

Acta Agraria Kaposváriensis



Acta Agraria Kaposváriensis

Az Acta Agraria Kaposváriensis évente több alkalommal megjelenő tudományos folyóirat, amely eredeti tudományos közleményeket, kutatási eredményeket, kritikai összefoglalókat, konferenciákról beszámolókat, könyvismertetéseket és szerkesztőhöz küldött leveleket közöl a mezőgazdaság, elsősorban az állattenyésztés és az állati termék előállítás minden területéről.

Acta Agraria Kaposváriensis is a scientific journal published several times a year, containing original scientific reports, research results, critical résumés, conference reviews, book reviews and letters to the editor related to topics within the field of agricultural science, particularly that of animal breeding science.

Főszerkesztő
Editor in chef

Dr. Csapó János D.Sc......egyetemi tanár

Szerkesztő
Editor

Dr. Kovách Gáborné.....tudományos segédmunkatárs

Szerkesztőbizottság
Editorial board

Dr. Babinszky László Ph.D. egyetemi tanár
Dr. Csató László C.Sc...... egyetemi docens
Dr. Csukás Béla C.Sc. egyetemi docens
Dr. Kalmár Sándor C.Sc...... egyetemi tanár
Dr. Kovács Melinda C.Sc. egyetemi tanár
Dr. Lengyel Attila C.Sc. egyetemi tanár
Dr. Stefler József C.Sc...... egyetemi tanár
Dr. Sütő Zoltán egyetemi docens
Dr. Szakály Sándor S.Sc. egyetemi docens
Dr. Szendrő Zsolt D.Sc...... egyetemi tanár

Volume 9 No 2 2005
ISSN 1418-1789

Acta Agraria Kaposváriensis



Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Kaposvár
University of Kaposvár, Faculty of Animal Science, Kaposvár



Szerkesztőség
Editorial office

Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar
University of Kaposvár, Faculty of Animal Science

H-7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40.
H-7401 Kaposvár, P.O.Box. 16.
Tel.: 36-82-314-155, 505-800, 505-900; Fax: 36-82-320-175
e-mail: csapo@mail.atk.u-kaposvar.hu

Szerkesztő asszisztens *Editorial assistants*
Barna Róbert
Stanics Judit

Kiadja és terjeszti a
Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar
Published and distributed by
University of Kaposvár, Faculty of Animal Science
H-7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40.
Éves előfizetési díj: 2500 Ft + ÁFA *Annual subscription: Ft 2500 + VAT*
Előfizethető a kiadónál vagy átutalással
Subscriptions may be made payable to the publishers or via account no.
MNB 10039007-01474572-00000000
Készítette a Corvina Nyomda Kft.m 400 pld.-ban
Printed by Corvina Nyomda Ltd., 400 copies produced

Felelős kiadó
Responsible for publication
Dr. Holló István C.Sc.
egyetemi tanár
university professor
dékán
Dean of Faculty

Kaposvár, 2005

TARTALOM

<i>Tőzsér J., Domokos Z., Holló G., Holló I., Bujdosó M., Andrásy Z., Wolcott, M.L.</i> A fartájék bőralatti faggyúvastagságának (P8) mérése real-time ultrahangkészülékkel charolais, holstein-fríz és magyartarka fajtájú bikákon.....	1
<i>Vígh Zs., Nagy I., Farkas J., Csató L.</i> A BLUP alapú tenyésztékek és tenyészethatások kapcsolatának vizsgálata hazai sertésfajtákban.....	13
<i>Varga Gy., Sugár L.</i> Vaddisznó-állományok tüdőfereg-fertőzöttségének és kondíciójának vizsgálata a Zselicségben.....	23
<i>Csapó, J., Lóki, K., Csapó-Kiss, Zs., Albert, Cs.</i> Az aminosavak elválasztása és meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával, oszlop utáni származékképzés alkalmazásával.....	33
<i>Gyenis B., Szigeti J., Molnár N., Varga L.</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> és <i>Enterococcus faecium</i> savtermelésének valamint szaporodásának serkentése tejben, szárított mikroalga biomasszával felhasználásával.....	53
<i>Csapó, J., Csapóné Kiss Zs., Vargáné Visi É. Albert Cs., Salamon R.</i> Különböző technológiával készült sajtok összes szabad és szabad D-aminosav tartalma (előzetes közlemény).....	61
<i>Kárpáti B.I.</i> Az európai agrártámogatások problémái a termelésfüggetlenséggel kapcsolatban.....	73
Rövidített útmutató a kéziratok elkészítéséhez	81

CONTENTS

<i>J. Tőzsér, Z. Domokos, G. Holló, I. Holló, M. Bujdosó, Z. Andrásy, M.L. Wolcott</i> Estimation of fat depth of rump (P8) by real-time ultrasound machine in Charolais, Holstein Friesian and Hungarian Simmental young bulls.....	1
<i>Zs. Vígh, L. Csató, J. Farkas, K. Tisza, I. Nagy</i> Analysis of the connection between the Best Linear Unbiased Prediction (BLUP) based breeding values and estimated herd effects in Hungarian pig breeds.....	13
<i>Gy. Varga, L. Sugár</i> Lungworm occurrence and the physical condition of wild boar in middle Somogy	23

<i>J. Csapó, K. Lóki, Zs. Csapó-Kiss, Cs. Albert</i> Separation and determination of the amino acids by ion exchange column chromatography applying post-column derivatization	33
<i>B. Gyenis, J. Szigeti, N. Molnár, L. Varga</i> Use of dried microalgal biomasses to stimulate acid production and growth of <i>Lactobacillus plantarum</i> and <i>Enterococcus faecium</i> in milk	53
<i>J. Csapó, Zs. Kiss Csapóné, É. Visi Vargáné, Cs. Albert, R. Salamon</i> Total free and free D-amino acid content of cheeses produced by different technologies (preliminary report).....	61
<i>B.I. Kárpáti</i> Issues why the European agricultural subsidies were voidable in terms of decouplement....	73
Guidelines in brief for the preparation of manuscripts.....	81



A fartájék bőralatti faggyúvastagságának (P8) mérése real-time ultrahangkészülékkel charolais, holstein-fríz és magyartarka fajtájú bikákon

**¹Tőzsér J., ²Domokos Z., ³Holló G., ³Holló I., ⁴Bujdosó M.,
³Andrássy Z., ⁵Wolcott, M.L.**

¹Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Szarvasmarha- és Juhtenyésztési Tanszék, Gödöllő, 2103 Páter Károly u. 1.

²Magyar Charolais Tenyésztők Egyesülete, Miskolc, 3525 Vologda út 3.

³Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Kaposvár, 7400 Guba Sándor u.40.

⁴Charolais Kft. Lajosmizse, 6050 Dózsa György u. 106.

⁵New England Egyetem, Armidale, 2351NSW, Australia

ÖSSZEFOGLALÁS

Célunk a Falco 100 (Pie Medical, 3,5 MHz-es mérőfejes) ultrahangkészülék kipróbálása volt, a fartájék bőralatti faggyúvastagságának (P8) mérésére. Az első vizsgálatokat egy charolais tenyészetben tenyészbika-jelöltekkel 2004-ben az STV (sajátteljesítmény vizsgálat) végén két csoportban végeztük (1. szarvalt, n=13, 2. szarvatlan, n=23). A második vizsgálat során (Kaposvári Egyetem, Tan- és Kísérleti Üzem) holstein-fríz és magyar tarka hizóbikákat értékeltünk (1. holstein-fríz, n=13, 2. magyartarka, n=11). Mindkét helyen az állatokat mélyalmon, kiscsoportban tartották, tömegtakarmányra (silókukorica-szilázs és széna), továbbá abrakra alapozott takarmányozással. Az ultrahangos készülékkel mértük a far bőr alatti faggyútartalmát. Az első vizsgálatban igazolták, hogy a bőr alatti faggyú vastagságában nem volt eltérés a szarvatlan és a szarvált csoport között (P8 szarvált: 0,46 cm; P8 szarvatlan: 0,47 cm). A második vizsgálatban a P8 átlagértékei a két csoportban szintén nem különböztek szignifikánsan, holstein-fríz: 0,30 cm, magyartarka: 0,39 cm. A P8 és az életkor, ill. az élő súly közötti korrelációkat elemezve megállapítottuk, hogy érdemi lineáris összefüggés csak az élő súly és a P8 érték között számítható ($r=0,42-0,75$, $P<0,05$). Eredményeink szerint az ultrahangkészülékkel végzett P8 mérések a húshasznú tenyészbika-jelöltek minősítési rendszerébe, ill. a hizlási tevékenységbe egyaránt beilleszthető, mivel kiegészítő információval szolgál az állatok faggyúsodásának intenzitásáról.

(Kulcsszavak: real time ultrahang, bőralatti faggyúvastagság mérése a faron (P8), charolais, holstein-fríz, magyartarka bikák)

ABSTRACT

Estimation of fat depth of rump (P8) by real-time ultrasound machine in Charolais, Holstein Friesian and Hungarian Simmental young bulls.

J. ¹Tőzsér, Z. ²Domokos, G. ³Holló, I. ³Holló, M. ⁴Bujdosó, Z. ³Andrássy, M.L. ⁵Wolcott

¹Szent István University, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, Gödöllő, H-2103 Páter Károly u. 1.

²Association of Hungarian Charolais Cattle Breeders, H-3525, Miskolc, Vologda út 1.

³University of Kaposvár, Faculty of Animal Science, Kaposvár, H-7400 Guba Sándor u.40.

⁴Charolais Ltd. Lajosmizse, H-6050 Dózsa György út 3.

⁵The University of New England, Armidale, 2351NSW, Australia

Authors' aim was to test Falco100 (Pie Medical, 3.5 MHz head) ultrasound equipment for measuring the P8 (fat depth of rump) in Charolais, Holstein-Friesian and Hungarian

Simmental young bulls. First research was carried out in 2004 in a Hungarian farm, with two groups of Charolais sire candidates (1st group: horned, n=13 and 2nd group: polled, n=23) at the end of performance test. The second research was carried out at the Experimental Farm of the University of Kaposvár, in year 2004, with two groups of fattening bulls (1st group: Holstein Friesian, n=13 and 2nd group: Hungarian Simmental, n=11). Bulls were kept on deep litter, in small groups, and fed on corn silage, hay and concentrate in both cases. Subcutaneous rump fat thickness (P8) was measured by Falco 100 with real time ultrasound equipment. Results of one-sample t-test showed that there was no significant difference between polled and horned groups of Charolais bulls in P8 (0.46 cm, and 0.47 cm). We observed similar values of P8 by the 2nd experiment in both breeds (Holstein Friesian: 0.46, Hungarian Simmental: 0.47 cm). Medium, and close correlation ($r=0.42-0.75$, $P<0.05$) were calculated between P8 and live weight in the two experiments. Based on their results, authors propose the involvement of P8 ultrasonic measurements into the selection system of beef sire candidates. Measurement of P8 gives additional information about fattening intensity of cattle.

(Keywords: real-time ultrasound, measurement of P8 (depth of rump subcutaneous fat), Charolais, Holstein Friesian and Hungarian Simmental bulls)

BEVEZETÉS

A *szarvasmarha-tenyésztés* mindkét hasznosítási irányában (tej-, hústermelés), mindkét ivarban, minden életkorban fontos az egyedek *kondíciójának* ismerete.

A hazai húsmarha tenyésztésben *nem elterjedt gyakorlat a tehének kondíciójának* (erőnléti és tápláltsági állapot) vizsgálata annak ellenére, hogy rendszeres értékelése fontos az alábbiak miatt.

- A tehén *kondíciója* jelentősen befolyásolja az *élőszúlyt*, ezért korrigálása indokolt (pl. amerikában 2 pont esetében +256 font, 6 pontnál 0, és 8 pontnál –190 font). Ugyanez a helyzet bizonyos *testméretekkel* is pl. övméret, vagy ferde törzshossz.
- A kondíció ellenőrzésével elkerülhetjük teheneink *túl-, ill. alultáplálását*. A *túlzott faggyúsodás* (kövér tehén) esetén *gyakoribb* a nehéz ellés.
- A *javuló tehénkondíció* (3,5; ill. 6 pont) szükséges a *beteleltetéskor* (alacsony táplálóanyag szinten történő téli tartás), ill. a *termékenyítési időszak kezdetekor* (fokozódó ivarzás és kedvező fogamzás) is.
- A bírálati rendszert a tenyésztő *könnyen elsajátíthatja*.

A kondíció, mint a *gulyakészség* egyik ismérve (szezonális ellés, hasznos élettartam, selejtezési okok) alapvető tulajdonság a húsmarha-tenyésztés anyatehéntartás fázisában.

A *bikákat* illetően, a tenyészállatoknál közismert, hogy az alul-, vagy túltápláltság az ondóminőséget, ill. a libidót kedvezőtlenül befolyásolja. A hízóbikák vágásérettségének egyik jellemzője a *bőr alatti faggyúdepók* megjelenése bizonyos testtájakon pl. nyak, faroktő, hereborék stb. Ennek pontos ismertetere – az amerikai és ausztrál napi gyakorlat szerint – piaci előnyhöz juttathatja a farmert.

A kondíció értékelésre *két pontozási módszer* is használható: a *francia* (1-5 pontos, tapintás és vizuális értékelés, Agabriel és mtsai., 1986), továbbá az *amerikai* (1-9 pont, főleg vizuális értékelés, Richard és mtsai., 1986). A francia és az amerikai pontozási rendszer eredményei között számított *korrelációk* (charolais bikák, $r=0,60$, $P<0,05$; charolais tehének, $r=0,42$, $P<0,01$) arra hívják fel a figyelmet, hogy a *két vizsgálati módszer teljesen nem helyettesíthető egymással* (Tőzsér és mtsai., 2001). Határesetekben szükséges lehet más módszer alkalmazása is a kondíció pontosabb megállapítása érdekében, pl. a bőr alatti faggyúból származó zsírszövet zsírsajtjei méretének megállapítása, mint ahogy erre korábban felhívtuk már a figyelmet (Tőzsér és mtsai., 1995). Ennek a

módszernek az alkalmazását korlátozza az, hogy a mintavétel helyi érzéstelenítést, véres, valamint laboratóriumi munkákat is igénylő eljárás. Az *ultrahangos méréstechnika*, amelyet a *humángyógyászatban* alkalmaztak először az 1940-es évek elején, viszont alkalmasnak tűnhet mint referencia módszer. Haszonállatok közül elsőként a szarvasmarhán *Temple és mtsai.*, (1956), továbbá *Claus* (1957) végeztek ilyen méréseket.

Az ultrahangos készülékek alkalmazásával kapcsolatban többen felhívják a figyelmet, a mérést és a képfeldolgozást végző személy gyakorlottságára, valamint a technikai feltételek biztosítására (*Robinson és mtsai.*, 1992; *Herring és mtsai.*, 1994; *Wilson és mtsai.*, 2000). *Dobrowolski és mtsai.*, (1993) a megfelelő technikai feltételek teljesülésekor az ultrahangos mérések *ismételhetőségét igen magasnak* ($R=0,99$), *megbízhatóságát pedig nagyon jónak* ($R^2=0,79-0,92$) találták.

A bőr alatti faggyúvastagság (pl. ágyék, far tájék) mérésének elvi alapját az adja, hogy ezek az adatok szoros összefüggésben ($r=0,80-0,87$) állnak a teljes faggyú %-kal (*Klawuhn és Staufenbiel*, 1997).

A bőr alatti faggyú vastagságának mérése az ultrahang képek alapján megoldható, de a far tájékon – a nagyobb variancia miatt – kedvezőbb a mérés, mint a *rostélyos régiójában* (*Walter*, 2002).

Köztudottan a bőr, ill. a bőralatti faggyuréteg régiója több részből áll a szarvasmarha far tájékán: 1, *bőrr* 2, *laza zsírszövet*; 3, *kemény zsírszövet*; 4, *fascia superficialis*; 5, *inrefascialis zsír*; 6, *fascia profunda*; 7, *izom*. Ennek nagysága a bőrtől az izom régiójáig 5–40 mm között mozoghat.

Több kutató szoros összefüggéseket talált az *in vivo* és a *vágás után* mért eredmények között: *háti faggyúvastagság*: $r_f=0,58$ (*Field és mtsai.*, 2000); illetve $r_f=0,75$ (*Song és mtsai.*, 2002); *bordatáji faggyúvastagság*: $r_f=0,90$ (*Robinson és mtsai.*, 1992); *faroktői faggyúvastagság*: $r_f=0,92$ (*Robinson és mtsai.*, 1992); mérsékelt övi fajták, $r_g=0,80$; ill. trópusi fajták, $r_g=0,88$ (*Reverter és mtsai.*, 2003).

Brito és mtsai. (2000) ultrahangos mérések alapján becsülő egyenleteket dolgoztak ki a vágott test összetevőinek előrejelzésére. A legnagyobb megbízhatósággal ($R^2=0,82$) a vágóértéket lehet becsülni az élősúly, a 12. bordánál mért bőr alatti faggyuréteg vastagsága és az ugyanitt mért hosszú hátizom területe alapján. *Devitt és Wilson* (2000) a tenyészbika-jelöltek éves korban végzett ultrahangos mérési eredményeit az ivadékaik vágási adataival vetette össze. Eredményeik alapján ($r=0,66-0,88$) javasolják a tenyészbika-jelöltek ultrahangos mérését a szelekciós rendszerbe beépíteni.

Hazánkban ez ideig csak magyar szürke és charolais fajtában végeztek ultrahangos méréseket a *hosszú hátizom területének* becslésére *18 cm-es real-time ultrahangkészülékkel*.

Magyar szürke bikákon végzett mérések alapján a *rostélyos becsült felülete* és a *csontozási paraméterek* között közepes, illetve szoros összefüggéseket számítottak (hús, kg: I. $r=0,88$, $P<0,05$; II. $r=0,66$, $P<0,05$; kivágott faggyú, kg: I. $r=-0,59$; II. $r=0,52$; csont, kg: I. $r=0,89$, $P<0,05$; II. $r=0,57$).

Eredményeik szerint az ultrahangkészülékkel való mérések a húshasznú tenyészbika-jelöltek minősítési rendszerébe beilleszthetők, jól kiegészítik a növekedési intenzitásra, -kapacitásra, és küllemre vonatkozó eredményeket (*Tőzsér és mtsai.*, 2004/a).

A *charolais fajtában* is végeztek méréseket. Megállapították, hogy az azonos környezetben nevelt *charolais bikák és üszők becsült rostélyos felülete* – 545, ill. 540 napos életkorban – szignifikáns mértékben *nem különbözött* egymástól ($86,4 \text{ cm}^2$; $80,2 \text{ cm}^2$) (*Tőzsér és mtsai.*, 2004/b).

