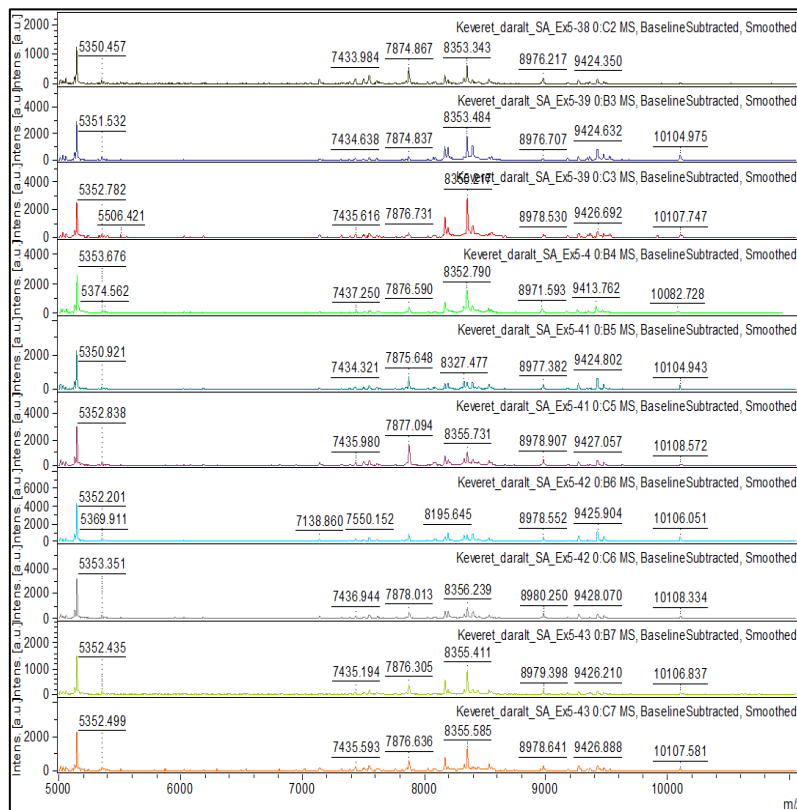
63. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 9. tétel - 10 szem spektruma lista nézetben



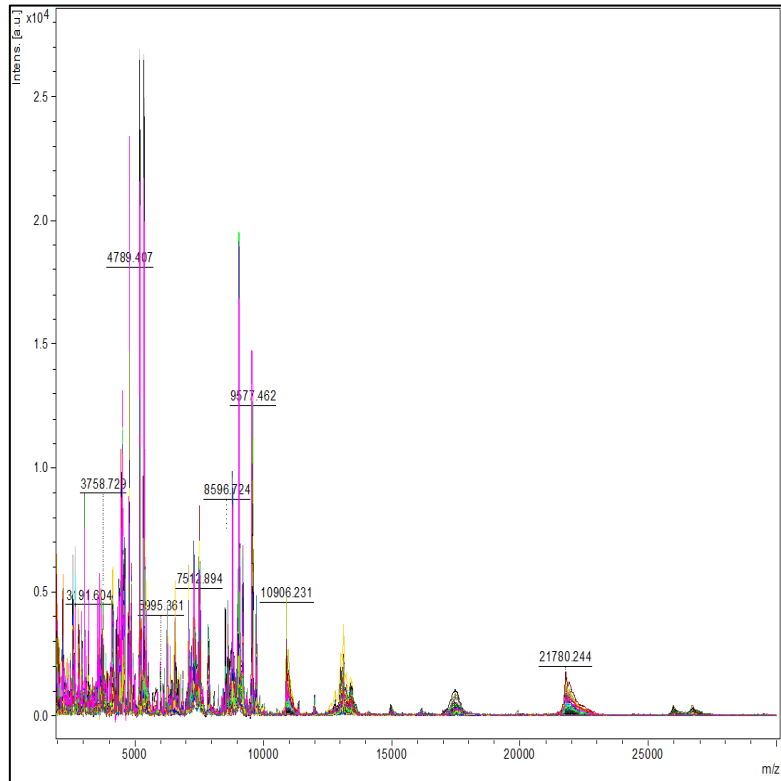
64. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 10. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



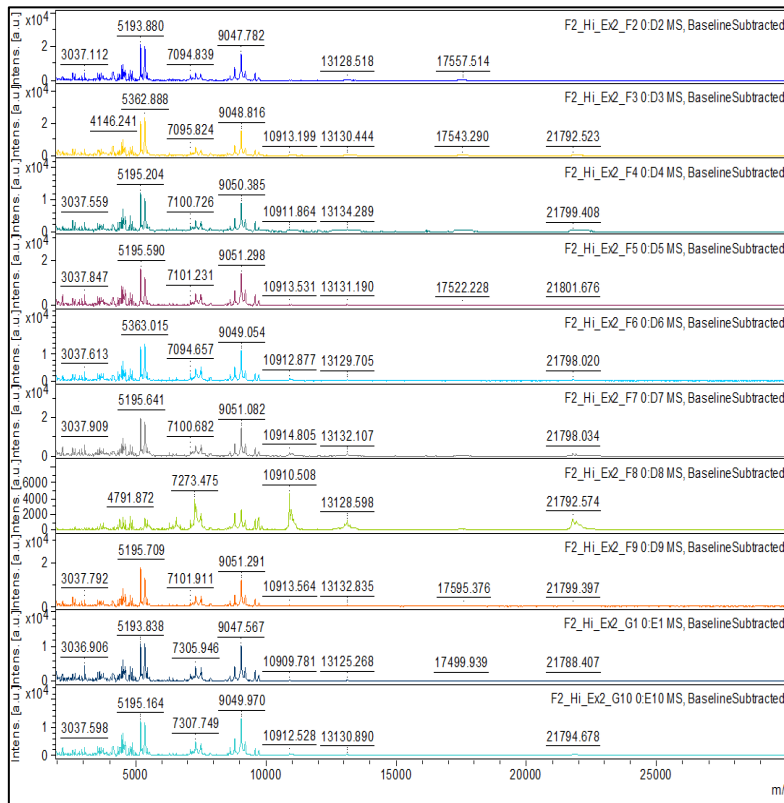
65. melléklet: Szója (*Glycine max* (L.) Merr.) – 10. tétel - 10 szem spektruma lista nézetben



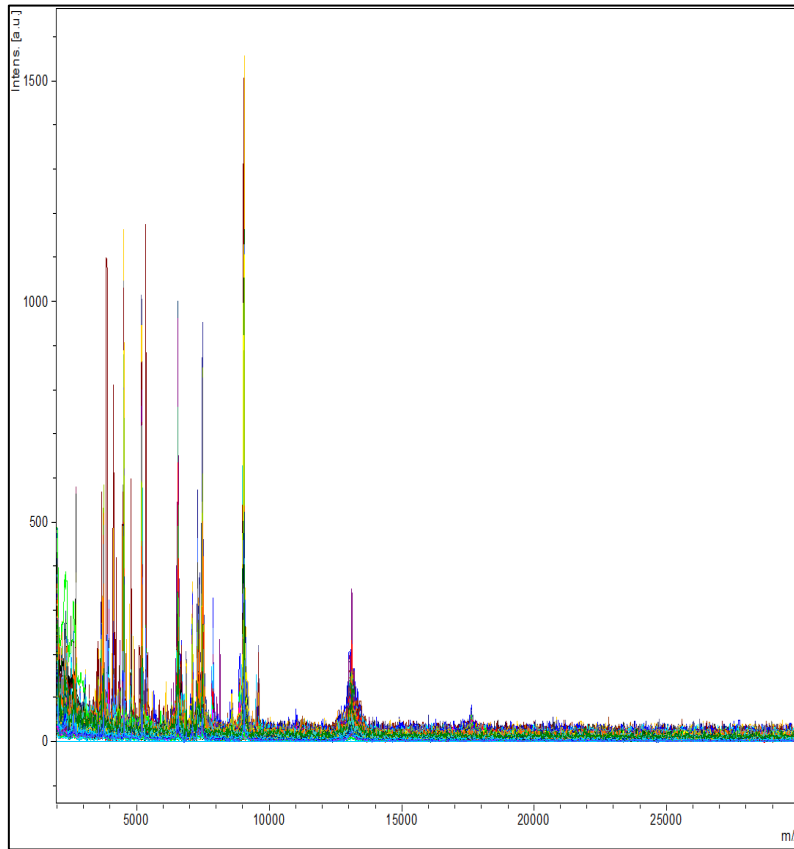
68. melléklet: Búza (*Triticum aestivum*) – 2. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



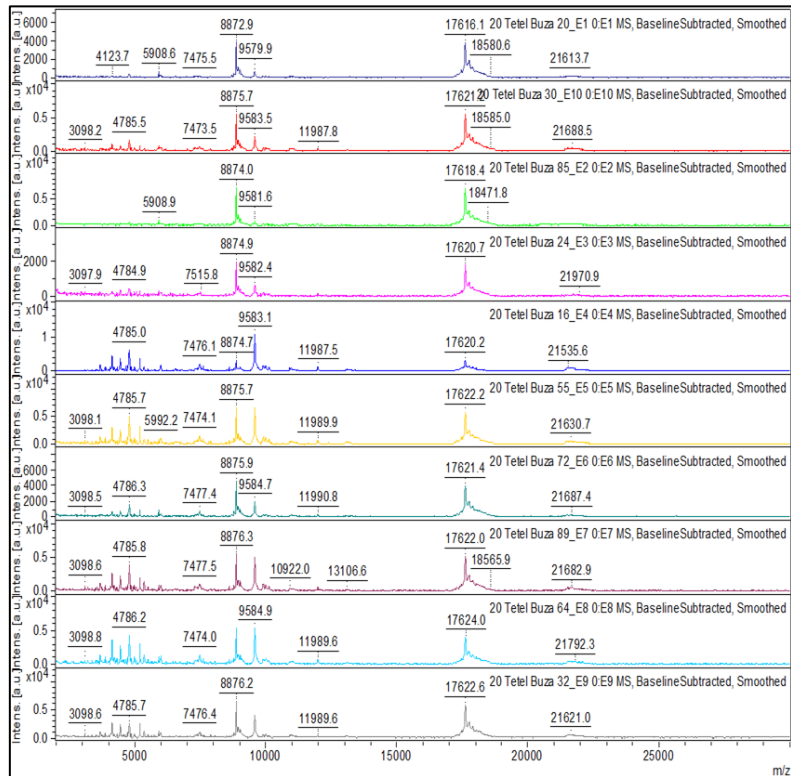
69. melléklet: Búza (*Triticum aestivum*) – 2. tétel -10 szem spektruma lista nézetben