Vizsgálatunk célja *szarvalt, ill. szarvatlan charolais tenyészbika-jelöltek*, valamint *holstein-fríz és magyartarka hízóbikák* far bőralatti faggyúvastagságának (P8) *in vivo* becslése volt *real-time scannerrel* készített képek értékelésével.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Az első vizsgálatban 2004-ben, egy gazdaságban *charolais* szarvalt (*első csoport*, $n=13$, életkor: $382\pm 19,91$ nap; élősúly: $469\pm 54,81$), ill. szarvatlan (*második csoport*, $n=23$, életkor: $390\pm 40,97$ nap; élősúly: $484\pm 61,39$; homo- és heterozigóták együtt) bikákat értékeltünk. *A második vizsgálatban* szintén 2004-ben a Kaposvári Egyetem Tan- és Kísérleti Üzemében *holstein-fríz* (*első csoport*, $n=13$; életkor: $354\pm 11,62$ nap, élősúly: $434\pm 38,07$), és *magyartarka* (*második csoport*, $n=11$; életkor: $357\pm 23,47$ nap; élősúly: $475\pm 51,39$) bikákat vizsgáltunk.

Tartás és takarmányozás: a bikákat mindkét helyen kis csoportban, mélyalmos istállóban, tömegtakarmánnyal (kukoricaszilázs, széna) és abrakkal etetve neveltük.

Az *ultrahangos képalkotást* in vivo, hordozható *Falco 100* (Pie Medical) készülékkel végeztük, 61 fókuszpontonál, 5 cm-en. A 18 cm-es lineáris mérőfej áthatoló képessége (mélysége) 30 cm, hullámhossza 3,5 MHz. A képeket és mérési eredményeket merevlemezre mentettük (16 kép/lemez). A far bőr alatti faggyúvastagság mérésére a gépre telepített szarvasmarha húsvizsgálatot értékelő programot használtuk.

A megfelelő minőségű képalkotás feltételei: az állat rögzítése (nyakszorító karamban) és nyírása, ha szükséges. Az *1. kép* a mérendő felület napraforgó olajjal történő bekenését mutatja.

1. kép:

A fartájék olajozása



Photo 1: Oiling of P8 site (fat depth of rump)

Mérés: bőralatti faggyúvastagság a faron (P8: a 3. keresztcsonti csigolya magasságában a gerincoszlopra bocsátott merőleges és az ülőgumótól a gerincoszloppal párhuzamos egyenes metszéspontján, mely a valóságban kb. 1 tenyéri távolságot jelent a gerincoszloptól.). A mérés helyét és módját *2. kép* illusztrálja. A *3-5. kép* az ultrahangképeken végzett mérések eredményét szemlélteti fajtánként.

2. kép

A P8 mérésének helye és módja



Photo 2: Scanning position on P8 site (fat depth of rump)

3. kép

A P8 (fartájéki bőralatti faggyúvastagság) mérése a faron charolais bikán

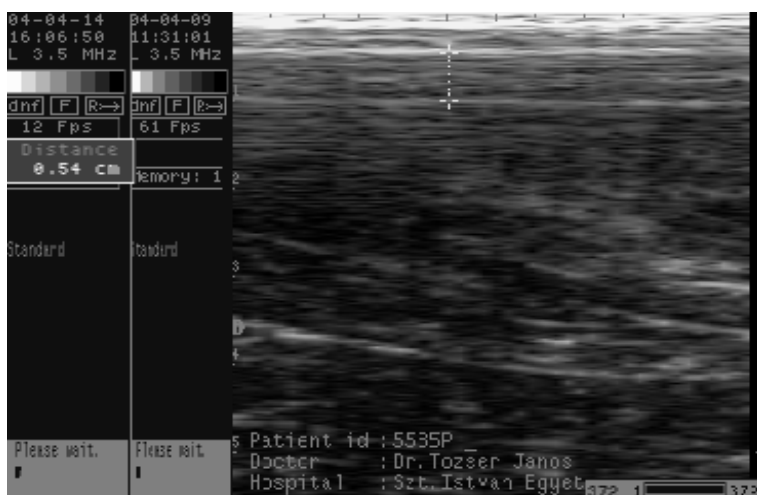


Photo 3: Measurement of P8 (fat depth of rump) in Charolais bull

4. kép

A P8 (fartájéki bőralatti faggyúvastagság) mérése a faron holstein-fríz bikán

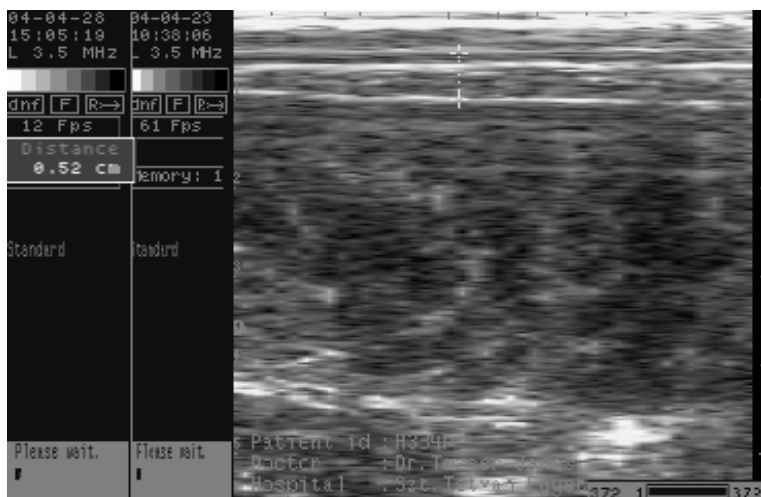


Photo 4: Measurement of P8 (fat depth of rump) in Holstein Friesian bull

5. kép:

A P8 (fartájéki bőralatti faggyúvastagság) mérése a faron magyar tarka bikán

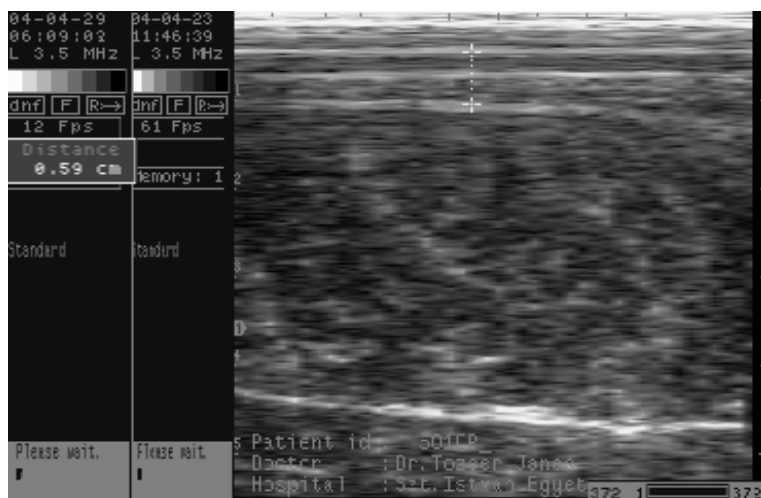


Photo 5: Measurement of P8 (fat depth of rump) in Hungarian Simmental bull

Mindkét vizsgálatban a csoportok közötti különbségek megállapításra egymintás t-próbát alkalmaztunk. A tulajdonságok közötti összefüggések számítására korreláció-analízist végeztünk.

EREDMÉNY ÉS ÉRTÉKELÉS

Az *első* vizsgálatban a P8-ra vonatkozó átlagértékeket, szórásokat és standard hiba értékeket az 1. ábra, továbbá az 1. táblázat szemlélteti. A *charolais* bikák P8 átlagértékei a következők voltak: szarvalt: $0,46 \pm 0,08$ cm, szarvatlan: $0,47 \pm 0,14$ cm, $P > 0,05$. Ahogy az 1. ábrán is látszik a szarvatlan csoportban az átlagérték hibája és a szórás érték valamelyest nagyobb a szarvalt csoport hasonló értékénél.

1. ábra

P8 átlagértékei a charolais bikacsoportokban

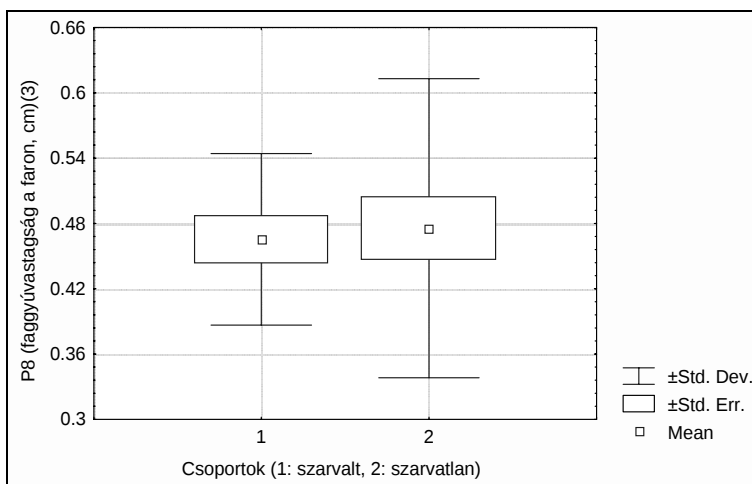


Figure 1: Averages of Charolais bull groups on P8 site

Horned (1), Polled (2), P8 (fat depth of rump)(3)

1. táblázat

Szarvatlan és szarvalt charolais, valamint magyartarka és holstein-fríz bikák bőr alatti faggyúvastagsága a fartájékon (P8)

Vizsgálat(1)	Fajta(2)		Életkor, nap(8)	Élőtömeg, kg(9)	P8
I.	Charolais(3)	Szarvalt(4)	382±19,91	469±54,81	0,46±0,08
		Szarvatlan(5)	390±40,79	484±61,39	0,47±0,14
II.	Magyartarka(6)		354±11,62	434±38,07	0,30±0,14
	Holstein-fríz(7)		357±23,47	475±51,39	0,39±0,17

Table 1: Subcutaneous rump fat thickness (P8) of horned and polled Charolais bulls, and Hungarian Simmental and Holstein-Friesian bulls.

Experiment(1), Breed(2), Charolais(3), Horned(4), Polled(5), Hungarian Simmental(6), Holstein-Friesian(7), Age, days(8), Live weight, kg(9)

Ez az eredmény egybevág a külföldi adatokkal (Stoody és mtsai., 1996; Goonewardene és mtsai., 1999), amelyek szerint nincs különbség az éves kori súlyban, a vágási jellemzőkben, és a herekörméretben a szarvált és a szarvatlan egyedek között.

A nemzetközi szakirodalomban kevés adat áll rendelkezésre a fajtatípusa charolais és a keresztezett egyedek P8 értékére. A P8 mérési eredményeire vonatkozó adatokat csak ausztrál közleményben találunk mivel ennek mérése Ausztráliában már a gyakorlat részévé vált (Wolcott, 2003). Megállapították, hogy az *angus*, *hereford*, *murray grey* és *shorthorn* fajtájú tinók P8 átlagértékei 0,97-1,14 cm között változtak. Tapasztalatok szerint Ausztráliában a P8 érték megállapításának (scannelésének) feltétele az, hogy a bőr alatti faggyú mennyisége legalább 3-5 mm közötti legyen (Sundstrom, 2004). Mérési eredményeink a charolais bikák esetében közel fele olyan nagyok voltak, mint az előzőekben leírt ausztrál adatok.

Az eltérések a takarmányozási különbségekkel és azzal magyarázhatók, hogy mi bikákkal dolgoztunk. Hazai mérési adatok és tapasztalatok nincsenek, mivel az *angus* és a *hereford* fajtákban 1999-től kezdődően végzett mérések szerint – az STV zárásakor – a far bőr alatti faggyúvastagságának jellemzésére a német módszert alkalmazták (Rump fat: a mérési pont az ülőgumót és a külső csípőszögletet összekötő egyenes felénél található). A másik fontos szempont, hogy Amerikában és Ausztráliában egyaránt a szarvasmarha hizlalásba általában tinókat állítanak be, melyeket 600 kg-os élősúly eléréséig intenzíven nevelnek.

A második vizsgálatban a P8 átlagértékei a következőképpen alakultak: *holstein-fríz*: $0,30 \pm 0,14$ cm, *magyartarka*: $0,39 \pm 0,17$ cm, $P > 0,05$. A 2. ábra és az 1. táblázat is érzékelteti, hogy a két csoport átlagainak hibája, valamint szórás értéke közel azonos. Az azonos átlagéletkorú két csoportban az élősúlykülönbség (41 kg, $P < 0,05$), a magyartarka javára volt kimutatható. A súlytöbblet ellenére a faggyúsodás mértéke azonos volt a *holstein-fríz*zel, ugyanakkor a magyartarka kedvezőbb húsformákat mutatott.

2. ábra

P8 átlagértékei a holstein-fríz és a magyar tarka bikacsoportokban

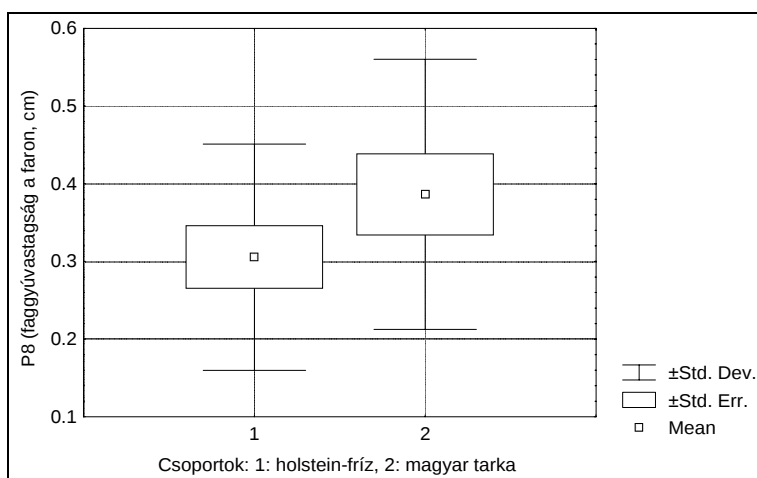


Figure 2: Averages of Holstein Friesian and Hungarian Simmental young bulls groups on P8 site

Holstein Friesian (1), Hungarian Simmental (2), P8 (fat depth of rump)(3)

Az élősúly és az életkor, valamint a P8 érték közötti összefüggéseket az alábbiakban összegezzük:

- A *szarvált charolais* bikacsoportban az életkor és az élősúly a P8 értékével $r=0,26$ -os, ill. $r=-0,01$ -es viszonyosságban volt.
- A *szarvatlan charolais* bikák esetében az életkor hasonló (nagyon laza $r=0,17$), az élősúly viszont szorosabb ($r=0,42$, $P<0,05$) összefüggésben állt a P8 értékkel, mint amelyet a szarvált csoportban tapasztaltunk.
- A *második vizsgálatban* a korrelációs együtthatók az alábbiak voltak: *holstein-fríz* bikák (életkor-P8: $r=-0,05$, élősúly-P8: $r=0,63$, $P<0,05$), *magyartarka* bikák (életkor-P8: $r=0,17$, élősúly-P8: $r=0,75$, $P<0,01$).

Megállapítható tehát, hogy vizsgálatainkban érdemi *lineáris összefüggést* csak az élősúly és a P8 érték között tudunk kimutatni, négy esetből három alkalommal.

KÖVETKEZTETÉSEK

- Vizsgálatunkban nem találtunk statisztikailag igazolható különbségeket a P8 értékekre vonatkozóan sem a szarvált és szarvatlan *charolais bikák*, sem pedig a *holstein-fríz és a magyartarka bikák* vonatkozásában.
- Vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy a *fartájéki bőr alatti faggyúvastagság (P8)* – hasonló életkorú bikák esetében – közepes, ill. szoros pozitív, összefüggésben áll az élősúllyal ($r=0,4-0,7$; $P<0,05$), bár egy esetben negatív összefüggést mértünk.
- Az UH képzésként ezen módszere – tapasztalataink szerint – jól beilleszthető a havi, két havi, vagy negyed éves mérlegelések munkafolyamatába, de a bevezetést megelőzően további vizsgálatokat tartunk szükségesnek.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatómunkát az OTKA (T-30751) és az OM - 00368/2001 támogatta.

IRODALOM

- Agabriel, J., Giraud, J.M., Petit, M. (1986). Détermination et utilisation de la note d' état d' engraissement en élevage allaitant. Bul. Tech. C.R.Z.V. Theix, INRA, 66. 43-50.
- Brito, T.D., Pringle, T.D., Williams, R.E., Bertrand, K.J. (2000). Segregating feedlot steers into compositional outcome groups using serial ultrasound measurements. J. Anim. Sci., 78. (suppl) 3.
- Claus, A. (1957). Die Messung natürlicher Grenzflächen in Schweinerkörper mit Ultraschall. Fleischwitsch, 9. 552-554.
- Devitt, C.J.B., Wilson J.W. (2000). Genetic correlations between yearling bull ultrasound measurements and finished steer carcass measurements. Ann. Meeting of ADSA-ASAS, July 24-28, Baltimore, Maryland, J. Anim. Sci., 78. (suppl) 57-58.
- Dobrowolski, A., Höreth, R., Branscheid, W. (1993). Apparative Klassifizierung von Schweinehälften. Kulmbacher Reiche, 12. 1-26.
- Field, C.M., Williams, A.R., Mckinley, W.B., Jefcoat, L.R., Smith, R.G. (2000). Use of live animal carcass ultrasound in stocker grazing in Mississippi. J. Anim. Sci., 78. (suppl) 11.

- Goonewardene, L.A., Price M.A., Liu, M.F., Berg, R.T., Erichsen, C.M. (1999). A study of growth and carcass traits in dehorned and polled composite bulls. *Can. J. Anim. Sci.*, 79. 383-385.
- Herring, W.O., Miller, D.C., Bertrand, J.K., Benyshek, L.L. (1994). Evaluation of machine, technician, and interpreter effects on ultrasonic measures of backfat and longissimus muscle area in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 72. 2216-2226.
- Klawuhn, D., Staufienbiel, R. (1997). Aussagekraft der Rückenfettdicke zum Körperfettgehalt beim Rind. *Tierärztliche-Praxis*, 2. 133-138.
- Reverter, A., Johnston, D.J., Ferguson, D.M., Perry, D., Goddard, M.E., Burrow, H.M., Oddy, V.H., Thompson, J.M., Bidon, B.M. (2003). Genetic and phenotypic characterisation of animal, carcass, and meat quality traits from temperate and tropically adapted beef breeds. 4. Correlations among animal, carcass, and meat quality traits. *Australian J. of Agricultural Research*, 2. 149-158.
- Richard, M.W., Spitzer, J.C., Warner, M.B. (1986). Effect of varying level of postpartum nutrition and body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 62. 300-306.
- Robinson, D.L., McDonald, C.A., Hammond, K., Turner, J.W. (1992). Live animal measurement of carcass traits by ultrasound: assessment and accuracy of sonographers. *J. Anim. Sci.*, 70. 1667-1676.
- Song, Y.H., Kim, S.J., Lee, S.K. (2002). Evaluation of ultrasound for prediction of carcass meat yield and meat quality in Korean-native cattle (Honwoo). *Asian-Australasian J. of Anim. Sci.*, 4. 591-595.
- Stokey, J.M., Goonewardene, L.A. (1996). Comparison of production traits and welfare implications between horned and polled beef bulls. *Can. J. Anim. Sci.* 76. 1-5.
- Sundstrom, B. (2004). Carcass EBV (Version 4.2). National Beef Recording Scheme BREEDPLAN, 04/2. 1-5.
- Temple, R.S., Staker, H.H., Howry, D., Posakony, G., Hazaleus, H.H. (1956). Ultrasonic and conductivity methods for estimating fat thickness in live cattle. *Am. Soc. Anim. Prod. West Section. Proc.*, 7. 477.
- Tőzsér J., Agabriel, J., Domokos Z. (1995). Húshasznosítású tehének kondíciópontozásának módszere Franciaországban. *A Hús*, 4. 223-225.
- Tőzsér J., Domokos Z., Alföldi L. (2001). A francia és az amerikai húsmarha kondícióbírálati rendszer összehasonlítása. *Acta Agronomica*, 4. 39-47.
- Tőzsér J., Holló G., Holló I., Seregi J., Repa I. (2004/a). A szarvasmarha hosszú hátizom területének mérése real-time ultrahangkészülékkel. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 6. 539-553.
- Tőzsér J., Domokos Z., Bujdosó M., Szentléleki A., Bakus G., Zándoki R., Minorics R. (2004/b). Hosszú hátizom területének mérése real-time ultrahangkészülékkel a charolais fajtában. *Acta Agraria Kaposváriensis*, 8. 2. 11-21.
- Walter, B.H. (2002). Cattleman's Ultrasound Glossary. *Charolais Journal*, January, 18-19.
- Wilson, D.E., Rouse, G.H., Haya, C.L., Hassen, A. (2000). Carcass expected progeny differences using real-time ultrasound measures from developing Angus heifers. *Ann. Meeting of ADSA-ASAS*, July 24-28, Baltimore, Maryland, *J. Anim. Sci.*, 78. (suppl) 58.
- Wolcott, M.L. (2003). The prediction of percent retail beef yield from live animal ultrasound measurements. Thesis of Master of Rural Sciences, The University of New England, Armidale, Australia, 126.

Levelezési cím (*corresponding author*):

Tózsér János

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar

2103 Gödöllő, Páter Károly u. 1.

Szent István University, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences

H-2103 Gödöllő, Páter Károly u. 1.

Tel.: 28-410-200/1644, fax: 28-410-804

e-mail: Tozser.Janos@mkk.szie.hu



A BLUP alapú tenyésztértékek és tenyészethatások kapcsolatának vizsgálata hazai sertésfajtákban

Vígh Zs., Nagy I., Farkas J., Csató L.

Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Kaposvár, 7400 Guba Sándor u. 40.

ÖSSZEFOGLALÁS

A hazai sertésfajták hízekonysági és vágóérték vizsgálata (HVT) keretében 1993-1999 között gyűjtött adatokat értékeltük. A vizsgált tulajdonságok: a hizlalási napok száma, a fogyasztott takarmány és az értékes húsrészek mennyisége. Az egyedeknek az egyes tenyészetek közötti véletlenszerű eloszlását elemeztük. A vizsgált tulajdonságokra vonatkozó eredmények pozitív összefüggést mutattak a származási tenyészettel. A legjobb egyedek onnan kerültek ki, ahol a vizsgálat megkezdése előtt kedvező környezeti körülményeket biztosítottak számukra. Ezt a hatást a BLUP jelentősen mérsékelte, a tenyésztértékek a tenyészethatástól többnyire függetlenek voltak. Az eredmények alapján a BLUP módszerrel becsült tenyésztértékek kevésbé torzítottak, mint a fenotípusosak. (Kulcsszavak: fenotípus, tenyésztérték, környezeti hatás, kölcsönhatás)

ABSTRACT

Analysis of the connection between the Best Linear Unbiased Prediction (BLUP) based breeding values and estimated herd effects in Hungarian pig breeds

Zs. Vígh, L. Csató, J. Farkas, K. Tisza, I. Nagy

University of Kaposvár, Faculty of Animal Science, H-7400 Kaposvár, Guba Sándor str. 40.

The analysis was conducted using station test data of several Hungarian pig breeds that was collected between 1993-1999. Duration of the test, total amount of consumed feed and valuable cuts were taken into account in the analysis. Based on these traits the random distribution of the animals across the herds of origin was tested. The phenotypic measurements of all traits were positively associated with the herds of origin. Animals with favourable measurements originated from herds that provided good environmental circumstances prior to the station test. This environmental effect was substantially reduced by BLUP, as the predicted breeding values were mainly independent from the predicted herd effects. Based on the results it could be concluded that the BLUP based breeding values were much less biased than the phenotypic measurements.

(Keywords: phenotype, breeding value, environmental factor, and interaction)

BEVEZETÉS

Bármely tenyésztési program megvalósításakor a tenyészcélban szereplő tulajdonságok javítása a mérési adatok alapján meghozott szelekciós döntésekre épül. A szelekciós kritérium tulajdonságok mérése különböző teljesítményvizsgálatok keretében történik. A szelekciós döntésnek azonban a fenotípusos (mért) érték nem lehet az alapja, mert az nem azonos a genotípussal. Közismert, hogy a fenotípusos érték genetikai és környezeti

hatásra osztható fel. A genetikai hatás tovább bontható tenyésztékre (additív genetikai érték), dominancia-eltérésre és episztatikus hatásra. Jelenlegi ismereteink szerint a szelekciós döntéseket a BLUP módszer által becsült tenyésztékek alapján érdemes meghozni, mely leginkább megközelíti az egyedek valódi tenyésztékét.

Bár a BLUP módszer elméleti kidolgozása 30 éve történt (Henderson, 1975), csak az 1980-as évek végétől kezdődően fejlesztettek ki olyan szoftvereket, melyekkel a gyakorlati tenyésztékbecslés lehetővé vált.

Sajnálatos módon annak ellenére, hogy a legtöbb európai ország sertésenyésztési gyakorlata ezt a módszert alkalmazza (Komlósi, 1999), a hazai sertésenyésztés a BLUP módszert csak mint egy nem hivatalos informatív eszközt használja a szelekciós döntések segítése céljából (Csató, 1999). A szelekciós döntések a HVT index alapján születnek (OMMI, 2004), mely eljárás a több mint 60 évvel ezelőtt kifejlesztett un. Hazel féle index egyik változatának tekinthető (Hazel, 1943).

A BLUP módszer bevezetését legjobban az azzal szemben fennálló tenyésztői ellenállás akadályozza. A tenyésztők véleménye szerint ugyanis az eljárás a környezeti hatásokat túlzott mértékben korrigálja, különösen a tenészethatás esetében (ahonnan a vizsgálati egyedek származnak). Ezek szerint a HVT előtt a vizsgálati egyedek részére jó körülmények biztosítása hátrányos lenne, mert a BLUP módszer ilyen esetben a tenyésztékeket alábecsülné. Véleményük szerint az ellenkező szituáció is lehetséges, vagyis a HVT előtti gyenge környezeti körülményeket a BLUP eljárás túlkompenzálja és érdemtelenül magas tenyésztékeket becsül.

A fenti gondolatmenettől független módon a BLUP eljárás valóban becsülhet torzított eredményeket, ha az egyedek tenyészetek közötti eloszlása - tenyésztékük alapján - nem véletlenszerű (Frey és mtsai., 1997). Ez a helyzet többféleképpen is megvalósulhat. Az egyik változat szerint a nagy tenyésztékekkel rendelkező egyedek valamennyien azokban a tenyészetekben helyezkednek el, ahol a HVT előtt számukra a legjobb környezeti feltételeket biztosították. A másik lehetőség az, hogy a legjobb tenyésztékű egyedek a HVT előtt a legrosszabb feltételeket biztosító tenyészetekből származnak.

A tenyésztékbecslési folyamat ezzel szemben akkor ideális, ha az egyedek eloszlása tenyésztékük alapján a tenyészetek között véletlenszerű, tehát a legjobb és legrosszabb tenyésztékű egyedek az úgynevezett jó és rossz körülményeket biztosító tenyészetekben egyaránt megtalálhatók.

A vizsgálat célkitűzése - korábbi kutatásaink folytatásaként - az ivadékvizsgálatban szereplő egyedek tenyészetek közötti véletlenszerű eloszlásának (a becsült tenyészték alapján) elemzése volt. Ez alapján lehetséges annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy a tenyésztői aggodalom a BLUP eljárással szemben megalapozott-e?

ANYAG ÉS MÓDSZER

Az elemzésben az 5, 10, 12, 28, 29, 31, 34, 53, 56, 57, 59 fajtakóddal¹ rendelkező populációk vettek részt. Az elemzéshez használt adatokat az 1993-1999 közötti HVT adatbázis szolgáltatta. A vizsgált tulajdonságok a hizlalási napok száma, a fogyasztott takarmány mennyisége és az értékes húsrészek mennyisége voltak.

A statisztikai analízis négy egymást követő lépésben valósult meg. Az első lépésben történt a vizsgálatba vont tulajdonságokat szignifikáns mértékben befolyásoló tényezők meghatározása, melyhez a SAS szoftver GLM eljárását használtuk (Cody és Smith, 1997). A következő lépésekben használt modellben csak a szignifikánsnak bizonyuló hatások szerepeltek. A vizsgált tulajdonságok egyes statisztikai jellemzőit az 1., 2., 3. táblázatban adtuk meg.

¹A fajtakódokkal jelzett fajták tételes felsorolását az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat

A hizlalási napok számára vonatkozó statisztikai jellemzők

Tulajdonság(1)	Fajtakód(3)	Vizsgálat(15)	Egyedszám(17)	Átlag(18)	σ
Hizlalási napok száma (2)	5 (4)	Központi (16)	260	91,46	13,88
	10 (5)		836	86,97	12,40
	12 (6)		627	96,78	12,98
	28 (7)		1229	87,02	12,90
	29 (8)		324	92,27	13,68
	31 (9)		988	93,40	13,79
	34 (10)		1779	89,13	13,93
	53 (11)		786	79,32	13,43
	56 (12)		326	90,80	14,20
	57 (13)		237	88,87	12,40
	59 (14)		140	92,41	12,80

Belga Lapály(4), Duroc(5), Pietrain(6), Duroc×Belga Lapály(7), Belga Lapály×Hampshire(8), Pietrain×Hampshire(9), Pietrain×Duroc(10), Kahyb A-vonal(11), Kahyb C-vonal(12), Kahyb D-vonal(13), Kahyb E-vonal(14),

Table 1: Basic statistic measures for the duration of station test

Trait(1), Duration of test(2), Genotype(3), Belgian Landrace(4), Duroc(5), Pietrain(6), Duroc×Belgian Landrace(7), Belgian Landrace×Hampshire(8), Pietrain×Hampshire(9), Pietrain×Duroc(10), Kahyb A-line(11), Kahyb C-line(12), Kahyb D-line(13), Kahyb E-line(14), Type of test(15), Station test(16), Number of records(17), Mean(18)

2. táblázat

A fogyasztott takarmány mennyiségére vonatkozó statisztikai mérőszámok

Tulajdonság(1)	Fajtakód(3)	Vizsgálat(15)	Egyedszám(17)	Átlag(18)	σ
Vizsgálat alatt fogyasztott takarmány mennyisége(2) (kg)	5 (4)	Központi (16)	260	205,39	17,65
	10 (5)		836	211,40	24,21
	12 (6)		627	211,62	23,86
	28 (7)		1229	208,54	23,07
	29 (8)		324	208,05	20,38
	31 (9)		988	208,42	23,85
	34 (10)		1779	209,27	24,40
	53 (11)		786	204,33	21,29
	56 (12)		326	204,02	22,44
	57 (13)		237	209,73	21,92
	59 (14)		140	211,00	19,96

Table 2: Basic statistic measures for the consumed feed

Trait(1), Consumed feed(2), (3)-(14) See Table 1, Type of test(15), Station test(16), Number of records(17), Mean(18)

3. táblázat

Az értékes húsrészek mennyiségére vonatkozó statisztikai mérőszámok

Tulajdonság(1)	Fajtakód (3)	Vizsgálat(15)	Egyedszám(17)	Átlag(18)	σ
Értékes húsrészek mennyisége (2) (kg)	5 (4)	Központi (16)	260	43,70	2,92
	10 (5)		836	38,63	2,34
	12 (6)		627	45,09	2,71
	28 (7)		1229	40,00	3,24
	29 (8)		324	42,88	3,27
	31 (9)		988	43,80	3,22
	34 (10)		1779	41,32	3,83
	53 (11)		786	40,31	2,74
	56 (12)		326	41,52	3,59
	57 (13)		237	40,91	3,55
	59 (14)		140	39,70	2,78

Table 3: Basic statistic measures for the valuable cuts

Trait(1), Valuable cuts(2), (3)-(14) See Table 1, Type of test(15), Station test(16), Number of records(17), Mean(18)

A második lépésben a vizsgált tulajdonságok variancia-kovariancia komponenseinek becslése történt a REML módszer felhasználásával, melyhez a PEST és VCE szoftvereket használtuk fel (Groeneveld, 1990; Groeneveld, 1998).

A vizsgált tulajdonságok esetében az alkalmazott lineáris modell az alábbi:

$$y = Xb + Za + Wc + e$$

Ahol Mrode (1996) alapján:

y=megfigyelések vektora, b=környezeti tényezők vektora, a=additív genetikai hatás vektora, c=alomhatás vektora, e=reziduális hatás vektora, X, Z, W, sorrendben a környezeti tényezők, additív genetikai hatások és az alom (közös környezeti hatás) előfordulási mátrixa.

A tenyészet, ivar, év-hónap környezeti tényezők valamennyi vizsgált tulajdonságot szignifikáns módon befolyásolták. A testtömeg hatása a HVT esetében kovariáló tényezőként került be a felhasznált modellbe. A modellben y normál eloszlású változóként szerepelt, továbbá a vizsgált tulajdonságra nézve végtelen számú - egymással nem kapcsolt - gén hatását feltételeztük, melyek az adott tulajdonságot additív módon határozták meg.

A harmadik lépésben, az előzőekben meghatározott variancia-kovariancia komponensek felhasználásával került sor a tenyésztékek becslésére a PEST szoftver (Groeneveld, 1990) felhasználásával. A tenyésztékek meghatározásával egyidőben a BLUP eljárás a környezeti tényezők hatását is becsli (BLUE), ahol a becsült tenyészet hatás szolgálta a tenyészetek kedvező vagy kedvezőtlen voltának meghatározására.

Végezetül a SAS szoftver segítségével megállapítottuk a HVT-ben szereplő egyedek tenyésztékei, illetve a kapcsolódó tenyészet hatások közötti korrelációs koefficienseket (Cody és Smith, 1997). Amennyiben a becsült korrelációs koefficiensek a nullától nem térnek el szignifikánsan, úgy az egyedek tenyészetek közötti eloszlása véletlenszerűnek tekinthető. Ezen kívül a tenyésztékeket lineárisan illesztettük a származást jelentő tenyészet hatásokra abból a célból, hogy ez utóbbinak az előbbire gyakorolt lehetséges hatását megállapíthassuk.

EREDMÉNY ÉS ÉRTÉKELÉS

Vizsgálatunkban az első elemzett tulajdonság a hizlalási napok száma volt. A fenotípusos értékekkel kapcsolatos eredményeket tekintve megállapítható, hogy mérsékelten szoros pozitív összefüggés tapasztalható a vizsgálati napok száma és a származási tenyészetek között (4. táblázat). A pozitív korreláció azt jelzi, hogy a vizsgálati napok száma és a származási tenyészetek egyszerre növekednek, illetve csökkennek. Ennek megfelelően a vizsgálati napok számát a származási tenyészetek egyértelműen befolyásolta. A lineáris regressziós egyenletek értéke egy eset kivételével (59-es fajtakód) szignifikánsan eltért nullától (4. táblázat). A tapasztalt jelenség igen kedvezőtlen, hiszen a kapott eredmények alapján a HVT - amely a szelekciós döntések alapjául szolgál - egyértelműen torzított. Azaz előnyt élveztek azok az egyedek, melyeknek a vizsgálat előtt jobb körülményeket biztosítottak, mint társaiknak. Ezt a fenotípust befolyásoló hatást a BLUP módszer korrigálta. A kapott korrelációs, illetve regressziós egyenletek értéke a vizsgált populációk többségénél gyakorlatilag nulla volt (5. táblázat), tehát a becsült tenyészértékek - a hizlalási napok számára vonatkozóan - ezeknél a populációknál függetlenek voltak a tenyészetektől.

4. táblázat

A hizlalási napok száma és a becsült tenyészetek közötti korrelációs egyenletek (r), illetve a hizlalási napok számának a becsült tenyészetekre vonatkozóan történő illesztésével kapott lineáris regressziós egyenletek (b)

Tulajdonság (1)	Fajtakód (3)	r (15)	b (16)
Hizlalási napok száma (2)	5 (4)	0,32**	1,52**
	10 (5)	0,13**	0,84**
	12 (6)	0,19**	0,64**
	28 (7)	0,08**	0,29**
	29 (8)	0,30**	0,41**
	31 (9)	0,21**	0,85**
	34 (10)	0,23**	0,86**
	53 (11)	0,20**	0,51**
	56 (12)	0,34**	0,84**
	57 (13)	0,09**	0,25**
	59 (14)	0,01 ^{NS}	0,07 ^{NS}

** P<0,01; ^{NS} nem szignifikáns (nonsignificant)

Table 4: Estimated correlation coefficients between the duration of test measurements and herd effects and linear regression coefficients of the duration of test measurements on the herd effects of the analysed pig populations

Trait(1), Duration of test(2), (3)-(14) See Table 1, Correlation coefficient(15), Linear regression coefficient(16)

Külön meg kell említeni a 10-es, 28-as és a 29-es fajtakóddal rendelkező csoportokat. Ezeknél a populációknál ugyanis a BLUP által végzett korrekció nem volt teljes mértékű. A 10-es és a 28-as fajtakódok esetében a kapott korrelációs egyenletek nagysága a tenyészérték és a tenyészetek között elhanyagolható. Következésképpen a

tapasztalt enyhe negatív regressziós együtthatónak nincs túl nagy jelentősége, hiszen az egyenesre történő illeszkedés eltérésének mértéke csekély. Az 29-es fajtakód esetében pedig a kapott regressziós együttható nagysága volt jelentéktelen.