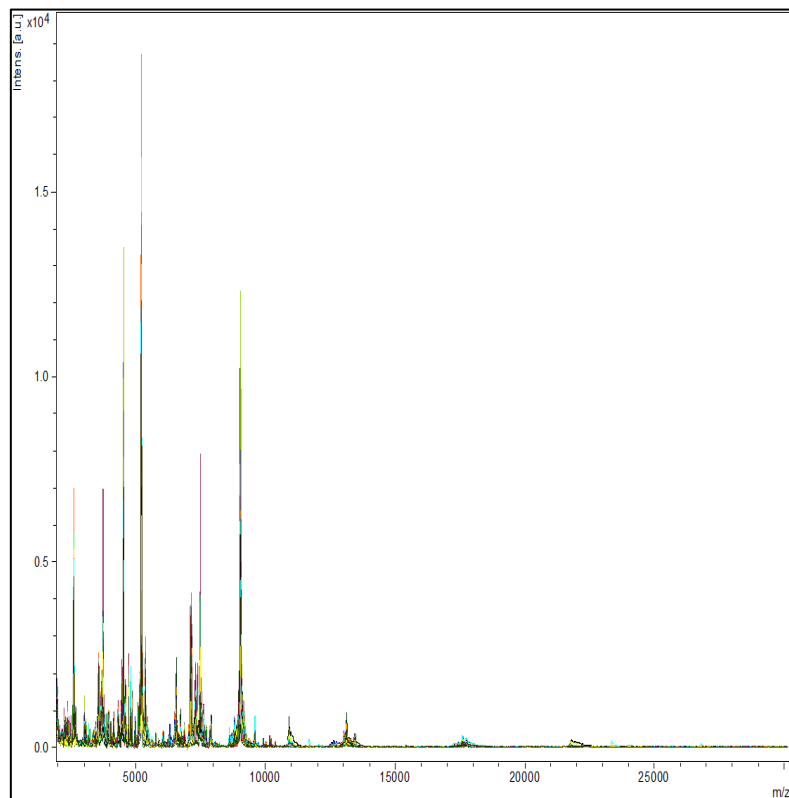
70. melléklet: Búza (*Triticum aestivum*) – 3. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



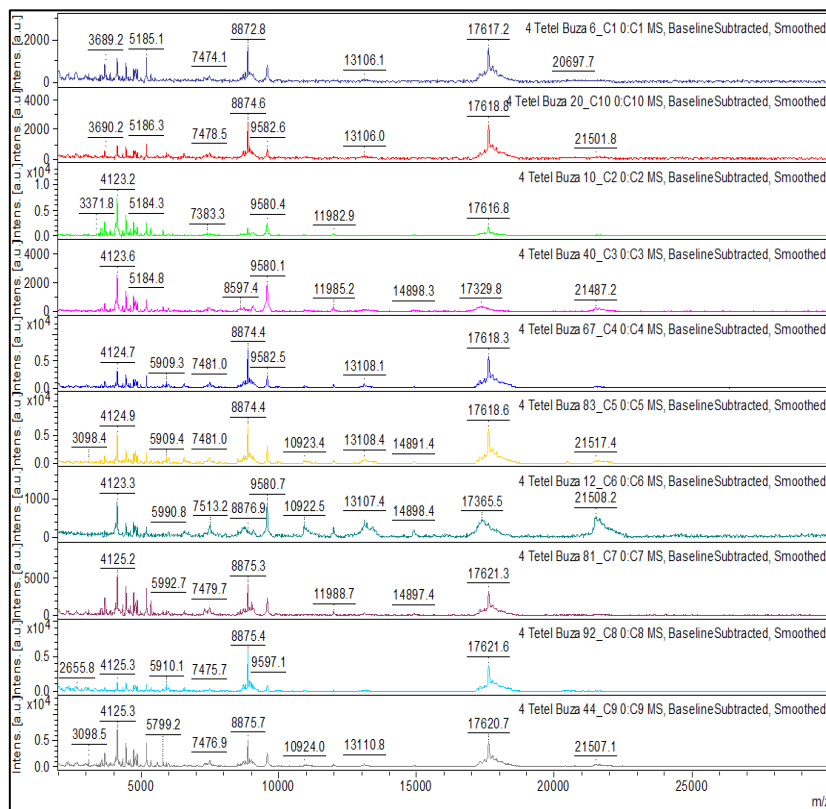
71. melléklet: Búza (*Triticum aestivum*) – 3. tétel -10 szem spektruma lista nézetben



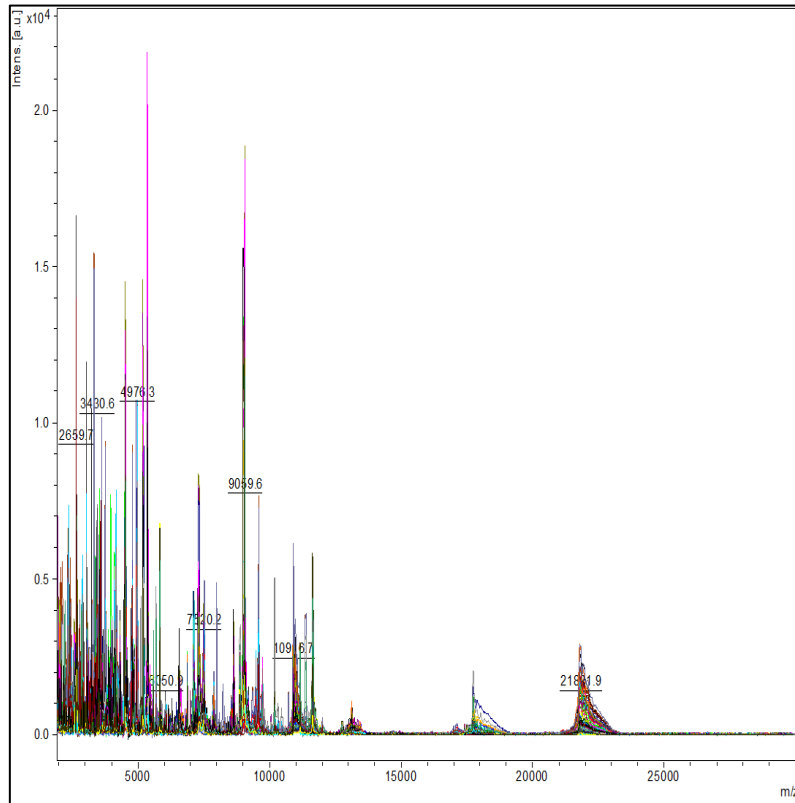
72. melléklet: Búza (*Triticum aestivum*) – 4. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



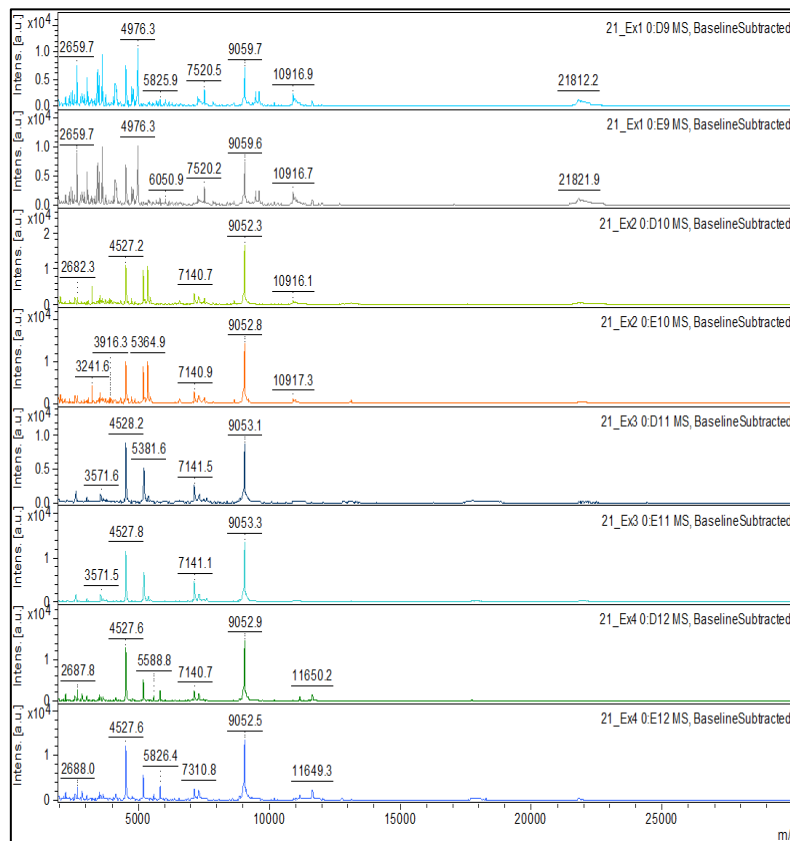
73. melléklet: Búza (*Triticum aestivum*) – 4. tétel -10 szem spektruma lista nézetben