5. táblázat

A hizlalási napok számára becsült tenyészték értékek és a becsült tenyészet hatások közötti korrelációs koefficiens (r), illetve a hizlalási napok számára becsült tenyészték értékek a becsült tenyészet hatásokra történő illesztésével kapott lineáris regressziós koefficiens (b)

Tulajdonság (1)	Fajtakód (3)	r (15)	b (16)
Hizlalási napok száma (2)	5 (4)	0,05 ^{NS}	0,03 ^{NS}
	10 (5)	-0,11**	-0,23**
	12 (6)	0,007 ^{NS}	0,01 ^{NS}
	28 (7)	-0,09**	-0,09**
	29 (8)	0,18**	0,11**
	31 (9)	-0,04 ^{NS}	-0,06 ^{NS}
	34 (10)	-0,007 ^{NS}	-0,01 ^{NS}
	53 (11)	0,007 ^{NS}	0,003 ^{NS}
	56 (12)	0,11 ^{NS}	0,09 ^{NS}
	57 (13)	-0,12 ^{NS} S	-0,10 ^{NS}
	59 (14)	0,06 ^{NS}	0,03 ^{NS}

** P<0,01; ^{NS} nem szignifikáns (nonsignificant)

Table 5: Estimated correlation coefficients between the duration of test breeding values and herd effects and linear regression coefficients of the duration of test breeding values on the herd effects of the analysed pig populations

Trait(1), Duration of test(2), (3)-(14) See Table 1, Correlation coefficient(15), Linear regression coefficient(16)

A HVT során a 105 kg-os vágótömeg eléréséig fogyasztott takarmány mennyiségét tekintve megállapítható, hogy a vizsgálatot megelőző időszakban jó körülmények között tartott egyedek általában kevesebb takarmányt fogyasztottak, mint kedvezőtlen körülmények között tartott társaik (6. táblázat). Ezzel szemben a becsült tenyészték értékek a tenyészet hatásokkal az esetek többségében nem mutattak semmilyen összefüggést (7. táblázat). A 29-es fajtakód esetében a tenyészték és tenyészet hatás között tapasztalt laza pozitív korreláció jelentősége csekély, hiszen a regressziós koefficiens nullához közelít, vagyis a tenyészet hatás tenyésztékre gyakorolt hatása gyakorlatilag nulla. A 28-as és 57-es fajtakódnál enyhe túlkompensációt tapasztaltunk.

A hizlalási napok száma, a 105 kg-os vágótömeg eléréséig elfogyasztott takarmány mennyisége és az értékes húsrészek mennyisége tulajdonságok esetében a mért értékek, tenyészték értékek és a származási tenyészet hatások közötti korrelációs és regressziós együtthatók nagy hasonlóságot mutattak korábbi vizsgálataink során kapott eredményekkel (Nagy és mtsai., 2002). Korábbi elemzésünket magyar nagy fehér hússertés, illetve magyar lapálysertés fajtákon végeztük nagy vizsgálati elemszámok alapján. Jelen vizsgálat során kapott eredményeink tendenciáit ezért nem tekinthetjük az esetenként kis elemszám hatásának, hiszen nagy adatbázisok alapján is hasonló tendenciákat tapasztaltunk.

6. táblázat

A fogyasztott takarmány mennyisége és a becsült tenyészet hatások közötti korrelációs koefficiens (r), illetve a fogyasztott takarmány mennyiségének a becsült tenyészet hatásokra történő illesztésével kapott lineáris regressziós koefficiens (b)

Tulajdonság (1)	Fajtakód (3)	r (15)	b (16)
Fogyasztott takarmány mennyisége (2) (kg)	5 (4)	0,15*	0,42*
	10 (5)	0,08*	0,44*
	12 (6)	0,25**	1,03**
	28 (7)	0,16**	0,55**
	29 (8)	0,35**	0,28**
	31 (9)	0,29**	0,97**
	34 (10)	0,14**	0,42**
	53 (11)	0,27**	0,68**
	56 (12)	0,20**	0,37**
	57 (13)	0,25**	0,83**
	59 (14)	0,33**	0,92**

** P<0,01; * P<0,05

Table 6: Estimated correlation coefficients between the consumed feed measurements and herd effects and linear regression coefficients of the consumed feed measurements on the herd effects of the analysed pig populations

Trait(1), Consumed feed(2), (3)-(14) See Table 1, Correlation coefficient(15) Linear regression coefficient(16)

7. táblázat

A fogyasztott takarmány mennyiségére becsült tenyészértékek és a becsült tenyészet hatások közötti korrelációs koefficiens (r), illetve a fogyasztott takarmány mennyiségére becsült tenyészértékek a becsült tenyészet hatásokra történő illesztésével kapott lineáris regressziós koefficiens (b)

Tulajdonság (1)	Fajtakód (3)	r (15)	b (16)
Fogyasztott takarmány mennyisége (2) (kg)	5 (4)	0,07 ^{NS}	0,07 ^{NS}
	10 (5)	-0,09 ^{NS}	-0,22 ^{NS}
	12 (6)	-0,001 ^{NS}	-0,001 ^{NS}
	28 (7)	-0,11**	-0,19**
	29 (8)	0,20**	0,06**
	31 (9)	-0,01 ^{NS}	-0,02 ^{NS}
	34 (10)	-0,02 ^{NS}	-0,03 ^{NS}
	53 (11)	0,06 ^{NS}	0,03 ^{NS}
	56 (12)	0,02 ^{NS}	0,01 ^{NS}
	57 (13)	-0,22**	-0,36**
	59 (14)	-0,001 ^{NS}	0,00 ^{NS}

** P<0,01; ^{NS} nem szignifikáns (nonsignificant)

Table 7: Estimated correlation coefficients between the consumed feed breeding values and herd effects and linear regression coefficients of the consumed feed breeding values on the herd effects of the analysed pig populations

Trait(1), Consumed feed(2), (3)-(14) See Table 1, Correlation coefficient(15), Linear regression coefficient(16)

8. táblázat

Az értékes húsrészek mennyisége és a becsült tenyészet hatás közötti korrelációs koefficiens (r), illetve az értékes húsrészek mennyiségének a becsült tenyészet hatásokra történő illesztésével kapott lineáris regressziós koefficiens (b)

Tulajdonság (1)	Fajtakód (3)	r (15)	b (16)
Értékes húsrészek mennyisége (2)	5 (4)	0,30**	1,52**
	10 (5)	0,37**	1,27**
	12 (6)	0,09*	0,28*
	28 (7)	0,32**	1,51**
	29 (8)	0,30**	0,91**
	31 (9)	0,06*	0,34*
	34 (10)	0,09**	0,55**
	53 (11)	0,26**	0,65**
	56 (12)	0,40**	0,73**
	57 (13)	0,32**	3,15**
	59 (14)	0,53**	1,01**

** P<0,01; * P<0,05; ^{NS} nem szignifikáns (nonsignificant)

Table 8: Estimated correlation coefficients between the valuable cuts measurements and herd effects and linear regression coefficients of the valuable cuts measurements on the herd effects of the analysed pig populations

Trait(1), Valuable cuts(2), (3)-(14) See Table 1, Correlation coefficient(15), Linear regression coefficient(16)

9. táblázat

Az értékes húsrészek mennyiségére becsült tenyészték és a becsült tenyészet hatás közötti korrelációs koefficiens (r), illetve az értékes húsrészek mennyiségére becsült tenyészték a becsült tenyészet hatásokra történő illesztésével kapott lineáris regressziós koefficiens (b)

Tulajdonság (1)	Fajtakód (3)	r (15)	b (16)
Értékes húsrészek mennyisége (2)	5 (4)	0,06 ^{NS}	0,22 ^{NS}
	10 (5)	0,004 ^{NS}	0,006 ^{NS}
	12 (6)	-0,04 ^{NS}	-0,09 ^{NS}
	28 (7)	0,05*	0,12*
	29 (8)	0,15**	0,23**
	31 (9)	-0,02 ^{NS}	-0,04 ^{NS}
	34 (10)	-0,02 ^{NS}	-0,04 ^{NS}
	53 (11)	-0,13 ^{NS}	-0,15 ^{NS}
	56 (12)	0,15 ^{NS}	0,05 ^{NS}
	57 (13)	0,19**	1,05**
	59 (14)	0,03 ^{NS}	0,02 ^{NS}

** P<0,01; * P<0,05; ^{NS} nem szignifikáns (nonsignificant)

Table 9: Estimated correlation coefficients between the valuable cuts breeding values and herd effects and linear regression coefficients of the valuable cuts breeding values on the herd effects of the analysed pig populations

Trait(1), Valuable cuts(2), (3)-(14) See Table 1, Correlation coefficient(15), Linear regression coefficient(16)

Ugarte és mtsai. (1992) az általunk elemzett problémát más oldalról közelítették meg. Számítógépes szimuláció segítségével olyan adatbázisokat hoztak létre, melyeknél az egyedek eloszlása (a tenyésztértékek alapján) véletlenszerű, illetve nem véletlenszerű volt. A nem véletlenszerű eloszlás pozitív korrelációt eredményezett a tenyésztértékek és tenyészethatások között. Ezzel szemben véletlen eloszlás esetén az egyedek becsült tenyésztértékei és a tenyészethatások között a korrelációs koefficienseknek gyakorlatilag nullának kell lennie. Elméleti megfontolások alapján Visscher és Goddard (1993) megállapították, hogy ha a vizsgált egyedek eloszlása – tenyésztértékeiket figyelembe véve – véletlenszerű a tenyészetek között, akkor a kapott eredmény torzítatlan, függetlenül attól, hogy a tenyészethatás az alkalmazott modellben fix vagy random hatásként szerepel. Ugarte és mtsai. (1992), valamint Visscher és Goddard (1993) megállapításai a jelen vizsgálat szemszögéből döntőnek tekinthetők. A nulla korrelációs koefficiens a tenyésztértékek és tenyészethatások között ugyanis véletlenszerű egyedeloszlást jelent (Ugarte és mtsai., 1992), ami torzítatlan tenyésztértékebecslést tesz lehetővé (Visscher és Goddard, 1993), s ez korrekt szelekciós döntések alapjául szolgálhat.

Hangsúlyozni kell azonban, hogy nem véletlenszerű eloszlás esetén az eloszlás által létrehozott torzítás eltávolítható azáltal, hogy a tenyészethatást, mint fix hatást szerepeltettem a modellben. Az algebrai bizonyítást Frey és mtsai. (1997), valamint Van Vleck (1987) adják meg. Visscher és Goddard (1993) azonban megjegyezték, hogy abban az esetben, ha egyes egyedek csak az úgynevezett jó tenyészetekben hoznak létre utódokat, a tenyésztértékebecslés torzított eredményt ad, amennyiben a tenyészethatás értelmezése random (a fix hatás torzítatlan becslést eredményez). Ezzel szemben, ha a legjobb tenyésztértékű egyedeket úgy párosították, hogy azok utódai csak az úgynevezett legjobb tenyészetekben termelnek, akkor a tenyésztértékebecslés mindenképpen torzított eredményt ad. Ez utóbbi megállapítás, illetve annak eredményéből fakadó következmény azonban esetünkben nem érvényes.

KÖVETKEZTETÉSEK

Összefoglalásképpen megállapítható, hogy a magyarországi sertésenyésztésben jelenleg használt HVT index közvetlenül mért, fenotípusos értékmérőkre épülő indexnek tekinthető. Ezért a HVT megkezdése előtti kedvező vagy kedvezőtlen üzemi körülmények közvetlenül befolyásolják az egyedek HVT indexpontszámát. A BLUP eljárás ezt, a környezet eltérései által okozott torzítottságot korrigálni tudja. Ezt bizonyítja, hogy a BLUP módszerrel becsült tenyésztértékek alapján az egyedek tenyészetek közötti véletlenszerű eloszlása volt tapasztalható.

Az általunk alkalmazott modellek esetében a tenyészethatások fix hatásként szerepeltek. Így abban az esetben, ha a vizsgálati egyedek nem véletlenszerű eloszlása lett volna tapasztalható (vizsgálatunk nem ezt igazolta), a becsült tenyésztértékek torzítatlanok maradtak volna. Kivéve természetesen, ha a legjobb tenyésztértékű egyedeket úgy párosították volna, hogy azok ivadécai csak az úgynevezett „legjobb tenyészetekben” helyezkedjenek el.

IRODALOM

- Cameron, N.D. (1997). Selection Indices and Prediction of Genetic Merit in Animal Breeding. CAB International, Wallingford, Oxon, UK., 203.
Cody, R.P., Smith, J.K. (1997). Applied Statistics and the SAS Programming Language. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, US., 445.

- Csató, L. (1999). A BLUP módszer és a genetikai paraméterbecslés a hazai sertésenyésztésben. *A Sertés*, 1. 10-21.
- Frey, M., Hofer, A., Kunzi, N. (1997). Comparison of models with a fixed or a random contemporary group effect for the genetic evaluation for litter size in pigs. *Livest. Prod. Sci.*, 48. 135-141.
- Groeneveld, E. (1990). PEST Users' Manual. Institute of Animal Husbandry and Animal Behaviour Federal Research Centre, Neustadt, 1-80.
- Groeneveld, E. (1998). VCE4 Users' Guide. Institute of Animal Husbandry and Animal Behaviour Federal Research Centre, Neustadt, 1-61.
- Hazel, L.N. (1943). The genetic basis of constructing selection indexes. *Genetics*, 28. 476-490.
- Henderson, C.R. (1975). Best Linear Unbiased Estimation and Prediction under a selection model. *Biometrics*, 31. 423-447.
- Komlósi, I. (1999). A tenyésztékbecslés európai gyakorlata. *A Sertés*, 1. 4-9.
- Mrode, R.A. (1996). Linear models for the Prediction of Animal Breeding Values. CAB International, Wallingford, Oxon, UK., 187.
- Nagy, I., Csató, L., Farkas, J., Radnóczy, L., Szabó, A., Vígh, Zs. (2002). Analysis of the random distribution of station tested pigs based on their genetic merit. *Acta Vet. Hung.*, 50. 373-383.
- OMMI (Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézet) (2004). Sertés Teljesítményvizsgálati Kódex 5. Budapest, 101.
- Ugarte, E., Alenda, R., Carabano, M.J. (1992). Fixed or Random Contemporary Groups in Genetic Evaluations. *J. Dairy Sci.*, 75. 269-278.
- Van Vleck, L.D. (1987). Contemporary Groups for Genetic Evaluations. *J. Dairy Sci.*, 70. 2456-2464.
- Visscher, P.M., Goddard, M.E. (1993). Fixed and Random Contemporary Groups. *J. Dairy Sci.*, 76. 1444-1454.

Levelezési cím (*corresponding author*):

Vígh Zsófia

Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar
7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40.

*University of Kaposvár, Faculty of Animal Science
H-7400 Kaposvár, Guba Sándor str. 40.*

Tel.: +36-82-314-155/400, fax: +36-82-320-167

e-mail: vzsofia@freemail.hu



Vaddisznó-állományok tüdőféreg-fertőzöttségének és kondíciójának vizsgálata a Zselicségben

¹Varga Gy., ²Sugár L.

¹SEFAG Rt., Kaposvár, 7400 Bajcsy-Zs. u. 21.

²Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Kaposvár, 7400 Guba Sándor u. 40.

ÖSSZEFOGLALÁS

A vaddisznó (*Sus scrofa ferus*) tüdőféreg (*Metastrongylus* spp.) fertőzöttségét és kondícióját vizsgáltuk két vaddisznós kertben és a környező szabad területen a Zselicségben a 2003/04-es és a 2004/05-ös vadászati idényben. Az elejtett egyedeket novembertől januárig a zsigerelés helyén vizsgáltuk. A tüdőkből kigyűjtött férgeket sztereómikroszkóppal, laboratóriumban számoltuk meg. A zsigerelőhelyeken gyűjtöttük a veséket és a vese körüli zsírt is, majd ezeket digitális kijelzésű mérlegen mértük 1 g-os pontossággal. A statisztikai számítások elvégzéséhez *Quantitative parasitology* 2.0 programcsomagot használtunk. A vadászatok során elejtett vaddisznókban a sásostói kertben (n=66) 81,8%-os prevalenciát mértünk 42,3 átlagos és 22,5 medián intenzitással, valamint 34,7 átlagos abundanciával. A tótfalusi kertben (n=63) 54,0%-os prevalenciát kaptunk a vizsgálatok során 25,2 átlagos, 15,0 medián intenzitással és 13,6 átlagos abundanciával. Ezen értékek a szabad területen elejtett vaddisznók (n=47) esetében 63,8%-os prevalenciát, 41,2 átlagos, 19,5 medián intenzitás, valamint 26,3 átlagos abundancia értékeket mutattak. Szignifikáns ($P<0,05$) különbséget csak a prevalencia és az átlagos abundancia tekintetében találtunk a szabad terület és a sásostói kert, valamint a két kert állományának értékei között. A vizsgált vaddisznók kora és ivara között nem találtunk szignifikáns eltérést a különböző korcsoportokban a prevalenciában, az intenzitás értékekben és az átlagos abundanciákban. Az állatok kondíciójának megállapítására irányuló vizsgálatok során a kifejlett egyedeket a két ivarra elkülönítetten is értékeltük. A vesezsír-index vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a legrosszabb kondícióban a malacok voltak (1,99 vesezsír-index), míg a szülők kondíciója közepesnek mondható (2,45 vesezsír-index), a kifejlett egyedek pedig jó kondícióban voltak (kanok: 3,44 vesezsír-index, kocák: 4,42 vesezsír-index). Szignifikáns ($P<0,05$) eltérés csak a kocák és a többi korcsoport vesezsír indexei között mutatkozott. Eredményeink alapján évente legfeljebb egy nyár eleji féreg ellenes gyógyszerelés szükséges a vaddisznók súlyos tüdőférgességének megelőzésére.

(Kulcsszavak: antiparazitikum, vaddisznós kert, *Metastrongylus*, prevalencia, vesezsír-index)

ABSTRACT

Lungworm occurrence and the physical condition of wild boar in middle Somogy

Gy. ¹Varga, L. ²Sugár

¹The Somogy Forestry and Wood Industry Plc., Kaposvár, H-7400 Bajcsy Zs. u. 21.

²University of Kaposvár, Faculty of Animal Science, Kaposvar, H-7400 Guba Sándor u. 40.

Lungworm (*Metastrongylus* spp.) occurrence and the physical condition of wild boar (*Sus scrofa ferus*) was examined in two boar enclosures (fenced areas) and the surrounding open area of middle Somogy county, SW-Hungary, in the 2003/04 and in the 2004/05 hunting season. During the hunting season (November - January) animals that were shot were

investigated at the carcass collecting sites. Worms were collected from the lungs (lower airways) and were counted using a stereomicroscope in the laboratory. Kidneys and kidney fats were collected at the carcass collecting sites, too, and were measured with digital scales. A quantitative parasitology 2.0 program was applied for the statistical analysis. Lungworm occurrence of boars shot in Sásostó (n=66) showed 81.8% prevalence with 42.3 mean and 22.5 median intensity and 34.7 mean abundance. Boars shot in Tótfalu (n=63) had 54.0% prevalence with 25.9 mean and 15.0 median intensity and 13,6 mean abundance. The open hunting area boars (n=47) had 63.8% prevalence with 41.2 mean and 19.5 median intensity and 26.3 mean abundance. Significant ($P<0.05$) difference was proved between the open hunting area and the Sásostó enclosure as well as between the two enclosures in the prevalence and mean abundance. According to the age groups, there were no significant differences among the three sample groups in the prevalence, mean intensity, median intensity and mean abundance. In the case of kidney fat index, (KFI) individuals animals were separated into two sexes. The piglets were in the worst conditions (KFI: 1.99), the yearlings were in middle conditions (KFI: 2.45) and the adults were in the best conditions (male: 3.44; female: 4.42). In respect of KFI, only the adult sows' value differed significantly ($P<0.05$). On the basis of the above findings, it is thought that at most one anthelmintic treatment (either with albendazole or ivermectin) during the summer is enough to avoid the outbreak of a serious lungworm disease. (Keywords: Anthelmintics, enclosure, *Metastrongylus*, prevalence, kidney fat index)

BEVEZETÉS

A vaddisznóval (*Sus scrofa ferus*) való gazdálkodás, különösen annak zárttéri tartása egyre nagyobb jelentőségű a vadgazdálkodási ágazatban. Ennek főbb okai: a vaddisznó az egyetlen idénykorlátozás nélkül elejthető, hajtásban is vadászható nagyvadfajunk, valamint országos elterjedésének köszönhetően vadászata minden vadász számára elérhető. Vadászata gyakorlatilag a szabad területi vadászattal azonos élményt nyújt vadaskerti viszonyok között is. A vaddisznó Sefag Rt. vadgazdálkodásban betöltött jelentős szerepét támasztják alá a nagyvadlelövési mutatók, az export árbevétel és a feldolgozott vadhúsmennyiség is (1. táblázat).

1. táblázat

A vaddisznó jelentősége a Sefag Rt. vadgazdálkodásában (2004)

	Nagyvadlelövés (db) (7)	Árbevétel (mFt) (8)	Értékesített vadhús (t) (9)
Gímszarvas (1)	2.174	94.572	115,7
Vaddisznó (2)	2.724	158.499	132,6
Őz (3)	741	10.179	7,9
Dám (4)	2.133	45.037	31,9
Muflon (5)	35	1.454	0,4
Vaddisznó aránya az összes mennyiségből (6)	34,9%	51,2%	46,0%

Table 1: The importance of wild boar in the game management of the Sefag Plc. (2004)

Red deer(1), Wild boar(2), Roe deer(3), Fallow deer(4), Mouflon(5), The proportion of wild boar(6), Bag size(7), Total income(8), Quantity of venison purchased

A vaddisznó kedvező szaporasága miatt az állomány szinten tartásához a tavaszi becsült állomány 120-150%-át kellene elejteni. Ez azonban csak kevés vadászterületen valósul meg, ami természetszerűleg az állomány növekedéséhez vezetett, így a vaddisznó jelentős szerephez jutott az erdei, és méginkább a mezőgazdasági vadkárok emelkedésében. A megnövekedett vadászati igény kielégítése és a vadkárok csökkentése céljából az utóbbi 2-3 évtizedben kezdtek elterjedni a nagyvadfajok – köztük elsőként és főleg a vaddisznó – zárttéri tartására szolgáló kertek.

Az Országos Vadgazdálkodási Adattár (OVA, 2004) aktuális kimutatása szerint jelenleg Magyarországon 16 megyében összesen 106 vadaskert működik. Utóbbiakból 52 a vaddisznóskert és 47 a vegyes vadaskert, amelyek közül 43-ban található vaddisznó. A magyarországi vadaskertek területe meghaladja a 63.000 ha-t (2. táblázat).

2.táblázat

Vadaskertben tartott nagyvad állomány (összesen db; 1997, 2004)

Vadfaj (1)	1997 db	2004 db
Őz (2)	593	925
Vaddisznó (3)	8392	10668
Dám (4)	5378	5662
Muflon (5)	1158	1336
Gímszarvas (6)	3359	3732
Szikaszarvas (7)	65	59

Forrás (source): Országos Vadgazdálkodási Adattár (National Game Management Database), Gödöllő

Table 2: The number of big game in fenced area in Hungary (total, 1997, 2004)

Big game species(1), Roe deer(2), Wild boar(3), Fallow deer(4), Mouflon (5), Red deer(6), Sika deer(7)

A vaddisznóskertek a felsorolt előnyök mellett azonban bizonyos problémákat is rejtenek magukban. Ezek főleg a megfelelő technológia be nem tartásából, a túl magas egyedsűrűségből és a helytelen takarmányozásból adódnak. Ennek következményeként az állatok élőhelyüket felélik, a stresszhelyzet állandósulása miatt pedig általános ellenállóképességük csökken. Az állomány egészségi állapotának romlása miatt kicsi a szaporulat – úgy létszámát mint testnagyságát tekintve – és helyenként az elhullás is jelentős mértékű lehet. Ez anyagi kárként jelentkezik. Azonban a célratoró, gazdaságilag eredményes vadgazdálkodás egyik alapvető feltétele az egészséges, minden szempontból stabil állomány. Ezért fontos tehát állományunk egészségi állapotának az ismerete. A természetes rendszerek normális működésének, ezekben az egyedi szervezet egészségének is fontos feltétele a folytonos anyag- és energiaforgalom. Ezen forgalomnak az állapotát, a felhalmozott tartalékok mennyiségét jelzi az állat tápláltsági állapota, kondíciója. Sugár (2000) szerint a kondíció mértékének megállapítására több lehetőség kínálkozik. Minden olyan módszer alkalmas a kondíció mérésére, amely a szervezet zsírtartalékait veszi számba. A módszerek közül a vese körüli zsírszövet mérése tűnik a legjobbnak, mert ez könnyen hozzáférhető és jól körülhatárolható. Faragó (1997) megállapítja, hogy a vesezsír-index kiszámításával a kondíció magasabb fokozatairól kapunk információkat.

Caughley és Sinclair (1994) véleménye szerint a kondíció becslése egy populációból vett véletlen mintából pontatlan, mert az elhullott, vagy elhullás előtt álló, nagyon gyenge kondíciójú egyedek nem kerülnek a mintába, valamint azok a korosztályok, amelyek érzékenyek a táplálék sűrűségfüggő hatására, vagyis a nagyon fiatalok és a nagyon öregek a populáció kis részét alkotják, így a vizsgált állatok zöme egészséges, jó kondíciójú lesz.

Az elhullások nyomon követése és a tápláltsági állapot megállapítása mellett lehetőség kínálkozik az állatok parazitológiai vizsgálatára is, amely nem egy elsődleges állategészségügyi probléma, de állományunk általános egészségi állapotára vonatkozóan kitűnő indikátorként működik. Vadpopulációkban és természetes körülmények között a paraziták nem okoznak megbetegedéseket, hanem dinamikus egyensúlyi állapot alakul ki a gazdaszervezet és parazitái között. A zárttéri tartás során azonban beavatkozunk a természetes viszonyokba, így a továbbiakban a vadgazda feladata és felelőssége, hogy ezen természetes viszonyokat fenntartsa, megőrizze (Sugár, 1978). A parazitáknak humán-egészségügyi vonzatai is vannak, hiszen az ember a *közönséges hólyagféreg* (*Echinococcus granulosus*) köztigazdája is lehet (Tusán, 2001). A vaddisznó parazitáit Európában több szerző is vizsgálta. Haupt és Stubbe (1975) Németországban, Humbert és Henry (1989) Franciaországban, Jezierski (1977) Lengyelországban, Kutzer (1992) Ausztriában, Lepojev és Kulisic (1992) a volt Jugoszlávia területén, Takács (1996) pedig Magyarországon. A felsorolt szerzők a vaddisznók magas tüdőféreg-fertőzöttségét tapasztalták, ezért a paraziták bántalmak közül a *tüdőférgességnek* (*metasztröngilózis*) kiemelt jelentőséget tulajdonítanak.

A vaddisznó vadgazdálkodásban betöltött szerepe és a tüdőférgesség fontossága miatt célul tűztük ki több vadgazdálkodási egység területén élő vaddisznóállomány egészségi állapotának felmérését. Erre irányuló vizsgáatainkat 1996 őszétől kezdődően végeztük a Zselicségben található, SEFAG Rt. kezelésében levő vadászterületen. Jelen közleményünkben a 2003/04, valamint a 2004/05-ös vadászati szezonban, két vaddisznós kertből és a környező szabad területről származó vaddisznók tüdőféreg (*Metastrongylus spp.*) fertőzöttségének és kondíciójának megállapítására irányuló vizsgálatok eredményeit mutatjuk be.

Vizsgálataink fő céljai az alábbiak voltak.

- Adatok gyűjtése a tüdőférgesség gyakoriságáról és intenzitásáról a két vaddisznós-kert és a szabad terület összehasonlításához,
- Adatok gyűjtése az állatok kondíciójának megállapításához,
- Az eltérő gazdálkodás és kezelés hatásának összehasonlítása, s az eredmények ismeretében optimális kezelési elvek kidolgozása.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálati anyag

A vaddisznók vizsgálata a 2003/04 és a 2004/05-ös vadászati idényben, a téli (novembertől januárig) időszakban történt a Zselicségben (Közép-Somogy). A téli mintavétel időpontját több tényező is indokolja: egyfelől az éves teríték közel 90%-a ebben az időszakban, a hajtóvadászatok során esik el, másfelől a téli környezeti feltételek (hideg idő, beszűkült táplálékforrás) és az intenzív vadászatok által okozott megnövekedett stresszhelyzet gyengébb kondíciót és kisebb ellenálló-képességet okoz, aminek következtében az esetleges megbetegedésekre ebben az időszakban fokozottabban fogékonyak állományaink. A mintákat két vadaskerti és a környező szabad területen elejtett vaddisznókból gyűjtöttük. A kertekben vizsgálatainkat megelőzően nem végeztek parazitológiai felméréseket. A vizsgálatokat részben a területen a zsigereléskor végeztük,

részben a késő esti időszakban az erdészet hűtőkamrájánál. Utóbbi helyen történt az adatok felvétele és a pontos mérlegelés is hitelesített tizedes mérleggel. A vizsgálat során az állatokat egyedi azonosító számmal láttuk el, ami segítette a későbbi adatfeldolgozást és lehetőséget adott az utólagos ellenőrzésre is.

A zsigerelő helyeken állapítottuk meg az állatok ivarát, korát, valamint mértük a testtömeget is. Az állatok korát fogazatuk alapján határoztuk meg és három csoportot különítettünk el (*korcsoport 1*: 1 év alatti egyedek – malacok, *korcsoport 2*: 1,5 éves egyedek – süldők, *korcsoport 3*: 2 évesnél idősebb egyedek).

A mintagyűjtés ideje alatt 11 alkalommal, összesen 176 állatból származó mintát vizsgáltunk meg.

A vizsgálat során az alábbi adatokat vettük fel:

- vizsgálat helye
- vizsgálati időpontok,
- ivar és korcsoportok,
- testtömeg,
- tüdőféregszám,
- vese és vese körüli zsír tömege.

A *légzőszerveket* a légcsőtől a főhörgők végső elágazásáig ollóval felvágtuk és az így láthatóvá vált tüdőférgeseket csipesszel kigyűjtöttük. A tüdőkből kigyűjtött férgeket sztereómikroszkóp alatt a laboratóriumban számoltuk meg.

Az állatok kondíciójának megállapítására szolgáló *veseszírintex* megállapításához 1 g-os pontossággal megmértük a vese, valamint a vese körül található zsír tömegét. A vesezsír mérése a kötőszövetes tokkal együtt történt. Az index kiszámítása az alábbi képlet alkalmazásával történt:

$$\text{Vesezsírindex} = \frac{a \text{ vese} + a \text{ vese körüli zsír tömege}}{a \text{ vese tömege}} \quad (\text{Sugár, 2000}).$$

A vizsgálati területek

Sásostói kert (K1)

300 ha nagyságú, melynek erdősültsége 88%-os. A vadászati szezon előtti állománynagyság 220 db (állománysűrűség: 0,7db/ha). Az alkalmazott terápiás módszer szerint május végén a befogások befejeztével csak a malacokat kezelik *ivermectinnel* (*Ivomec® inj.*, *Merial*), amit a kertek feltöltésekor végeznek el. A kertben alkalmazott kezelési eljárás és tartási mód intenzívnek mondható, hiszen a malacok nevelése kutricás malacnevelőben történik, ami lehetővé teszi az egyedi gyógyszeres (injekciós) kezelést. Emellett a kertben külön tenyészt-, vadász-, és kan korosbító kertek is találhatóak.

Tótfalusi kert (K2)

213 ha-os, melynek erdősültsége 61%-os. A feltöltött kert állománya 170 db-ra tehető (állománysűrűség: 0,8db/ha). A gyógyszeres kezelés során *albendazol*-t (*Vermitan®*, *Phylaxia-Sanofi*) használnak, melyet takarmányba keverve juttatnak ki, két ízben 1-1 hétig folyamatos etetve, május és június végén. A kertek feltöltése minden évben szabad területről való befogással történik. A kertben a vadászkerthen kívül csak egy 18 ha-os karantén található, ezért ez a kert a sásostóihoz viszonyítva extenzívnek mondható.

Az állománysűrűség (állománynagyság [db] / terület nagyság [ha]) tekintetében a kertek egyike sem éri el a *Palkovics és mtsai.* (1986) által kritikusnak tartott 1 db/ha-os állománysűrűséget, mely esetben rövid időn belül bekövetkezik a terület felélése és a stresszhelyzet fokozódása.

Szabad terület (SZT)

Mintegy 6.000 ha-os kiterjedésű terület, 67%-os erdősültséggel. A szabad területi populációt 250-300 egyedre becsülik (állománsűrűség: 0,05 db/ha).

Adatok feldolgozása

A mintavétel során felvett adatok alapján kiszámítottuk a tüdőféreg-fertőzöttség *prevalencia* értékeit (fertőzött egyed/összes vizsgált egyed, %), átlagos *intenzitását* (összes talált tüdőféreg/fertőzött állat), illetőleg *abundanciáját* (összes talált tüdőféreg/összes vizsgált egyed).

A statisztikai számítások elvégzéséhez Quantitative parasitology 2.0 programcsomagot használtuk (Rózsa és mtsai., 2000). A különböző csoportok prevalenciáinak statisztikai összehasonlítására χ^2 próbát, míg az átlagos intenzitás- és abundanciaértékek elemzésére Bootstrap 2 mintás t-próbát alkalmaztunk. A vesezsírindex adatok feldolgozása az SPSS 11.0 statisztikai programmal történt. A különböző korcsoportok adatainak összehasonlítása egytényezős varianciaanalízissel történt, a csoportok közti eltérések szignifikanciáját LSD teszttel vizsgáltam.

EREDMÉNY ÉS ÉRTÉKELÉS

A tüdőféreg-fertőzöttség mértéke (prevalencia, intenzitás és abundancia) a minták származási helye szerint a 3. táblázatban találhatóak szerint alakult.

3. táblázat

A vizsgált vaddisznóterítékek tüdőféreg prevalencia, intenzitás és abundancia adatai

Minták (1)	n	Prevalencia	Átlagos int.	Medián int.	Átlagos abundancia
Sásostó (2)	66	81,8 ^a	42,4	22,5	34,7 ^a
Tótfalu (3)	63	54,0 ^b	25,2	15,0	13,6 ^b
Szabad terület (4)	47	63,8 ^b	41,2	19,5	26,3 ^{ab}
Összesen (5)	176	67,0	37,1	20,0	24,9

P<0,05

Table 3: Lungworm prevalence, intensity and abundance data in wild boar bags sampled

Samples (1), Sásostó enclosure(2), Tótfalu enclosure (3), Open hunting area(4), Total(5)

A kapott eredmények az előzetesen vártnál és a szakirodalomban leírt értékeknél alacsonyabb szinten alakultak a tótfalusi kertben, valamint a szabad területen, míg a sásostói kertben magas prevalenciát tapasztaltunk. A vizsgálati területek közti eltéréseket statisztikailag is igazolni tudtuk, hiszen a különböző vizsgálati helyszínek adatainak statisztikai elemzése során szignifikáns különbséget tapasztaltunk a szabad területről származó minták és a sásostói kertből származó minták között, valamint a két kertből származó minták között a prevalencia és az átlagos abundancia értékek esetében is. Az átlagos és a medián intenzitás értékeit tekintve a vizsgálati helyszínek között nem volt statisztikailag kimutatható eltérés.

A különböző korcsoportok tüdőféreg-fertőzöttségének mértéke a 4. táblázat szerint alakult.

4. táblázat

Vaddisznó korcsoportok tüdőféreg prevalencia, intenzitás és abundancia adatai

Minták (1)	n	Prevalencia	Átlagos int.	Medián int.	Átlagos abundancia
Korcsoport 1 (2)	13	61,5 %	35,3	6,5	21,7
Korcsoport 2 (3)	40	67,5 %	28,4	15,0	19,2
Korcsoport 3 (4)	123	67,5 %	40,2	24,0	27,1

Table 4: Lungworm prevalence, intensity and abundance data of different wild boar age groups

Samples (1), Age group 1(2), Age group 2(3), Age group 3(4)

A malac, süldő és kifejlett korcsoportba tartozó egyedek fertőzöttsége gyakorlatilag azonosnak mondható, míg az átlagos abundancia-, és intenzitásértékek kis mértékű ingadozást mutattak. Az adatok értékelése során azonban a három korcsoportból származó minták közti eltérés statisztikailag nem volt igazolható.

A makroszkópos vizsgálat során tüdőférgeket rendszerint csak a főhörgők végső szakaszában és az innen kiágazó hörgőcskében (a rekeszi lebenyek hátulsó szélén) találtunk. A férgek körül kisebb-nagyobb mennyiségű sárgásszürke színű, közepes konzisztenciájú nyálka volt megfigyelhető. Az ilyen tüdőrészek bemetszés nélkül is felismerhetők, a normális tüdőfelszínhez képest világosabbak, tömött tapintásúak, általában csak néhány cm²-nyi kiterjedésűek.