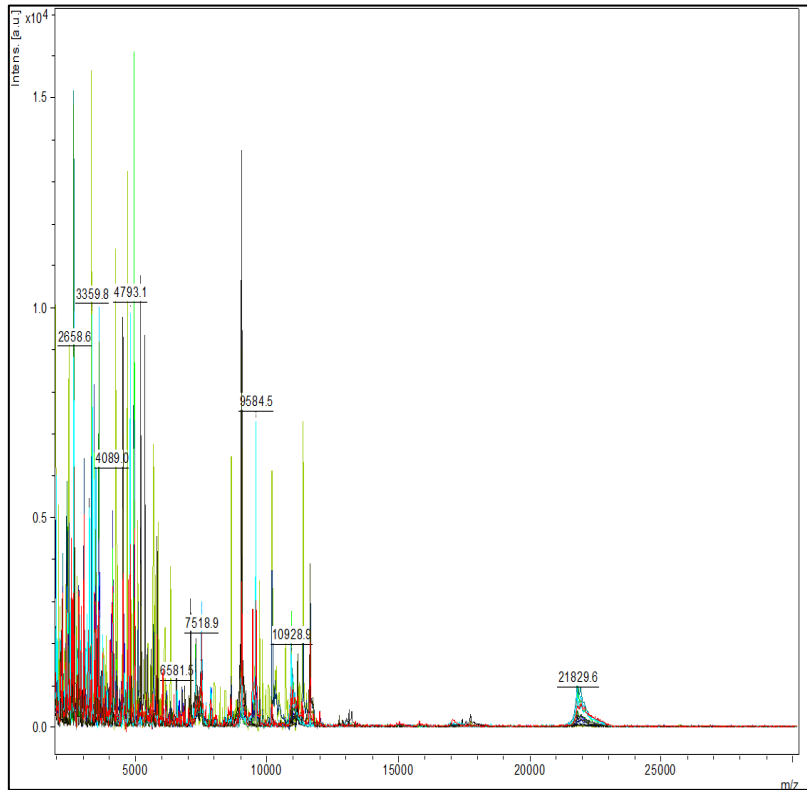
74. melléklet: Búza (*Triticum aestivum*) – 5. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



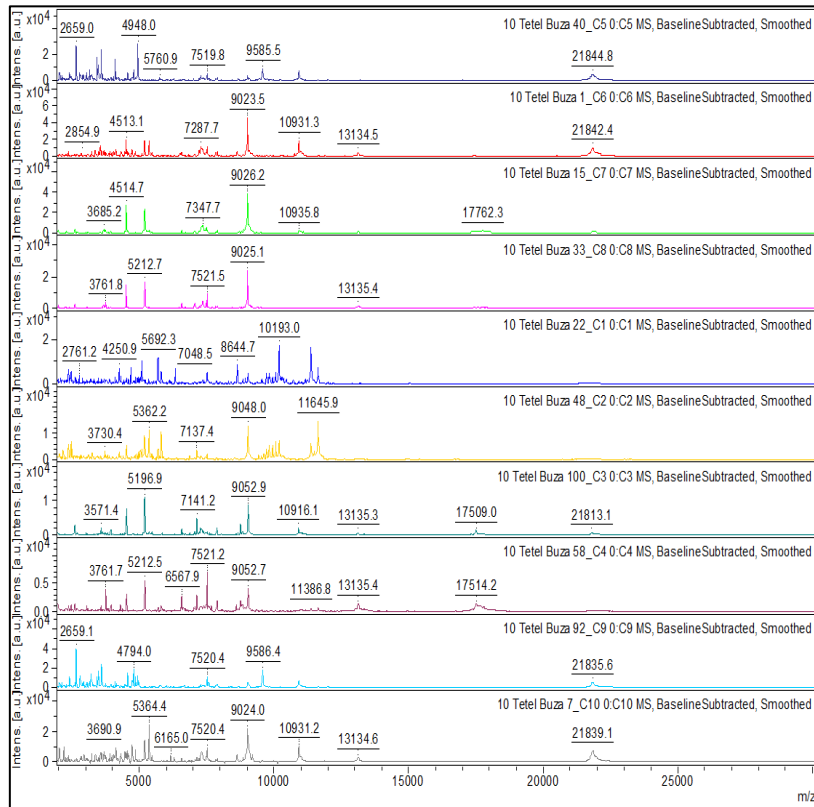
75. melléklet: Búza (*Triticum aestivum*) – 5. tétel -10 szem spektruma lista nézetben



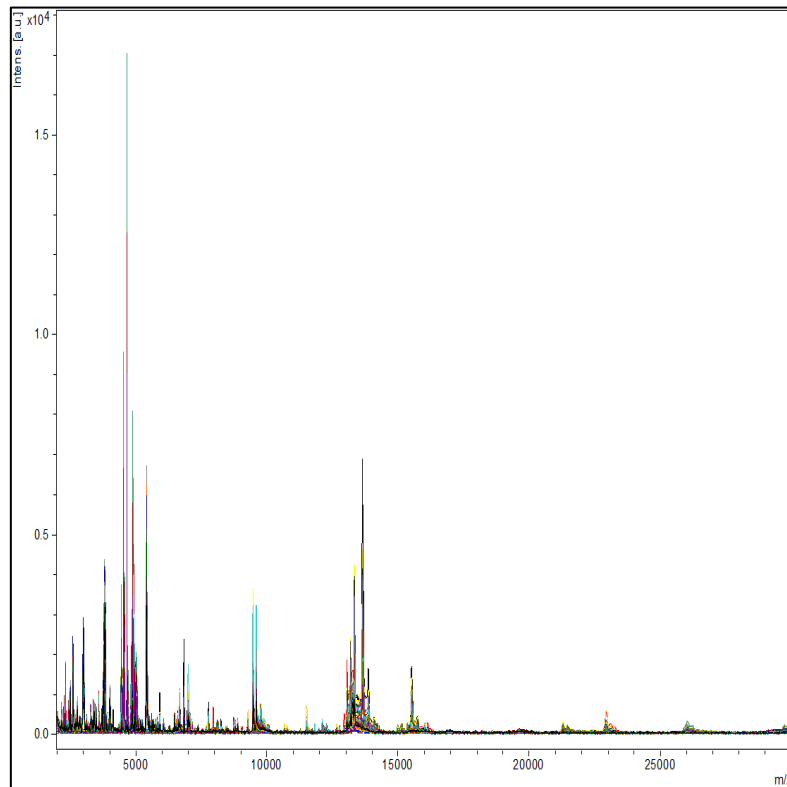
76. melléklet: Búza (*Triticum aestivum*) – 6. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



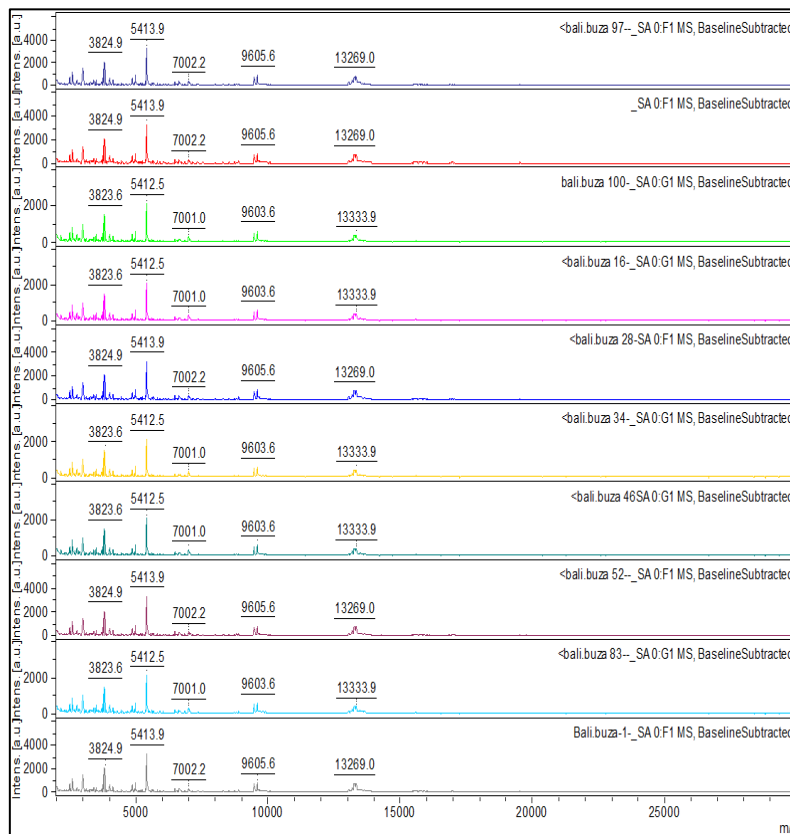
77. melléklet: Búza (*Triticum aestivum*) – 6. tétel -10 szem spektruma lista nézetben



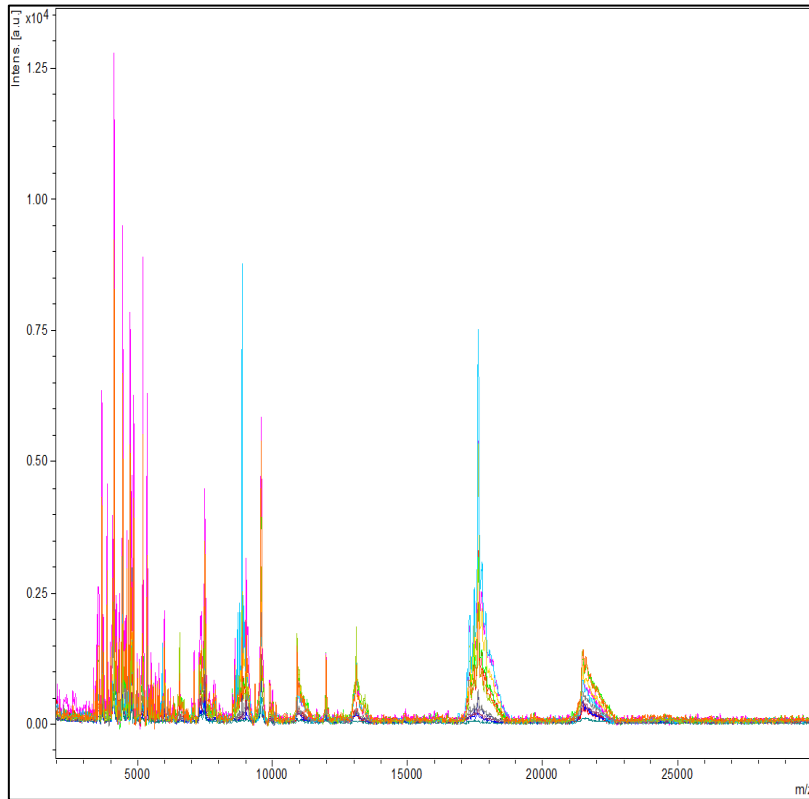
78. melléklet: Búza (*Triticum aestivum*) – 7. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



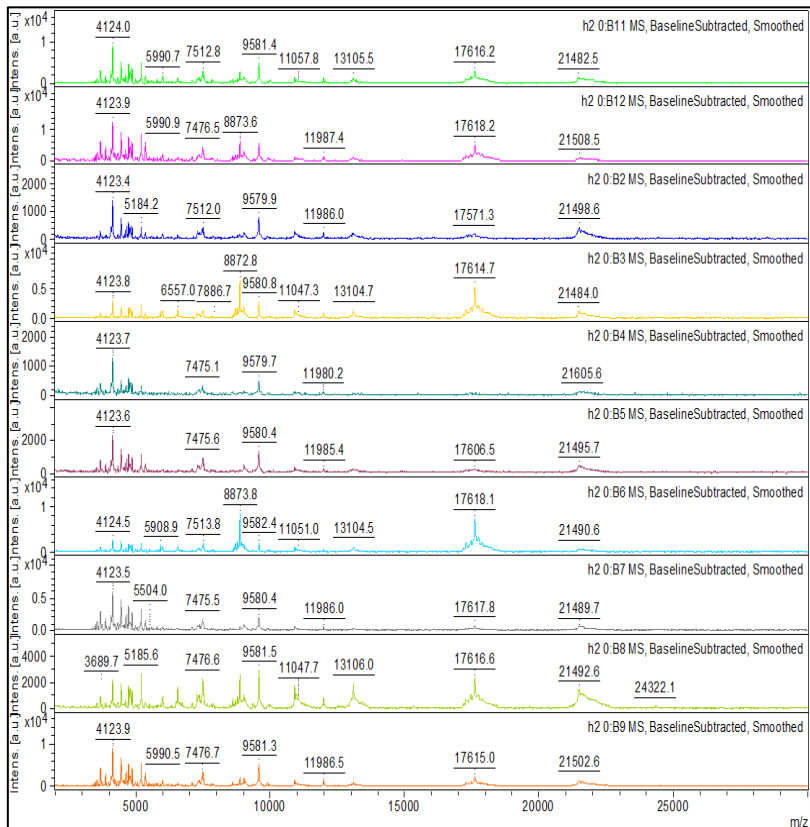
79. melléklet: Búza (*Triticum aestivum*) – 7. tétel -10 szem spektruma lista nézetben



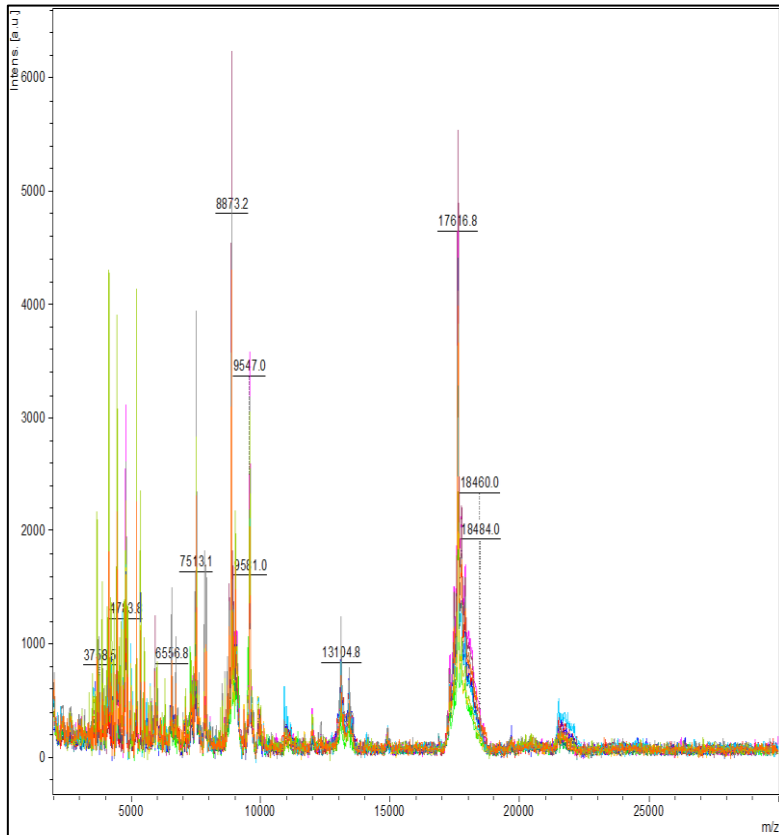
80. melléklet: Búza (*Triticum aestivum*) – 8. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



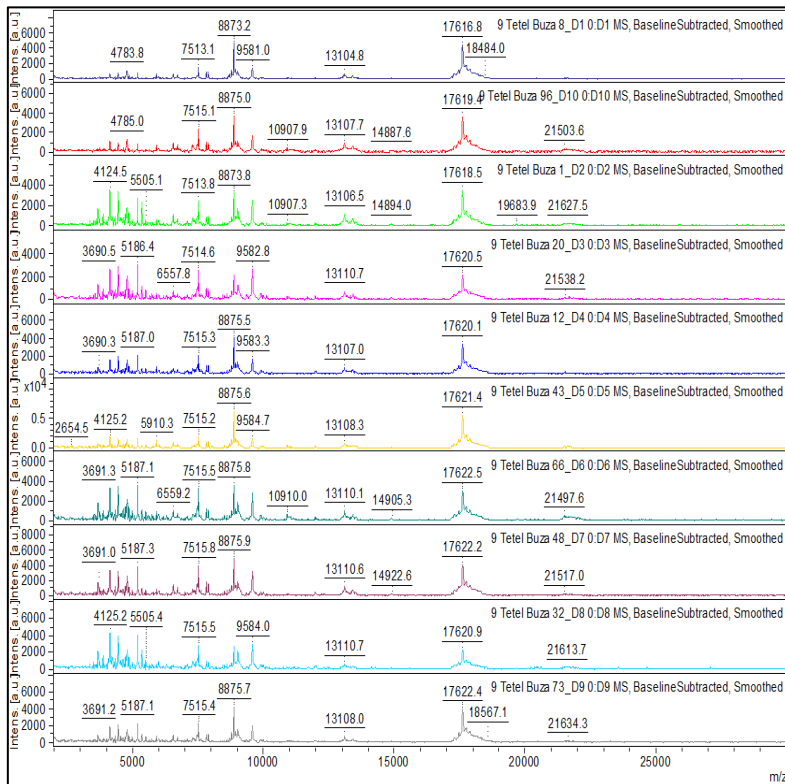
81. melléklet: Búza (*Triticum aestivum*) – 8. tétel -10 szem spektruma lista nézetben



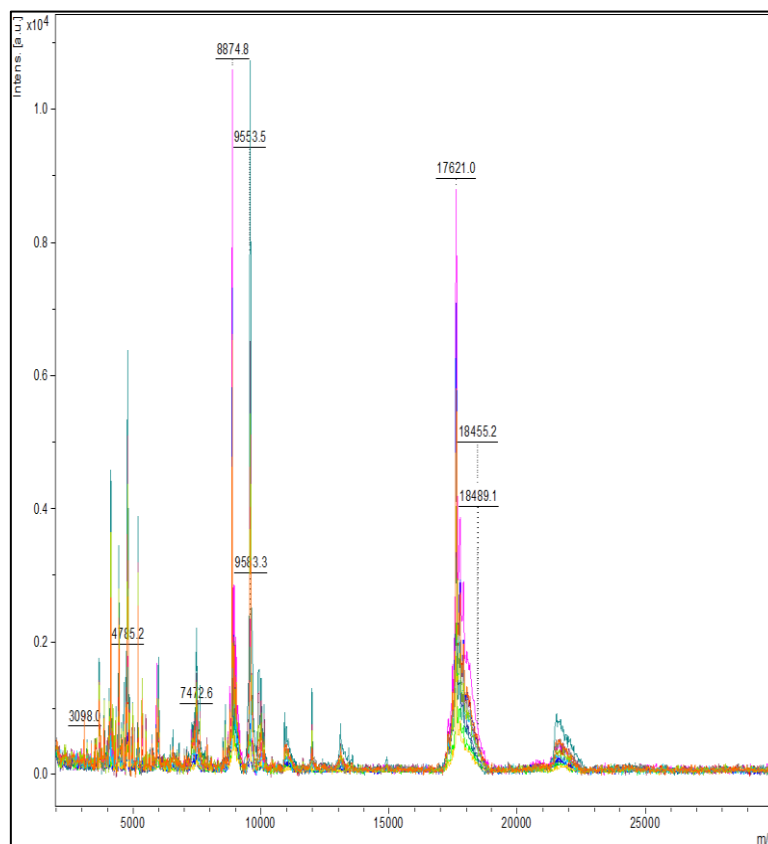
82. melléklet: Búza (*Triticum aestivum*) – 9. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