A vesezsírindex adatoknál a felnőtt egyedeknél külön értékeltük a két ivart, mintákat négy csoportra osztottuk (felnőtt kanok, felnőtt kocák, süldők és malacok). A kapott eredmények azt mutatják, hogy a malacok kondíciója volt a leggyengébb, a süldők 2,45-ös indexe közepesnek mondható, a felnőtt kanok jó (3,44) kondícióban voltak, míg a legjobb kondícióban (4,42) a kocák voltak. A vizsgált minta egészét tekintve megállapíthatjuk, hogy az állatok átlagos jó kondíciója ellenére mindegyik korcsoportban találhatóak rendkívül gyenge kondíciójú egyedek is.

5. táblázat

A vesezsír index alakulása korcsoportok és ivarak szerint

Minták (1)	n	Átlagos index (7)	s.d. (8)	Minimum	Maximum
Kanok (2)	49	3,44 ^b	1,94	1,07	9,13
Kocák (3)	36	4,43 ^a	2,52	1,20	12,40
Süldők (4)	21	2,99 ^b	0,94	1,23	4,81
Malacok (5)	6	1,99 ^b	1,00	1,33	3,83
Összes (6)	112	3,50	2,10	1,07	12,40

Table 5: Kidney fat indexes of different age groups

Samples(1), Tuskers(2), Adult sows(3), Yearlings(4), Piglets(5), Total(6), Mean index(7), Standard deviation(8)

A kapott adatok statisztikai elemzése során a kocáknál mért jó kondíciós állapot egyúttal szignifikánsan különbözött a másik három csoport vesezsírindex értékétől.

KÖVETKEZTETÉSEK

A tüdőféreg előfordulása gyakori (Tótfalu és Szabad terület), illetőleg igen gyakori (Sásostó) volt a vizsgált vaddisznó állományokban a nyár eleji parazita ellenes kezelések dacára is. A férgeket tartalmazó tüdőrészekben jelentős kóros elváltozást nem tapasztaltunk, amint azt *Mennerich-Bunge és mtsai.* (1993) is leszögezték. Az itt ismertetett vizsgálataink tapasztalatai alapján nem tudjuk megerősíteni a bevezetésben említett szerzők tüdőféregre vonatkozó erős patogenitás meglétét. A vaddisznók újrinfektózódása különösen az intenzíven tartott állományok esetében az etetőhelyek közelében elfogyasztott fertőzött földigiliszták miatt gyakorlatilag folyamatos. Azonban a malac, majd süldő korban viszonylag gyorsan kialakult szerzett immunitás következtében – megfelelő tartási és takarmányozási körülmények esetén – a tüdőféreg feldúsulásával nem kell számolnunk. Ezért véleményünk szerint évente legfeljebb *egy nyár eleji féreg ellenes gyógykezelés* szükséges a vaddisznók súlyos tüdőfégességének megelőzésére.

A vaddisznók jó kondíciója arra enged következtetni, hogy kielégítő mennyiségű és változatos takarmányozással az állatok megfelelő tápláltsági állapotban tarthatók. A kocák átlagon felüli kondíciójának biológiai magyarázata van, ugyanis a mintagyűjtés időpontja a vehemnevelés idejével esik egybe, mikor is a magzatok fejlődéséhez az állatok jelentős zsírtartalékot halmoznak fel.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatást a Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium Vadgazdálkodási és Halászati Főosztályának támogatásával végeztük (79840/2004.).

IRODALOM

- Caughley, G., Sinclair, A.R.E. (1994). Wildlife ecology and management. Blackwell Science.
- Faragó S., Náhlik A., (1997). A vadállomány szabályozása. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
- Haupt, W., Stubbe, I. (1975). Endoparasitische Untersuchungen an der Schwarzwildpopulation (*Sus scrofa*, L.) des Wildforschungsgebietes Havel. Beitr. Jagd-Wildforsch., 9. 195-203.
- Humbert, JF., Henry, C. (1989). Studies on the prevalence and the transmission of lung and stomach nematodes of the wild boar (*Sus scrofa*) in France. Journal of Wildlife Diseases. 3. 335-41.
- Jezierski, W. (1977). Longevity and mortality rate in a population of wild boar. Acta Theriol. 22: 337–348.
- Kutzer, E. (1992). Zum Einsatz von Ivermectin-Pra mix 0.6% bei Wildschwein (*Sus scrofa*). Wiener Tierärztliche Monatsschrift, 79. 208.
- Lepojev, O., Kulisic, Z., Aleksic, N., Dimitrijevic, S. (1992). Parazitske infekcije divljih svinja u Sremu. Veterinarski-Glasnik 46. 687-690.

- Mennerich-Bunge, B., Pohlmeier, K., Stoye, M. (1993). Untersuchungen zum Helminthenbefall der Wildschweinpopulation in Berlin (West). Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 6. 203-207.
- Országos Vadgazdálkodási Adattár (OVA) (2004). Magyarországi vadaskertek (Kimutatás). Gödöllő.
- Palkovics L., Büki L., Egyed I. (1986). A vaddisznó zárttéri tartása. MTI Fotóigazgatóság, Budapest. 28-39.
- Rózsa, L., Reiczigel, J., Majoros, G. (2000). Quantifying parasites in samples of hosts. J. Parasitol. 86. 228-232.
- Sugár L. (1978). Állati élősködők (paraziták) által előidézett betegségek. In: Hönich, M., Sugár, L., Kemenes, F.: A vadon élő állatok betegségei. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. 89-92.
- Sugár L. (2000). A betegségről általában. In: Bicsérdy Gy., Egri B., Sugár L., Sztojkov V.: Vadbetegségek. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 14-16.
- SPSS for Windows (2001). Version 11.0.1, Copyright SPSS Inc.
- Takács, A. (1996). Adatok a vaddisznó (*Sus s. scrofa*) endoparazita-fertőzöttségéhez Magyarországon. Magyar Állatorvosok Lapja 51. 721-724.
- Tusán, O. (2001). Zoonózisok, mint foglalkozási betegségek a vadgazdálkodásban. Szakmérnöki diplomadolgozat, GATE, Állattani Tanszék, Gödöllő.

Levelezési cím (*corresponding author*):

Varga Gyula

7400 Kaposvár, Léva köz 5. I. lph. 3/3.

H-7400 Kaposvár, Léva köz 5. I. lph. 3/3.

Tel.: 36-82-505-112, fax: 36-82-505-107

e-mail: varga.gyula@sefag.hu



Separation and determination of the amino acids by ion exchange column chromatography applying post-column derivatization

J. Csapó, K. Lóki, Zs. Csapó-Kiss, Cs. Albert

University of Kaposvár, Faculty of Animal Science, Kaposvár, H-7400 Guba Sándor u. 40.

² Sapientia Hungarian University of Transylvania, Csíkszereda, R-530104 Szabadság tér 1.

ABSTRACT

The most perfect method for the determination of the amino acid composition of pure protein feeds or biological fluids is still the ion exchange column chromatography (IEC). With the help of the lithium buffer system, most of the problems in the field of free amino acid analysis of biological fluids can be solved. At IEC, most contaminants move rapidly through the post-column system and are discarded before the separation of amino acids begins, resulting in better performance. The time required for the sample preparation is minimal compared to pre-column methods, and the detection (with ninhydrin or OPA) is chemically specific for amino acids. A new off-line sample preparation method has been introduced before analysis by an ion-exchange chromatography and integrated amperometric detection, which eliminates carbohydrates from amino acid samples. However, the major problems remained in the hydrolysis of the protein, the de-proteinization of the biological fluids and the partial decomposition of methionine, cysteine and tryptophan during the sample preparation for analysis. At the moment the traditional IEC with post-column ninhydrin derivatization seems to be the best method to analyse both pure proteins and feeds and complex mixtures, but in some comparison the HPLC methods were found to be similar to that of the IEC.

(Keywords: ion exchange column chromatography, IEC, high performance liquid chromatography, HPLC, amino acids, determination)

ÖSSZEFOGLALÁS

Az aminosavak elválasztása és meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával, oszlop utáni származékképzés alkalmazásával

Csapó, J., Lóki, K., Csapó-Kiss, Zs., Albert, Cs.

Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Kaposvár, 7400 Guba Sándor u. 40.

² Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Csíkszeredai Campus, Csíkszereda, R-530104 Szabadság tér 1.

Tiszta fehérjék, élelmiszerek, biológia eredetű folyadékok aminosav-összetételének meghatározására a legáltalánosabb módszer még mindig az ioncserés oszlopkromatográfia (IEC). Biológiai eredetű folyadékok szabadaminosav-tartalmának meghatározása lítium pufferek alkalmazásával könnyen megvalósítható. IEC esetén a szennyező anyagok többsége gyorsan keresztül jut az oszlopon, mielőtt az aminosavak szétválasztása megkezdődne, ami megnöveli a módszer hatékonyságát. A minta-előkészítés ideje az oszlop előtti származékképzést alkalmazókhoz képest minimális, és az

aminosavak kimutatása OPA-val vagy ninhidrinnel specifikus az egyes aminosavakra. Újabban egy off-line minta-előkészítést alkalmaznak anioncserélő kromatográfiával és amperometriás detektálással kombinálva, melynek segítségével a szénhidrátok zavaró hatása kiküszöbölhető. A legfontosabb problémák továbbra is a fehérjehidrolízis, a biológiai eredetű minták fehérjementesítése, és a metionin, a cisztein és a triptofán részleges elbomlása a minta-előkészítés során. Jelenleg a hagyományos IEC oszlop utáni ninhidrines származékképzés tűnik a legjobbnak tiszta fehérjékre, élelmiszerekre és komplex keverékekre is, bár néhány esetben a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia is hasonlóan jönnek bizonyult.

(Kulcsszavak: ioncserés oszlopkromatográfia, IEC, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia, HPLC, aminosav-meghatározás)

INTRODUCTION

Moore and Stein (1951, 1958) devoted much time to the separation and very precise determination of amino acids in the middle of the 20th century. In 1958, together with Spackman they published the description of the automatic amino acid analyser for quantitative and qualitative determination of amino acid content of the protein, which was based on ion exchange column chromatography (IEC) after post-column derivatization with ninhydrin. For this work in 1972 they have been awarded the Nobel Prize. After they published their method, many researchers tried to improve it, so many elaborate ameliorations were tried, but the principles of the method were unchanged. Most of the amino acid analyser operates by the traditional principle of Moore and Stein and uses ninhydrin or some different post-column derivatization methods (Friedman, 1975; *Amino acid analysis Handbook and application* 1982; Holm and Peck 1998; Belitz and Grosch 1999; Moughan et al., 2000; Cooper et al., 2001; *Amino acid analyser AAA 400*, 2002; Walker, 2002; Bologa, 2002).

By, Parvy et al., 1990, approximately 94% of the laboratories used an ion-exchanging technique coupled with colorimetric detection after reaction with ninhydrin for determination of the amino acid content of proteins and free amino acids from biological fluids, and only 6% used gas chromatography. Interestingly, no participating laboratory using high performance liquid chromatography (HPLC) with pre-column derivatization was able to provide usable results, despite several requests to participate and to dispatch samples. This confirms that the use of HPLC with pre-column derivatives cannot yet be considered to be a routine for determining all the amino acids in biological fluids.

Recently, HPLC has become very popular in the field of amino acid analyses, but the determination of the amino acids by means of HPLC brought a number of problems in comparison with the classical Moore and Stein method. These problems explain the small number of HPLC methods in the practice today. For HPLC analysis of amino acids, perfectly clean samples are required, otherwise the impurities of the sample destroy the pre-wash or analytical columns, or the derivatization of the amino acids is not successful. The IEC method is not as sensitive regarding the impurities of the sample, and there is no need for pre-column derivatization of the amino acids.

Since the original publications, several researchers published improvements in the technique, but these meant no fundamental changes. They intend to improve the sample preparation method, the hydrolysis of the protein, and the determination of the sensitive amino acids (methionine, cystine, tryptophan) by different protein hydrolysis methods, and mark the trend to faster analysis and higher sensitivity. The original two columns

system described by *Moore and Stein* (1951, 1958) was used for a long time, but lately the single column system has increased. An accelerated single column lithium buffer system was examined for determination of the ninhydrin positive compounds of biological fluids, and others investigated the different post-column derivatization method with different agents for improving the sensitivity of the determination (*Davies*, 1992; *Pickering*, 1981; *Ashworth*, 1987).

There have been relatively few methodological advancements in the past 15 years, but the technique is still very wide-spread. In comparing post-column and pre-column methodologies, some advantages of the post-column methods should be noted. Since ion exchange properties dominate when the sample is loaded, most contaminants move rapidly through the post-column system and are discarded before separation of amino acids begins, resulting in a more favourable performance. Sample preparation is minimal compared to pre-column methods. Detection (with ninhydrin or OPA) is chemically specific for amino acids. Considerable literature exists concerning retention times of amino acids and derivatives (over 500 have been catalogued). The accuracy and precision of the data can be maintained at a high level with a reasonable amount of effort (*Andersen*, 1994).

SAMPLE PREPARATION

The most correct separation of the samples is the base of the accurate and repeatable analysis of amino acids by automatic IEC. Before the preparation of the samples the protein content or the approximate content of amino acids should be known for the selection of the optimum weighing of the original sample. The sample has to be as pure as possible, because some of the constituents of the sample can assist in the destruction of the sensitive amino acids. The volume of the sample which can be applied to the ion exchange column vary for the different instruments. With refinements in instrumentation, the tendency has been pointing towards a decrease of the sample volume to 50 µl or less. The preparation of the sample can be divided into two parts depending on the purpose of investigation: releasing the amino acids from protein and peptides by means of hydrolysis, and preparation of samples containing free amino acids when the protein and other disturbances are removed. This paper does not deal with the hydrolysis methods (acidic hydrolysis, performic acid oxidation before hydrolysis for the determination of the sulphur containing amino acids, the hydrolysis methods for the determination of tryptophan and recent developments in the hydrolysis) of the proteins.

ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY OF AMINO ACIDS

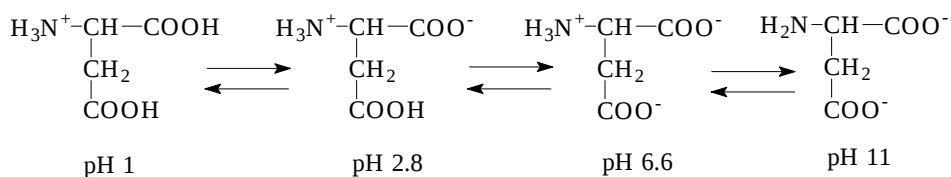
Introduction

After sample preparation, in most cases meaning hydrolysis of the protein or preparation of the sample for free amino acid analysis, depending on the amino acids present in the sample, sodium or lithium buffers are prepared for separation of the amino acids by IEC. The eluate from the ion exchange column is passed through in a Teflon coil placed in a boiling water bath or other heating apparatus. Before entering the column, the column effluent is mixed with reduced ninhydrin reagent, which is dissolved in acetate buffer. The ninhydrin reacts with amino acids forming a dye complex. The absorption is determined in a flow photometer, and registered on the chart of a recorder or a computer. The area under the peaks corresponds to the amount of amino acids present in the sample. The evaluation can be done manually or automatically with an integrator or a

computer. The circumstances of the analysis make it possible to quantitate as little as one nanomol amino acid with a high degree of accuracy (Moore and Stein 1951; 1958; *Amino acid analysis Handbook and application* 1982; *Amino acid analyser AAA 400*, 2002).

The original two-column system for separation all of the protein building amino acids were described first by *Spackman, et al.*, and this method was used for manual and automated systems for many years. Today this method is not used because of problems are related to reliability, accuracy, sensitivity and the sample loading system. Currently, the simple single column system is generally used. Using the method of Moore and Stein, the amino acids are separated on a cation exchange resin with buffers of carefully defined salt concentration and pH *Moore and Stein* (1951, 1958). The ion exchange takes place on resin, consisting of small spherical beads of polystyrene, reacted with divinylbenzene to achieve the required degree of cross linkage between the two polymerised chains of styrene, and sulphonated to provide an electrical charge. The chromatographic column is filled with resins of negative charge, and the amino acids are put on the column at a low pH value (pH=2.2), hence all of them bear a positive charge. In these conditions, all of the amino acids will link to the resin, no chromatographic division will occur, and the amino acids are waiting at the beginning of the column for a change in conditions. If the pH and the ionic strength of the elution buffers increase, the isoelectric point of the amino acids will be reached, and the attraction of the ions towards the resin diminishes and so the amino acids will be eluted from the column. The isoelectric point of an amino acid molecule is defined as the pH value, at which the molecule, in the solution, do not dispose of any charge. The isoelectric point of amino acids is a function of the pH values of the ionisable groups in the molecule. The conditions of the separation of the amino acids can be modified in a way that the isoelectric points for all amino acids are to be reached at various times. For example in the case of aspartic acid (*Equation 1*) the different charges at different pH is the following (*Holm and Peck*, 1998; *Belitz and Grosch*, 1999).

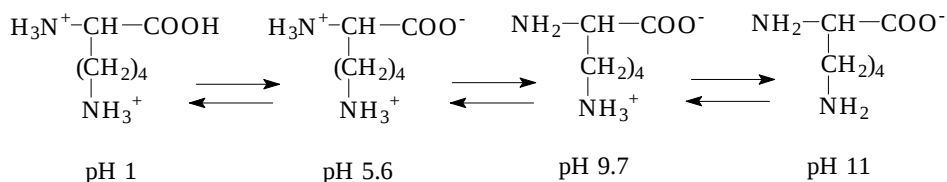
Equation 1



At pH=1 the molecule has one positive charge, but if the pH value is increasing, larger number of molecules situated in the α -carboxil group will have a negative charge up to the limit of pH=2.8, when all of them dispose of it. This is the isoelectric point of the aspartic acid. The carboxylic group in the side chains is less acid than the α -carboxilic acid, and the concentration of the hydrogen ions is sufficient enough to prevent its ionization. If the pH value rises to 6.6, the carboxylic group of the side chain will be ionised, and the molecule will get two negative and one positive charge, and if the pH rise to 11.0, the molecule will dispose only two negative charges.

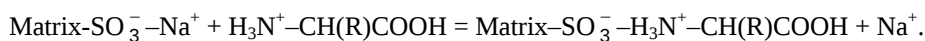
The lysine has an amino group on its side chain, its isoelectric point is at pH=9.7. At pH=1 the lysine possesses two positive, at pH=5.6 two positive and one negative, at pH=9.7 one positive and one negative and at pH=11 one negative charge (*Equation 2*) (*Holm and Peck*, 1998; *Belitz and Grosch*, 1999).

Equation 2



The theoretical treatment of the separation of amino acids supposes that the concentration of the individual amino acids is small, therefore the ratio between the amino acids bound to the resin and free in the solvent have to be regarded as independent of concentration. The process of ion exchange is the following (*Amino acid analysis Handbook and application*, 1982).