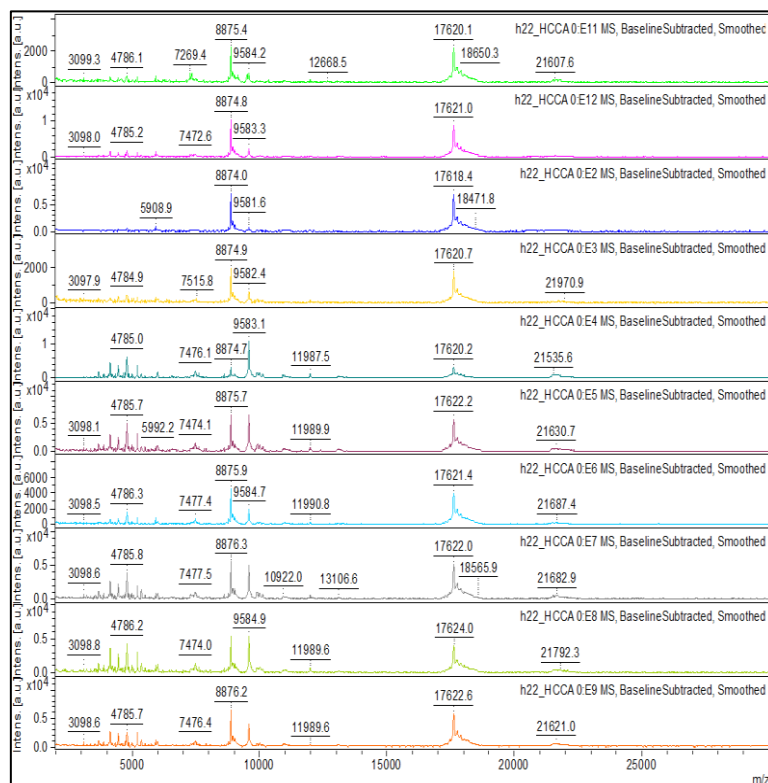
83. melléklet: Búza (*Triticum aestivum*) – 9. tétel -10 szem spektruma lista nézetben



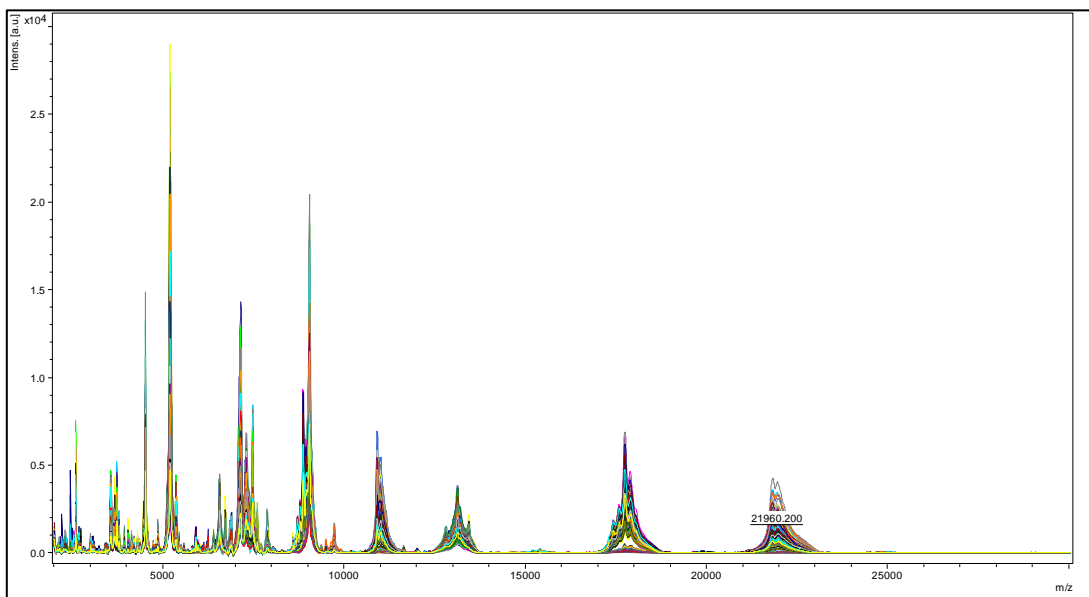
84. melléklet: Búza (*Triticum aestivum*) – 10. tétel - vizsgálatának eredményei 100 szem spektruma egymásra vetített nézetben



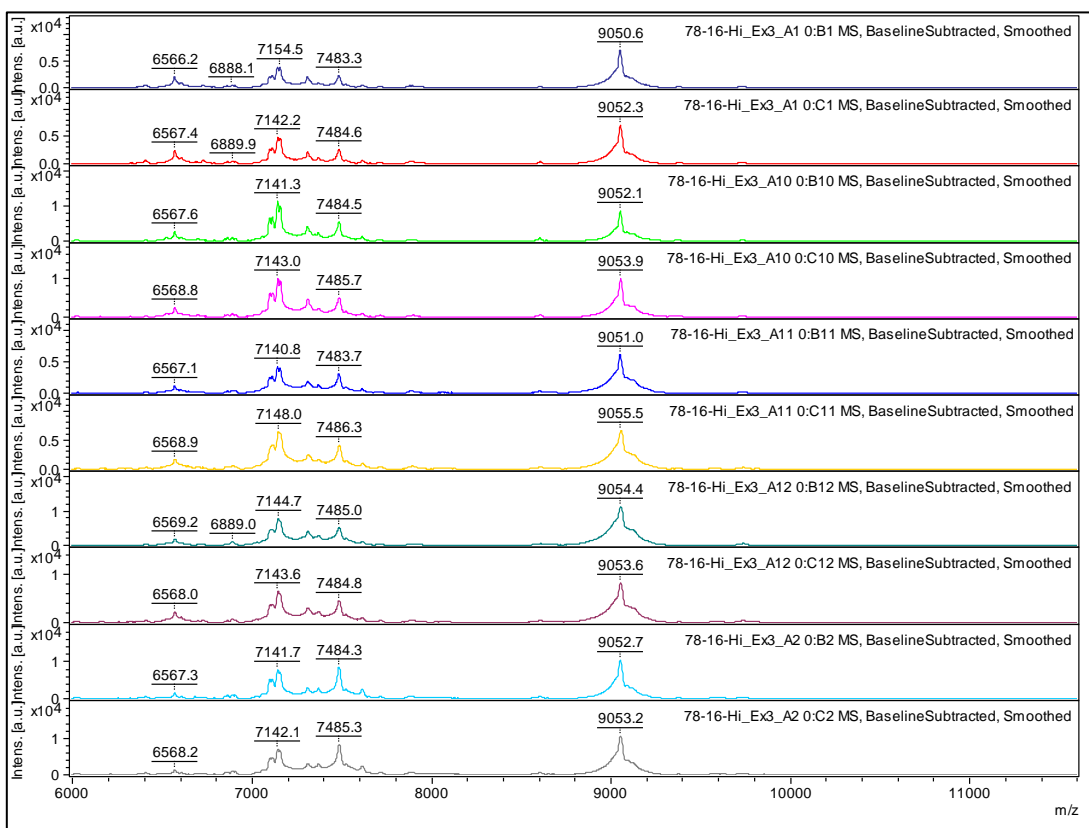
85. melléklet: Búza (*Triticum aestivum*) – 10. tétel -10 szem spektruma lista nézetben



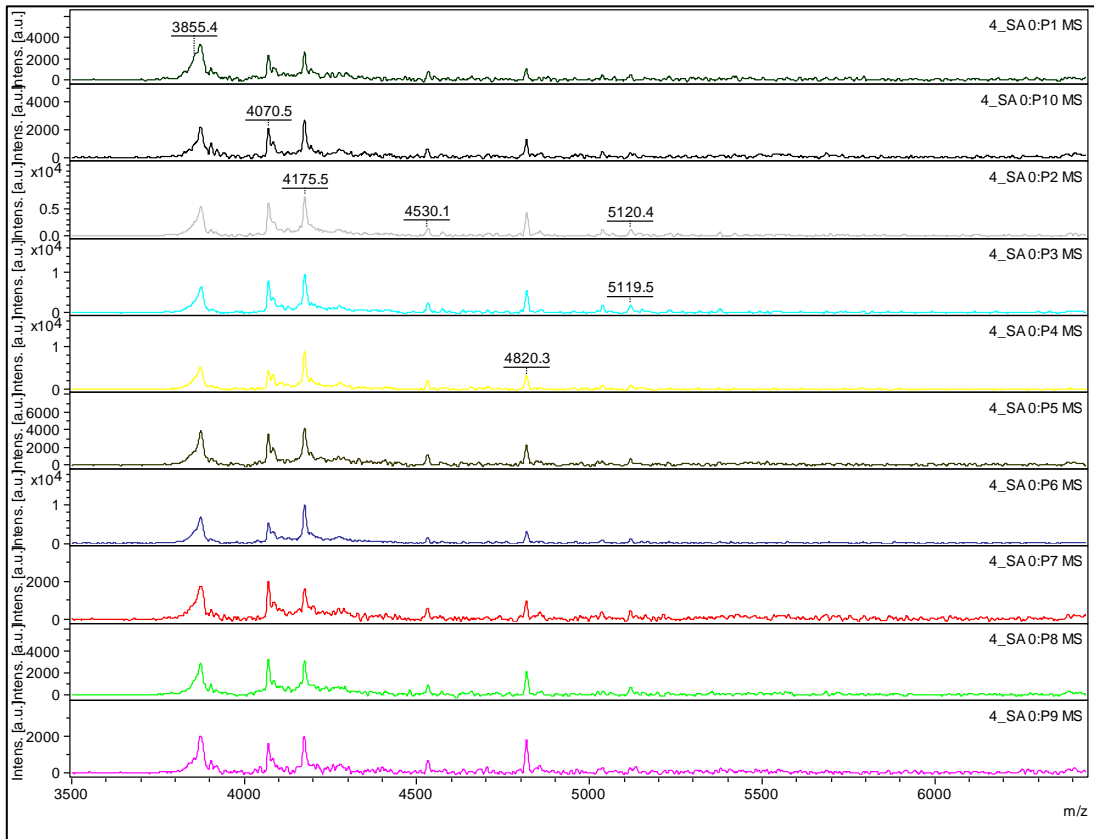
86. melléklet: Szója – 3. minta M/Z értékek kiértékelése egymásra vetített spektrumok alapján



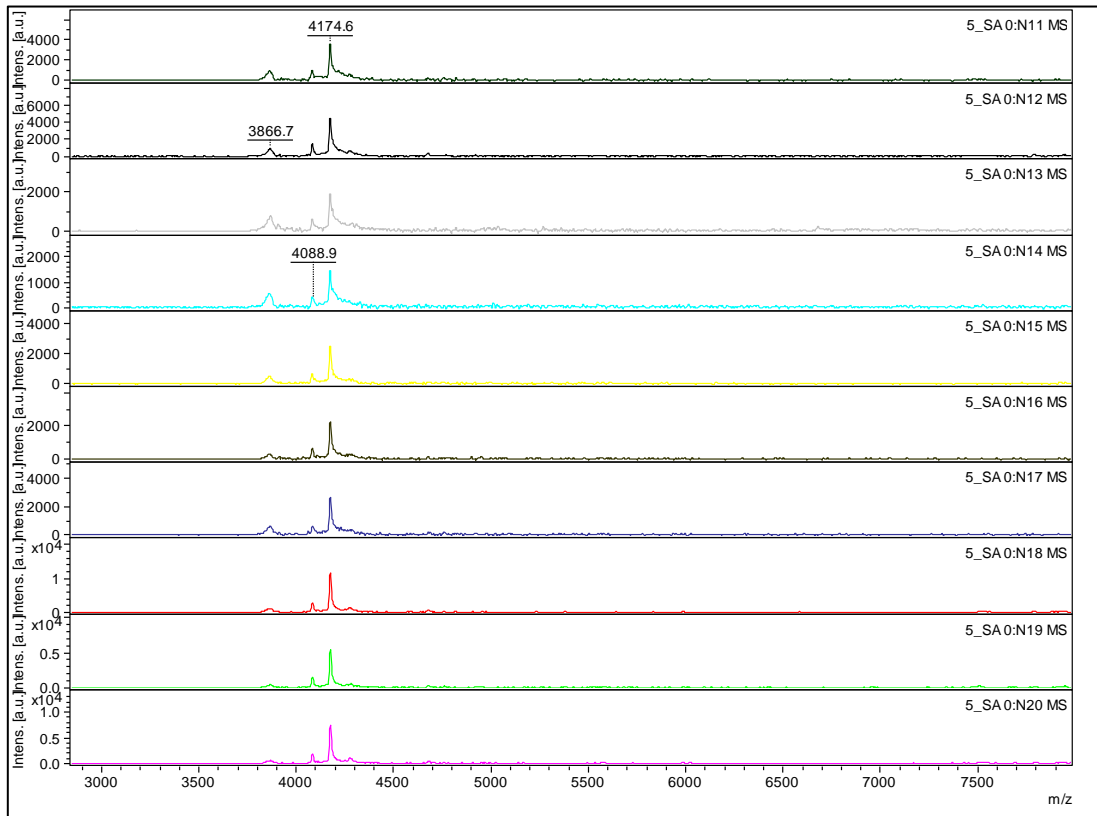
87. melléklet: Szója – 3. minta M/Z értékek kiértékelése lista nézetben



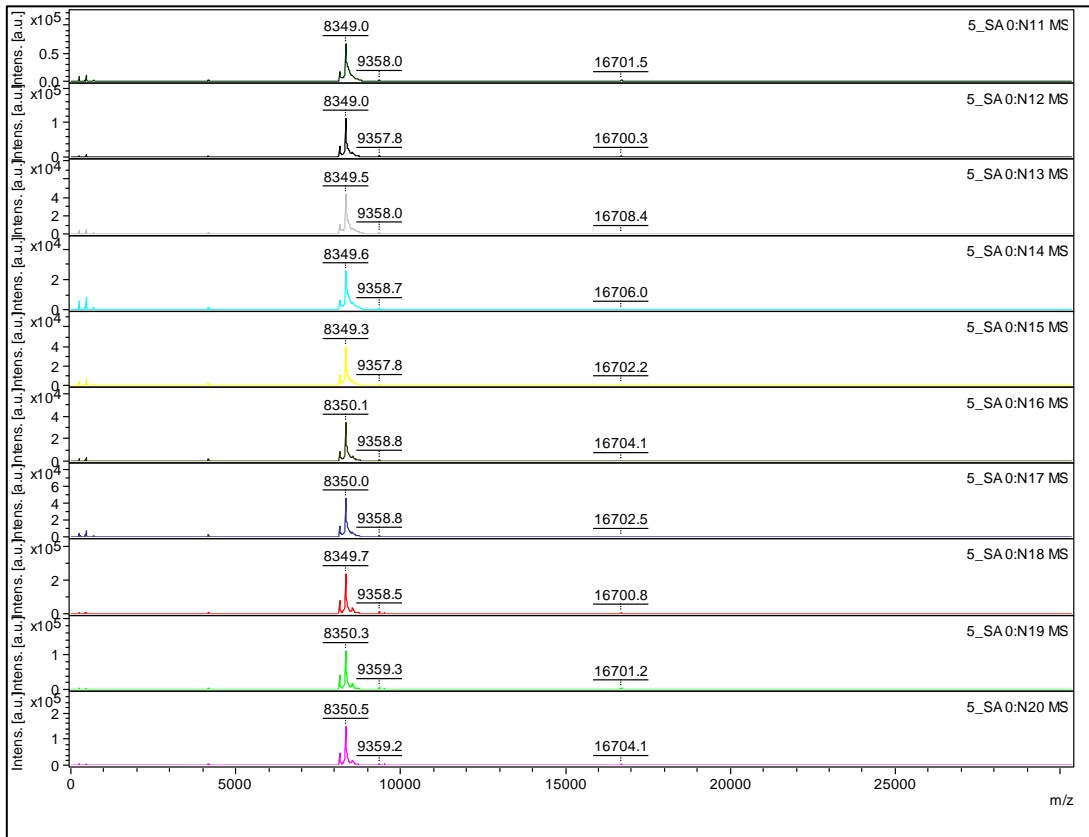
88. melléklet: Szója – 4. minta M/Z értékek kiértékelése lista nézetben



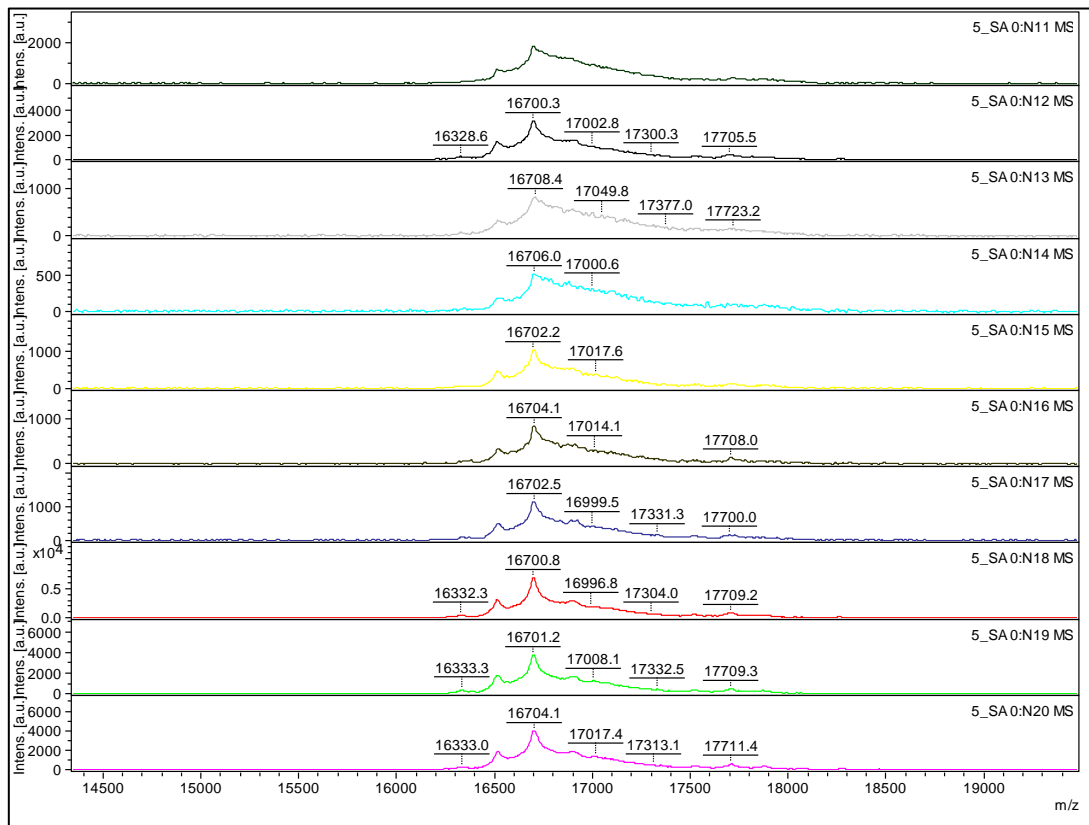
89. melléklet: Szója – 5. minta M/Z értékek kiértékelése lista nézetben