Equation 3



The distribution coefficient $a_{\text{amino acid}^+}$ for the amino acid is defined as the ratio between free and bound ion in a given section of the column (equation 3).

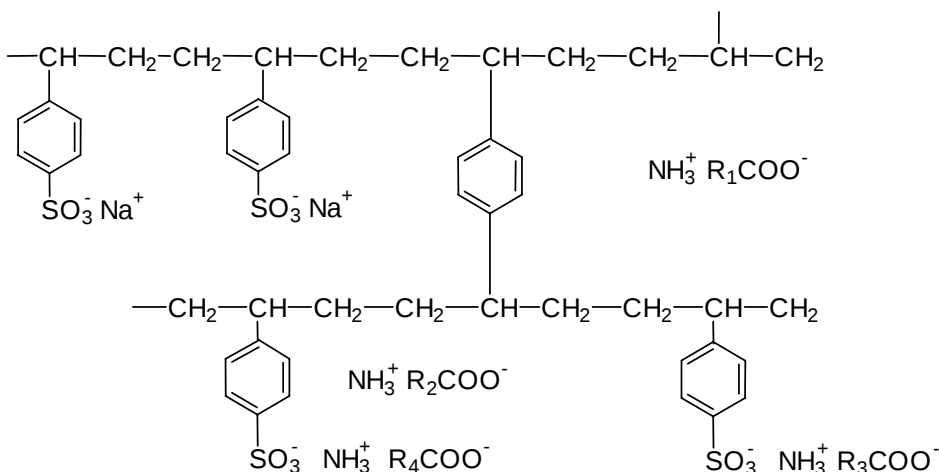
$$a_{\text{amino acid}^+} = \frac{[\text{Matrix} - \text{SO}_3^- - \text{H}_3\text{N}^+ \text{CH(R)}\text{COOH}]}{[\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH(R)}\text{COOH}]}.$$

Where: $[\text{Matrix} - \text{SO}_3^- - \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH(R)}\text{COOH}]$ is the concentration of amino acid bound to the resin, $[\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH(R)}\text{COOH}]$ is the concentration of the free amino acids in the buffer.

For the ion exchange process, the law of mass action can be applied, and from the equilibrium constant (K), the amino acid concentration bound to the resin, the free amino acid concentration, the counter ion concentration bound to the resin, and the free counter ion concentration, we can get information about the elution of the amino acids and the retention time.

Ion exchange resins

Today, spherical ball shape ion exchange resins are used (*Amino acid analyser AAA 400*, 2002). The synthesis is carried out by means of co-polymerization of styrene and divinylbenzene. The share of divinylbenzene applied in the synthesis is approximately 8%. The concentration of divinylbenzene is very important as it forms cross links in the styrene chains leading to the formation of the ball shape, and as depending on the quantity of cross links the resin has more or less favourable properties: terms of rigidity, swelling capacity and porosity. The structure of the resin and the procedure of the ion exchange is the following:



The cross-linked resin structure is referred to as resin matrix, and if it is sulfonated, then the strongly acid cation exchange resin is obtained. The sections situated inside of the skeleton are called pore, and for the charged ions $-\text{SO}_3^-$ the term linked ions are used. The ions bearing the opposite charge are referred to as exchangeable ions being assigned to the matrix by means of heteropolar links. These are positively charged groups in buffers or amino acids. During the ion exchange the buffer ions bearing opposite charges penetrate to the matrix pores, and exchange places with the ions with opposite charges, which are linked there.

The dimension of the particles, the level of sulphonation and cross linking varies in the case of resins used for the amino acid analysis (Friedman, 1975; *Amino acid analyser AAA 400*, 2002).

As the divinylbenzene concentration increase, the cross-linking occurs at shorter intervals and the effective particle size or permeability is reduced, contrarily, the anchor group is brought closer to one another so that the separating power is increased. The low cross-linking resins with 1-4% divinylbenzene have a higher permeability, their equilibrium is reached more rapidly, and they are capable of handling larger molecules. The capacity of the resins, because the swollen volume is smaller, the separation power for certain ions is reduced, and the physical stability of the resin is also less. The low cross-linking resins with 8-16% divinylbenzene have small pore size, lesser permeability, but are sufficient for more minor ions, and the swelling is slight.

Examining the particle size of the resin it is advisable, that the smallest possible particle size is the best. The exchange rate increases with decreasing particle size, since the diffusion path between the active groups become shorter. Short diffusion values improve the sharpness of the separation, and permit to use shorter columns reducing the separation time. Smaller particles have a higher mechanical stability, which is to be considered very important, because the resin expands and contracts in the column through the continuous changes in pH and concentration during the analysis.

The dimension of the separating column is very important as regard to the high resolution separation between the amino acids. The diameter of the columns nowadays is 1-2 mm, but earlier columns with 5-9 mm diameter were widely used. The larger diameter columns are preparative columns. The separating performance depends in

addition to the diameter of the ion exchange particles, on a length factor and the column diameter. It is preferable to keep the column as narrow as possible in order to have the largest possible number of the theoretical plate number in the column.

The flow rate of the eluting buffer on the column is very important, as it determines the time of the analysis. If the flow rate through the column is more than the optimal, the fractions leaving the column become unsymmetrical, leading to tailing, in addition the amino acid peaks can overlap. Increasing flow rate leads to a higher back pressure, which is undesirable for safety.

The regeneration of the ion exchange column is indispensable after the sufficient number of amino acid analysis. During the regeneration sodium hydroxide or lithium hydroxide is used to wash the impurities from the column and replace the Na^+ or Li^+ ions used during the analysis. Some authors suggest 0.2–1.0 M, but the optimum concentration seems to be 0.4 M for sodium hydroxide and 0.3 for lithium hydroxide. If cation resins contaminated with heavy metals, proteins or other bigger molecules, the resin have to be removed from the column, treated with 1% EDTA in 2 M hydrogen chloride solution for some hours at room temperature, regenerated by boiling the resin in 6 M HCl for half an hour, cooled at room temperature, diluted to 3 M HCl, filtered and washed with 500 cm³ two times distilled water. Remove the resin from the filter and suspend in 2 M NaOH or LiOH depending fro Na or Li system. Boil the resin for some minute, and dilute to 0.5 M base. This resin is ready to fill in the analytical column (*Amino acid analysis Handbook and application*, 1982; *Amino acid analyser AAA 400*, 2002).

The chromatography activity of the amino acid analysers is still influenced by the column dimensions, eluent flow rate, temperature and the presence of organic solvent in the buffers.

Buffer systems for separation of the amino acids

Choice of buffer system

Generally protein hydrolysates contain most of all 18 amino acids normally found in proteins, they are easily separated with three sodium buffer system. Physiological fluids contain some of all the 40–50 ninhydrin positive compounds present in different physiological mixtures. For this purpose four or five sodium buffer system is suitable to achieve the satisfactory separation between the ninhydrin positive compounds. The lithium buffer system is suitable for these purposes, but the application of this system is justified rather in the case that simultaneous separation of aspartic acid, asparagine, glutamic acid and glutamine is required. The lithium system is more sensitive to variations than the sodium system.

The salts used for making buffers should be at the highest purity. The salts should be dissolved in deionized or carefully distilled water. Not only the ninhydrin positive impurities, but others may cause irregularities in the baseline, for this reason freshly drawn deionized water is preferred. The acidic buffers have a tendency to take up ammonia and other ninhydrin positive compounds, therefore it is advisable to add the HCl as late as possible to the buffers. The source of ammonia is tobacco smoke, cleaning fluids, urine of the laboratory animals and toilets, and vapour of different chemicals.

Sometimes thiodiglycol is added to the buffers to prevent oxidation of methionine, which can under certain circumstances influence the baseline shifts. Organic solvents (ethanol, propanol, 2-methoxyethanol) in the case of some resins is also added to the first buffer to improve the separation between threonine and serine. These peaks become slightly broader as the column ages a further additional organic solvent may be

necessary later. It appears that different solvents are more adequate to different resins. Preservatives are added to the buffers to inhibit the growth of micro organisms. Several different chemicals (0.1% phenol, 0.01% pentachlorophenol, 0.01% caprylic acid) can be used for this purpose (*Amino acid analysis Handbook and application*, 1982; *Amino acid analyser AAA 400*, 2002).

Effect on separation by pH, temperature, organic solvents and column flow rate

The pH of the buffer is very critical for the separation of various amino acids. All of the peaks of amino acids emerge earlier and sharper if the pH is too high, and peaks the chromatograph later if the pH is too low. The cystine is the most sensitive for the pH, temperature and the concentration of the ions with an opposite charge of the buffer. Cystine should be eluted and completely separated directly after alanine. With increasing pH and temperature the column accelerates the cystine, thereby shortens its elution time and if the temperature and pH are lower, its elution times become longer, and cystine falls behind. The pH value and temperature must be selected in a way, that cystine can just be positioned between alanine and valine. The pH change has a greater influence on the cystine movement than a change in temperature.

The temperature affects the separation in two different ways: by changing the pH and by altering the affinity of the amino acids to the ion exchange resin. The separation between threonine and serine can be improved by lowering the temperature, but at the same time the backpressure is increased substantially, and it influences the separation of the glutamic acid. Therefore it is important to have a temperature gradient after the separation of the two hydroxy amino acids. Cystine is also sensitive to temperature, but any changes in the retention time caused by the temperature can easily be compensated by the pH. In the system for hydrolysates the increase of the temperature from 50°C to 70°C or higher is recommended to decrease the time of analysis, but this rise should not take place before the separation of isoleucine and leucine. The optimum temperature for separation of aspartic acid, hydroxy proline, threonine, serine, asparagine, glutamic acid and glutamine is 37–38°C with both sodium or lithium buffer systems, as glutamic acid is particularly sensitive even to minor changes of temperature.

The organic solvent added to the first buffer changes the solubility of the different amino acids. It is particularly the extra $-\text{CH}_3$ group of threonine as compared to serine that results in melioration in separation. The most frequently used compounds are methanol, ethanol, propanol, isopropanol and methyl cellosolve. The drawback of these techniques is a slight loss of separation between glycine and alanine and an increased back pressure. It is possible to use as much as 25% of organic solvent, but the normally used concentration is between 2% and 5%. The analysis should be started at a rather low percentage of organic solvent, providing an acceptable separation between threonine and serine, and increases the amounts when the column becomes older, and the peaks slightly broader. The limiting factor should be the separation between glycine and alanine.

A steady buffer flow rate is required for successful and reproducible separations of amino acids by IEC. This can be achieved with a constant pressure or a constant displacement pump. At most of the analysers the pumps are pulse-free and feature an even power output and their utilisation guarantees conformity of the retention times of individual peaks. The pressure limit of the pumps is 1 to 8 MPa, and is controlled by the software. The choice of flow rate is dependent upon the type of resin, the dimensions of the column and the overall design of the instrument, and it varies between models (*Friedman*, 1975; *Amino acid analyser AAA 400*, 2002).

Preparation of the sodium citrate buffers

Sodium citrate buffers are mainly used for the determination of amino acids in protein hydrolysate (Table 1). List of necessary chemicals: citric acid, sodium citrate, sodium chloride, sodium hydroxide, boric acid, thiodiglycol, sodium azide. The table for computation of the quantity of the individuals for the preparation of the sodium citrate buffers is below (*Amino acid analyser AAA 400*, 2002).

Table 1**The composition of the sodium buffers**

Buffers				
	1	2	3	4
M Na	0.2	0.2	0.4	1.12
M citrate	0.066	0.066	0.066	0.066
pH	2.60	3.00	4.25	-
Citric acid (g/dm³)	30	30	32	-
Sodium citrate (g/dm³)	19.6	19.6	19.6	19.6
Sodium chloride (g/dm³)	11.7	11.7	23.4	52.6

1. táblázat: A nátrium-puffer összetétele

Diluting buffer of 0.2 M sodium with pH=2.2 will be used for the dilution of both the samples and standards to a required concentration. The *regeneration solution is 0.2 M sodium hydroxyde*. The *first sodium buffer* (0.20 M Na, pH=2.95) elutes the following amino acids: aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine and cystine. This buffer is designed for the determination of the amino acid content of the hydrolysate, and this buffer is suitable for assaying cysteic acid and methioninesulphone as well. It is also used when it is necessary to determine proline exactly, or when you want to determine the amino acids with the best separation, and the time of the analysis is not a limiting factor. In this buffer smaller ionic strength is used, therefore cystine is eluted after glycine and alanine. With an increased value of pH and increased temperature cystine elute earlier. The separation of threonine and serine as well as glycine and alanine is very good in the case of this buffer. These two groups of peaks behave in the same way as a balancing mechanism, if the separation is improved at one pair, the separation of the other ones become worse. It means that if cysteine is separated well, both of the pairs will be separated at a very good extent.

The second sodium buffer (0.30 M Na, pH=3.50) elutes the following amino acids: aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, cystine glycine, alanine and valine. This is a classical buffer designed for the single column system of the determination of the hydrolysate. The cysteine is very sensitive for pH, temperature and concentration of ions with an opposite charge. An increasing pH and temperature accelerates its movement on the column and cystine thereby shortens its elution time. The pH value of the buffer and temperature must be selected in a way that cystine can just be positioned between proline and glycine.

The third sodium buffer (0.40 M Na, pH=4.25) elutes the following amino acids: methionine, isoleucine, leucine. This buffer is not problematic as all of the amino acids are separated very well. *The fourth sodium buffer* (1.12 M Na, pH=7.9) elutes the rest of

the amino acids: tyrosine, phenylalanine, histidine, lysine and arginine, and among the amino acids elute ammonia.

Preparation of the lithium citrate buffers

Lithium citrate buffers are used especially for the determination of the free amino acids from physiological samples (Table 2). List of necessary chemicals are: citric acid, lithium citrate, lithium chloride, lithium hydroxide, boric acid, thiodiglycol, lithium azide. The table for computation of the quantity of the individuals for the preparation of the lithium citrate buffers is below (*Amino acid analyser AAA 400*, 2002; *Pickering*, 1989).

Table 2

The composition of the lithium buffers

Buffers					
	1	2	3		5
M Li	0.18	0.20	0.35	0.33	1.20
M citrate	0.053	0.060	0.070	0.100	0.220
pH	2.90	3.10	3.35	4.05	4.65
Citric acid (g/dm³)	27.26	30.07	35.17	38.48	41.65
Lithium citrate (g/dm³)	14.92	16.92	19.74	28.20	62.04
Lithium chloride (g/dm³)	7.62	8.47	14.83	13.98	50.87

2. táblázat: A lítium-puffer összetétele

Diluting buffer of 0.1 M lithium with pH=2.2 will be used for the dilution of both the samples and standards to a required concentration. The *regeneration solution is 0.3 M lithium hydroxyde*. The *first lithium buffer* (0.18 M Li, pH=2.80) elutes the following amino acids: cysteic acid, taurine, phosphoetanolamine, urine, aspartic acid, hydroxyproline, threonine, serine, asparagine, glutamic acid, glutamine. Elution is carried out at the basic temperature of 37 to 40°C. In terms of pH and temperature the most sensitive ones are asparagine, glutamic acid and glutamine. Glutamic acid is the most responsive and most moveable at a change in pH and temperature, therefore the pH and temperature must be prepared in a way that glutamic acid can just be positioned in the middle between asparagine and glutamine.

The *second lithium buffer* (0.20 M Li, pH=3.05) elutes the following amino acids: α -amino adipic acid, proline, glycine, alanine, citrulline, α -amino butiric acid and valine. Citrullin is very sensible to temperature and pH, its position can be set by the pH of the buffer. The *third lithium buffer* (0.36 M Li, pH=3.35) elutes the following amino acids: cystine, methionine, cystathionine, isoleucine, leucine. At this buffer only the cystathionine is problematic, which is receptive for both pH and temperature. It is recommended to switching to the higher temperature (60°C) so that the cystathionine will be positioned in the middle between methionine and isoleucine. In the case of a latter switching of temperature cystathionine is eluted afterwards and it is not sufficiently separated from isoleucine, in opposite case it is eluted with methionine.

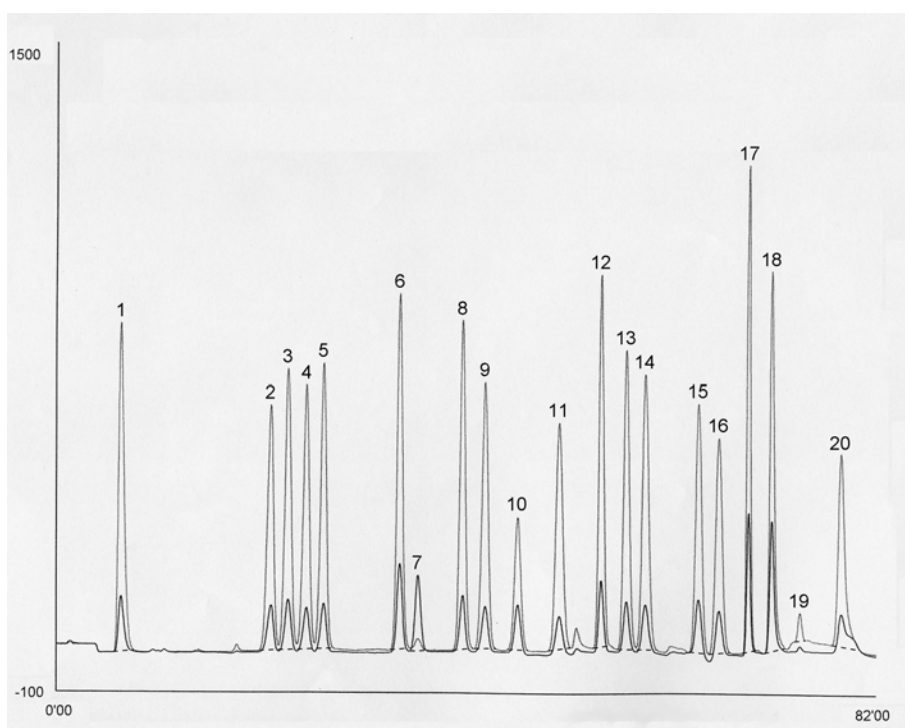
The *fourth lithium buffer* (0.33 M Li, pH=4.05) elutes the following amino acids: tyrosine, phenylalanine, β -alanine and β -amino butyric acid. This buffer is not accompanied by any problem if the buffer change has been performed in the right place.

The *fifth lithium buffer* (1.20 M Li, pH=4.65) elutes the following amino acids: γ -amino butyric acid, ornithine, lysine, histidine, 1-methyl histidine, 3-methyl histidine and arginine. This buffer is trouble free. The buffer change must be performed after β -amino butyric acid.