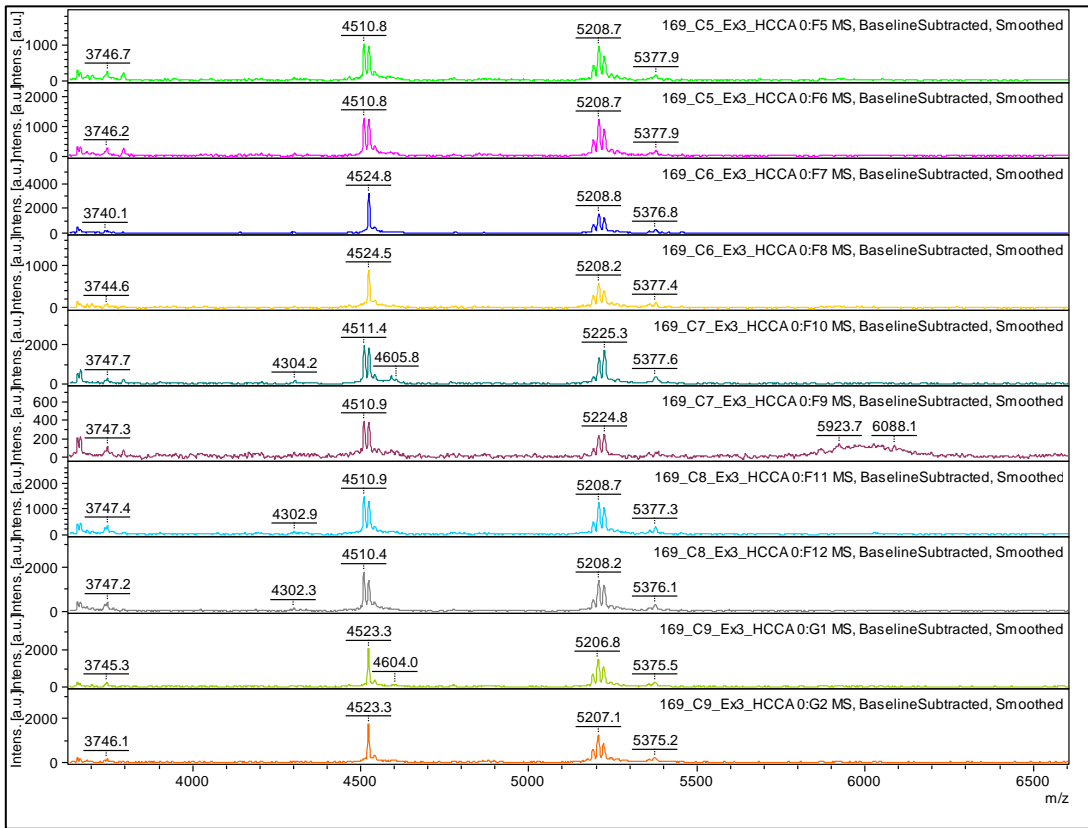
90. melléklet: Szója – 5. minta M/Z értékek kiértékelése lista nézetben



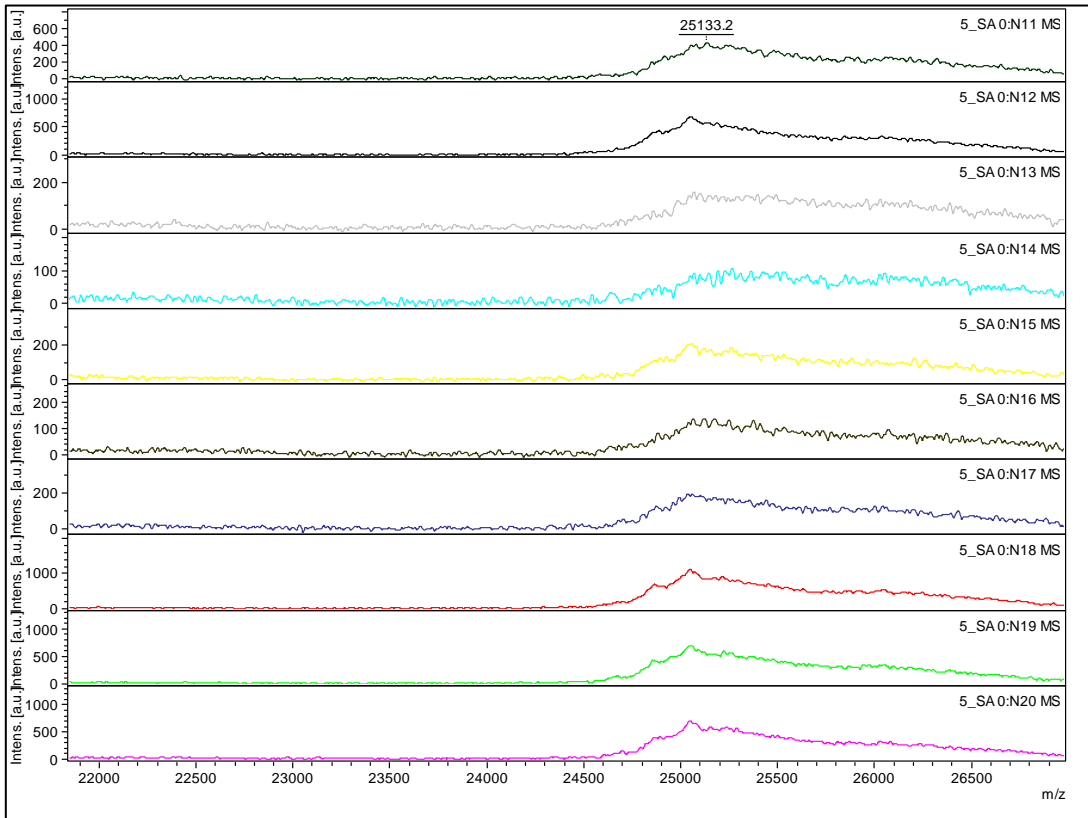
91. melléklet: Szója – 5. minta M/Z értékek kiértékelése lista nézetben



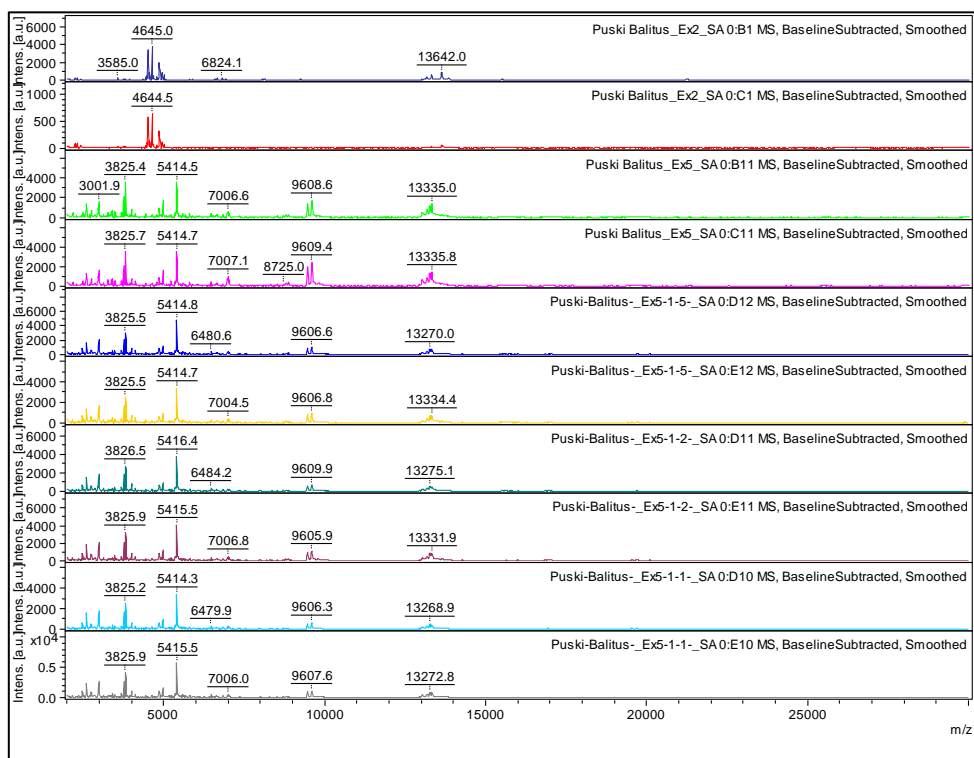
92. melléklet: Szója – 6. minta M/Z értékek kiértékelése lista nézetben



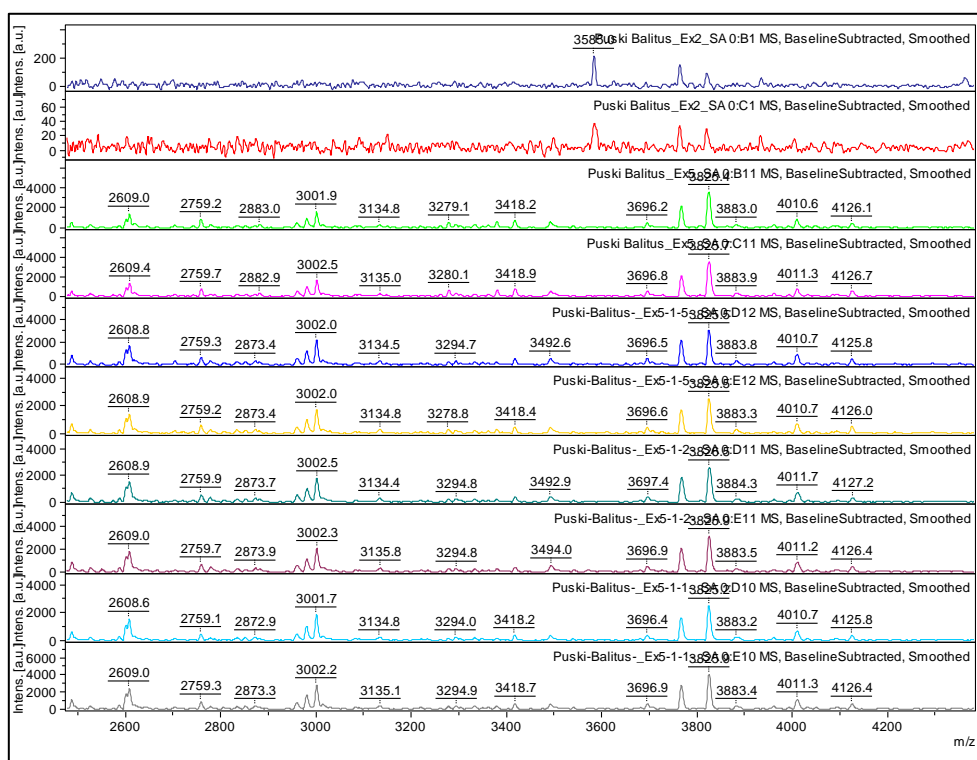
93. melléklet: Szója – 6. minta M/Z értékek kiértékelése lista nézetben



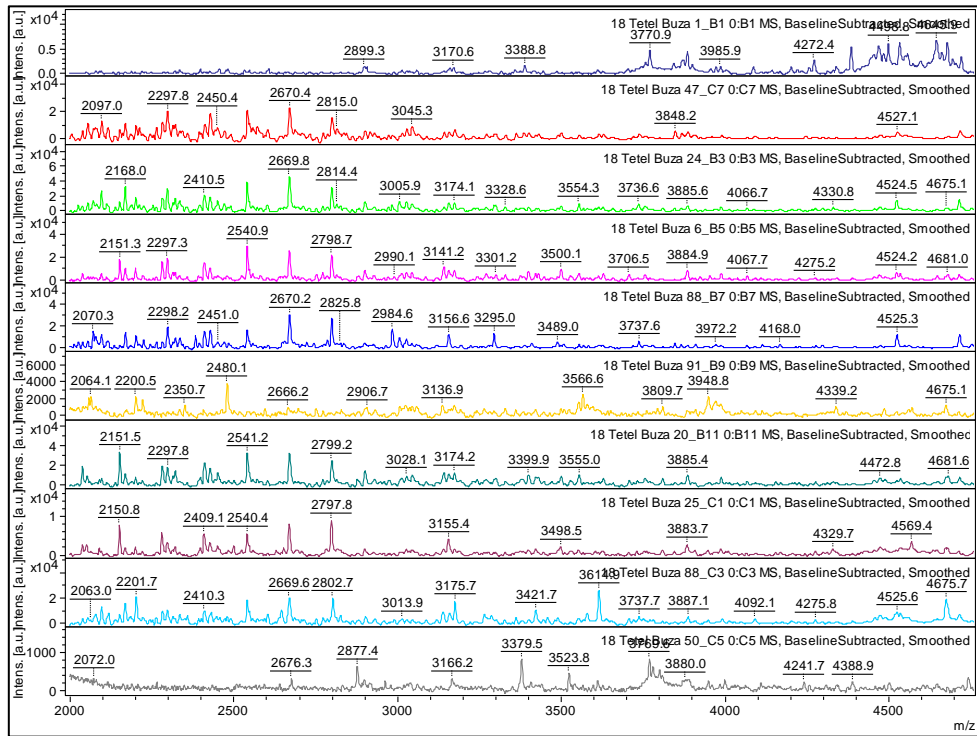
94. melléklet: Búza – 3. minta M/Z értékeinek kiértékelése lista nézetben



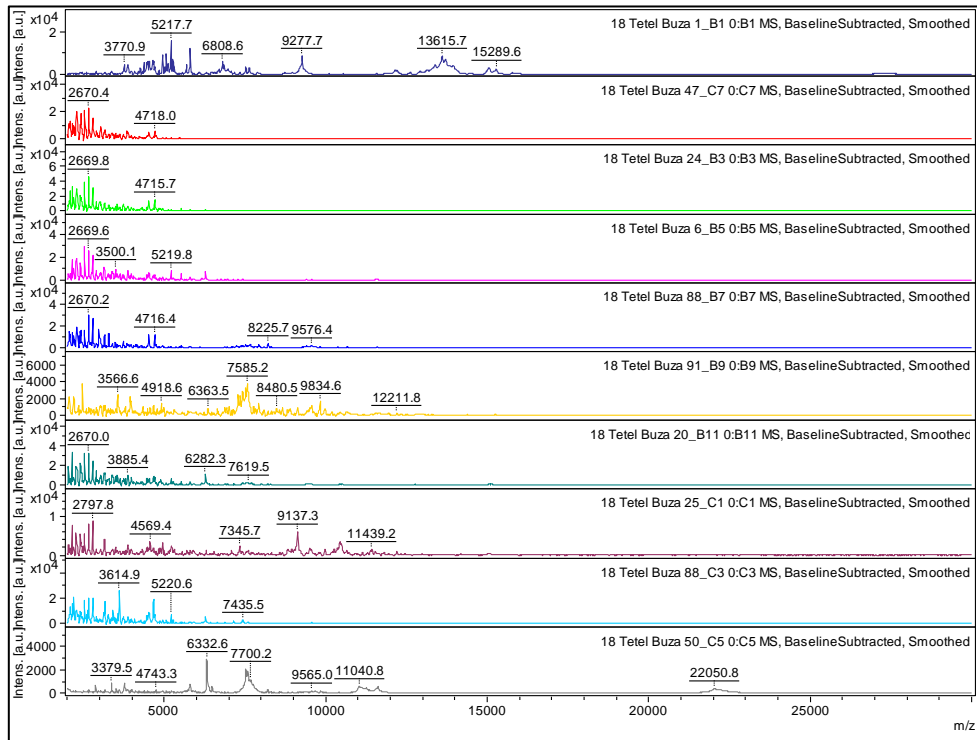
95. melléklet: Búza – 3. minta M/Z értékeinek kiértékelése lista nézetben



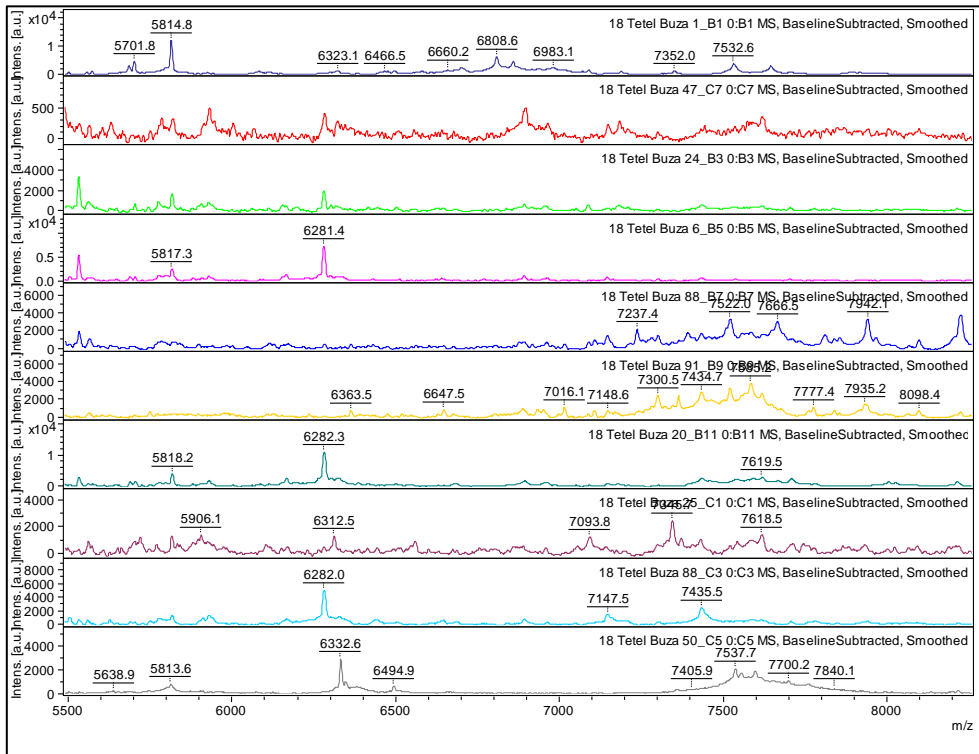
96. melléklet: Búza – 6. minta M/Z értékeinek kiértékelése lista nézetben



97. melléklet: Búza – 6. minta M/Z értékeinek kiértékelése lista nézetben



98. melléklet: Búza – 6. minta M/Z értékeinek kiértékelése lista nézetben



99. melléklet: Búza – 6. minta M/Z értékeinek kiértékelése lista nézetben