Lithium buffers are much more aggressive than Na buffers, that is why it is suitable to rinse approximately once a month with distilled water at the maximum throughput of the pump. Because of Li buffers are more aggressive towards all metals, it is not recommended to leave them for longer times in contact with surfaces of varnishes and metals. At *Figure 1* the chromatogram of the hydrolysate after performic acid oxidation, at *Figure 2* the chromatogram of the free amino acid can be seen.

Figure 1

Determination of the amino acids from hydrolysate after performic acid oxidation of the sample



1. ábra: Az aminosavak meghatározása perhangyasavas oxidáció után

The standard contains 25 nmol of each component except for ammonia. Operating parameters are given below (*Amino acid analyser AAA 400*, 2002). The amino acids in order of appearance on the chromatogram are: 1. cysteic acid, 2. methionine sulphone, 3. aspartic acid, 4. threonine, 5. serine, 6. glutamic acid, 7. proline, 8. glycine, 9. alanine, 10. cystine, 11. valine, 12. methionine, 13. isoleucine, 14. leucine, 15. tyrosine, 16. phenylalanine, 17. histidine, 18. lysine, 19. ammonia, 20. arginine.

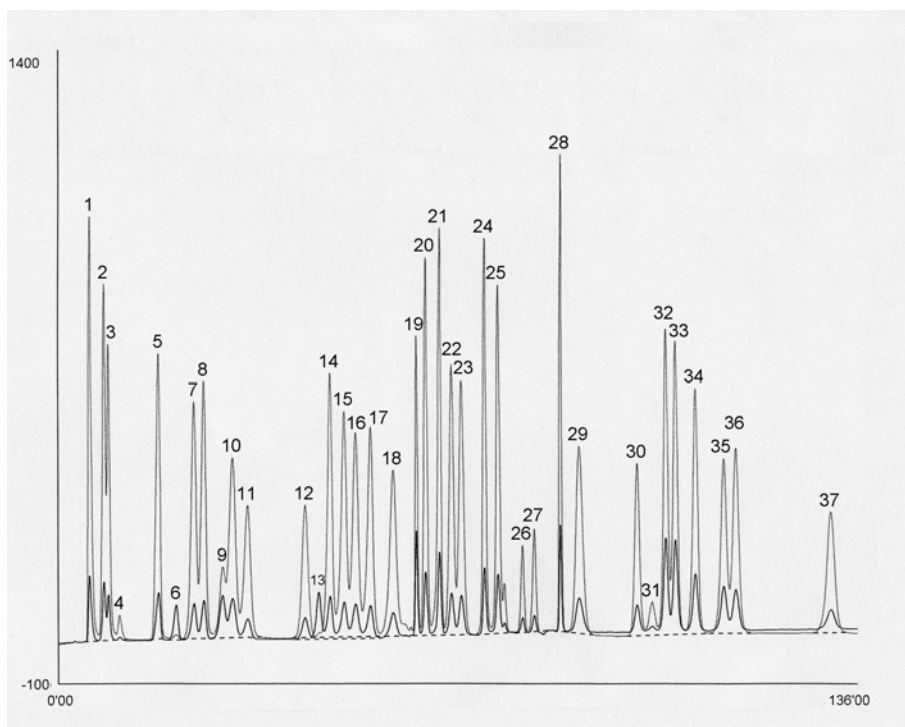
Instrument: INGOS AAA400, packing of column: OSTION Lg ANB, column height: 35 x 0.37 cm, buffers: 1: pH 2.7, 0.2 M Na⁺; 2: pH 4.25, 0.5 M Na⁺; 3: pH 6.9, 1.12 M Na⁺; 4: 0.2 M NaOH.

Program

Time (min)	Temperature (°C)	Buffers
0.00	50.00	1
1.00	50.00	1
29.00	50.00	2
44.00	60.00	3
63.00	74.00	3
66.00	74.00	4
71.00	74.00	1
77.00	60.00	1
82.00	53.00	1
87.00	50.00	1
101.00	50.00	1

Figure 2

Determination of the free amino acids



2. ábra: A szabad aminosavak meghatározása

The standard contains 25 nmol of each component except for ammonia. Operating parameters are given below (*Amino acid analyser AAA 400*, 2002). The amino acids and the ninhydrin positive compounds in order of appearance on the chromatogram are: 1. cysteic acid, 2. taurine, 3. phosphoserine, 4. urea, 5. aspartic acid, 6. hydroxyproline, 7. threonine, 8. serine, 9. asparagine, 10. glutamic acid, 11. glutamine, 12. α -aminoadipic acid, 13. proline, 14. glycine, 15. alanine, 16. citrulline, 17. α -aminobutyric acid, 18. valine, 19. cystine, 20. methionine, 21. cystathione, 22. isoleucine, 23. leucine, 24. tyrosine, 25. phenylalanine, 26. β -alanine, 27. β -aminoisobutyric acid, 28. γ -aminobutyric acid, 29. chlorophenylalanine, 30. ethanolamine, 31. ammonia, 32. ornithine, 33. lysine, 34. histidine, 35. 1-methylhistidine, 36. 3-methylhistidine, 37. arginine.

Instrument: INGOS AAA400, packing of column: OSTION Lg FA, column height: 20-22 x 0.37cm, buffers: 1: pH 2.8, 0.18 M Li⁺; 2: pH 3.1, 0.20 M Li⁺; 3: pH 3.35, 0.35 M Li⁺; 4: pH 4.05, 0.33 M Li⁺; 5: pH 4.65, 1.20 M Li⁺; 6: 0.3 M LiOH.

Program

Time (min)	Temperature (°C)	Buffer
0.00	38.00	2
33.00	38.00	3
45.00	70.00	3
50.00	70.00	4
63.00	70.00	5
95.00	74.00	5
120.00	74.00	6
136.00	53.00	5
139.00	74.00	1
144.00	38.00	1
160.00	38.00	1

Recent developments in the chromatographic separation

Sample preparation and postcolumn derivatization

For separation of the amino acids after deproteinization or hydrolysis of the sample the column chromatography proved to be the best method. It means high performance liquid chromatography (HPLC) consisting ion exchange column chromatography (IEC) and reversed phase chromatography (RPC) with post- or precolumn derivatization of the amino acids, and gas liquid chromatography (GLC). During IEC the amino acids are separated by sulphonated polystyrene cation exchange resin, mixed with derivatization agent (mainly ninhydrin), passed through a coil and a detector and depending on derivatization agent spectrophotometer or fluorometer. During the last two decades the analysis time of IEC was reduced by improvement of the ion exchange resins. The shorter analysis time has been achieved by the use of complex buffer and column temperature systems. During the short time analysis the resolution of the peaks sometimes was not sufficient, and very expensive instruments, ready to use buffers and ninhydrin produced by the manufacturers, had to be used. The detection of the amino acids was mainly based on ninhydrin system but instead of methylcellosolve sulfolane was used as solvent agent of the reduced ninhydrin. This solution buffered with lithium acetate not so toxic, and the stability, the signal to noise ratio, the resolution of the peaks and the baseline is also better than at normal ninhydrin. This reagent does not form

precipitates and blockages in the flow lines and in the reaction column, but it is three times as expensive as the normal ninhydrin solution. Other derivatization reagents (fluorescamine, dansylchloride, 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole and o-phthalaldehyde) were introduced to improve the sensitivity and the accuracy of the method, but many problems, particularly considering derivatization of proline and hydroxiprolin had to be solved. From these reagents only the OPA/mercaptoethanol and the OPA/3-mercaptopropionic acid could be used widely for postcolumn derivatization of the amino acids.

Separation of the free amino acid composition of the biological fluids by lithium buffer system

In the past 25 years, reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) has been pervading as a preferred method for the amino acid analysis of protein hydrolysates, but not used widely for physiological samples, because they are so complex that application of RP-HPLC has resulted in poor peak resolution *Teik et al.* (1991). Analysis of physiological amino acids is traditionally carried out by ion-exchange chromatography (IEC) followed by post-column ninhydrin or o-phthalaldehyde derivatization. Recently with the advances in instrumental design a new generation of amino acid analysers using IE emerged. This system offers the advantage of ease of operation and highly adaptable for analyses of substances than amino acids. *Teik et al.* (1991) in their study described the preparation of lithium citrate buffers and their application in physiological amino acid analysis. Quantitative analysis of results obtained for physiological amino acids was examined in terms of accuracy and precision. The composition of the laboratory-prepared lithium citrate buffers used in obtaining a satisfactory separation of amino acids was the following: lithium *Eluent 1* contained lithium ion 0.24 N, pH 2.75; the lithium *Eluent 2* contained lithium ion 0.34 N, pH 3.60, and the lithium regenerant encompassed lithium ion 0.3 N with 0.002 N of EDTA. A complete analysis of the 44 components in the standard took about 120 min in each case, a somewhat shorter time than reported in the literature for other systems. With these conditions most amino acids were satisfactorily resolved, the exceptions were Trp and HyLys; 1-MeHis and His; and 3-MeHis and Ans. The system reported provided equivalent analytical strengths but also has the advantage of cost saving based on component equipment and laboratory-prepared buffers.

Grunau and Swiader (1992) adapted a high-performance liquid chromatographic system to the high-resolution determination of free amino acids. The lithium-based eluent gradients used to allow good separations to be achieved isothermally in 2 h. Although the overall elution pattern correlates strongly with those established automated methods, the differences can be large, and are numerous enough that one type of system cannot serve as a predictor for the other. Relative retention times in the Pickering system were determined for 99 ninhydrin-positive compounds: imino acids, ureides, amino sugars, amino acids and derivatives, with emphasis on those occurring in plants.

Several methods are suitable for the determination of amino acids (AAS) in biological fluids, including gas chromatography, reversed-phase chromatography with pre-column derivatization with various reagents such as orthophthalaldehyde (OPA), 9-fluorenylmethyl-chloroformate, phenylisothiocyanate (PITC), dimethylamino-naphthalenesulfonyl chloride, dimethylaminoazobenzene sulfonylchloride, 4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole and ion-exchange chromatography with post-column derivatization utilizing OPA or ninhydrin (*Le Boucher et al.*, 1997). The latter remains the most widely used because of several technical and practical advantages. The classic

ion-exchange separation followed by post-column derivatization with ninhydrin has been considerably improved since its initial inception particularly with availability of modern dedicated AA analyzers. However one remaining problem is the relative instability of the ninhydrin reagent, limiting the use of the ninhydrin/acetate buffer mixture to approximately 2 weeks. Probably it also explains why within-run precisions are so poor for an automated technique.

Separation of the amino acids by anion-exchange chromatography

Non-derivatized amino acids and sugars can be separated and detected simultaneously using anion-exchange chromatography in combination with integrated pulsed amperometric detection (IPAD). The simultaneous separation and detection is advantageous for samples containing approximately equimolar levels of amino acids and sugars (Jandik *et al.*, 2001). If amino acids are to be analyzed in samples containing much higher concentrations of sugars, anion-exchange/IPAD analysis must be preceded by a sugar-eliminating step. Since both classes of compounds interact with cation and anion exchangers, a combination of the two chromatographic materials appears to be a logical choice for such sample preparation. Therefore Jandik *et al.* (2001) described a new, automated chromatographic procedure eliminating carbohydrates from amino acid samples prior to their analysis by anion-exchange chromatography and integrated amperometric detection. In the first step, a sample was brought onto a short cation-exchange column (trap column) in hydrogen form. Carbohydrates were passing through this column while only amino acids were retained. Subsequently the cation-exchange column, holding the amino acid fraction, was switched in-line with the gradient pump and separator column. The mobile phase used at the beginning of the separation (NaOH; pH 12.7) transferred amino acids from the trap column onto the anion-exchange column and the amino acid separation was completed without any interference by carbohydrates. All common amino acids were recovered following the carbohydrate removal step. The average value of their recovery was 88.1%. The calibration plots were tested between 12.5 and 500 pmol. The mean value of correlation coefficients of calibration plots was calculated as 0.99. The value of relative standard deviations from five replicates was 3.9%.

Ding *et al.* (2003) introduced a new off-line sample preparation that eliminates carbohydrates from amino acid samples containing a high carbohydrate content before analysis by anion-exchange chromatography and integrated amperometric detection. First the sample was introduced into a cation-exchange column in the hydrogen form. Carbohydrates were removed completely using 0.22% formic acid as a transfer fluid, while only amino acids were retained. Amino acids were then extracted from the cation-exchange resin by 10 cm³ of 1 M ammonia. The collected ammonia was evaporated to dryness and residue redissolved in water containing 20 mg/dm³ NaN₃ for injection. All amino acids were recovered following the carbohydrate removal step. The average recovery was 97.2%. The relative standard deviation for seven replicates was less than 5.2%.

Hanko *et al.* (2004) used anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection for separation and direct detection of amino acids, carbohydrates, alditols and glycols in the same injection without pre- or post-column derivatization. These separations use a combination of NaOH and NaOH/sodium acetate eluents. They previously published the successful use of this technique, to determine free amino acids in cell and fermentation broth media. They showed that retention of carbohydrates varies with eluent NaOH concentration differently than amino acids, and thus separations can be optimized by varying the initial NaOH concentration and its duration. Unfortunately some amino acids eluting in the acetate gradient portion of the

method were not completely resolved from system-related peaks and from unknown peaks in complex cell culture and fermentation media. They presented changes in method that improve amino acid resolution and system ruggedness.

Comparison of IEC with HPLC at amino acid analysis of physiological fluids

Davey and Ersser (1990) compared the high performance liquid chromatography with phenylisothiocyanate derivatization and a conventional ion-exchange method for determination of free amino acid content of physiological fluids. The correlation coefficient for all the amino acids tested was greater than 0.9 except for proline and tryptophan. Various forms of sample preparation were tried for plasma and amniotic fluid; it was finally decided that protein precipitation with acetonitrile was the most suitable. Ultrafiltration was finally decided that protein precipitation while urine was treated the same as a standard mixture. During the ion-exchange chromatography of free amino acids in physiological fluids sulphosalicylic acid was used for protein precipitation and norleucine was the internal standard. Amino acids were separated on a heated (42-56°C) column (350 mm x 3 mm, cation-exchanges resin, 7 µm, 8% DVB) in the Li⁺ form using a pH gradient of 2.8-11.5. Post-column reaction was by heating (95°C) with strongly buffered (pH 6) reduced ninhydrin and the derivatives were detected at 570 and 440 nm. The imprecision compared favourably with standard ion-exchange method although each had specific amino acids for which the imprecision was poor. They reported that the HPLC technique is suitable for the same routine clinical analysis purposes as high-resolution ion-exchange chromatography. It also offers the advantages of speed of analysis, sensitivity and equipment versatility over the conventional ion-exchange methods.

By the opinion of Sarwar and Botting (1993) the IEC is still the main method in use. Its use is, however, being replaced by the faster high-performance liquid chromatographic (HPLC) methods of derivatized amino acids. The intra-laboratory variation of the HPLC method was found to be similar to that of IEC. When similar hydrolytic conditions were used in preparing protein hydrolysates, amino acid results obtained with the PITC derivatization method were generally in close agreement with those obtained IEC. There is, however, room for improvement in the HPLC analysis of amino acids in physiological samples.

Schwarz *et al.* (2004) tested whether plasma amino acids can be analyzed using reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC). The reference method for amino acid analysis is ion-exchange chromatography (IEC) with ninhydrin detection because of its ability to resolve in one analysis all clinically important amino acids, its precision and minimal sample preparation. The HPLC method evaluated correlated well with IEC ($0.89 \leq r \leq 1.00$) with linearity up to 2500 µmol/dm³. The between and within-run CV_s were <6.0%. In addition, this method is able to separate argininosuccinic acid, homocystine and allo-isoleucine, rare but clinically significant amino acids. This HPLC method was comparable to IEC and could represent an alternative for amino acid analysis. The advantages of this method are its ability to separate all amino acids present in plasma in a short time, although two injections per sample are required, and the wide analytic measurement range obtained using a photodiode array detector. The only disadvantages of this method are the column washes needed to maintain column integrity and the fact that it requires two injections per sample in order to achieve separation of all amino acids. This method, however, represents an alternative to ion-exchange chromatography for analysis of amino acids in plasma.

Determination of the tryptophan

Hanko and Rohrer (2002) presented a new method to rapidly quantify tryptophan (Trp) in proteins, animal feed (Mehaden fishmeal), cell cultures, and fermentation broths. Trp is separated from common amino acids by anion-exchange chromatography in 12 min and directly detected by integrated pulsed amperometry. The estimated lower detection limit for this method is 1 pmol. Alkaline (4 M NaOH) hydrolysates can be directly injected, and therefore we used this method to determine the optimum alkaline hydrolysis conditions for the release of Trp from a model protein, bovine serum albumin (BSA). This method accurately determined the Trp content of BSA and fishmeal. High levels of glucose (2% w/w) do not interfere with the chromatography or decrease recovery of Trp. They used this method to monitor free Trp during an *Escherichia coli* fermentation.

Ravindran and Bryden (2005) developed a chromatographic method for the determination of tryptophan content in food and feed proteins. The method involves separation and quantitation of tryptophan (released from protein by alkaline hydrolysis with NaOH) by isocratic ion-exchange chromatography with o-phthalaldehyde derivatization followed by fluorescence detection. In this procedure chromatographic separation of the tryptophan and α -methyl tryptophan, the internal standard, complete in 15 min, without any interference from other compounds. The precision of the method was 1–4% relative standard deviation. Accuracy was validated by agreement with the value for chicken egg white lysozyme, a sequenced protein, and by quantitative recoveries after spiking with lysozyme. The method allows determination in a range of feed proteins, containing varied concentrations of tryptophan and is applicable to systems used for routine amino acid analysis by ion-exchange chromatography.

DETECTION SYSTEMS

The colour or fluorescence produced of amino acids varies for different amino acids and it have to be determined for quantification. It can be made by loading a mixture of amino acids containing the same concentration of each amino acid (including the chosen internal standard) and from the areas of the peaks on the recorder trace calculating each response factor in the used way *Williams and Cockburn* (1988). Sometimes an internal standard, absent from the sample, is used for every analysis carried out. For instance the non-physiological amino acids norleucine or α -amino- β -guanidinobutyric acid may be used. This should be added in a known amount to the sample prior to any sample pre-treatment. If the amount of the internal standard is known, the concentration of the unknown amino acids can be determined using peak area relationship. This paper does not deal with the reaction of the amino acids with ninhydrin, preparation of the ninhydrin reagent and the reaction of the amino acids with other reagents.

CONTROLLING OF THE APPARATUS AND EVALUATION OF THE CHROMATOGRAMS

At most of the modern amino acid analysers a software serving helps for controlling the apparatus and subsequent assessment of the results *Amino acid analyser AAA 400*, 2002. The evaluation of the results can be done manually or automatically. On a good chromatogram amino acids with the exception of tryptophan give almost symmetrical peaks. For quantitative evaluation the curve with the highest absorption values is used, in most cases the 570 nm curve. Proline and hydroxiprolin give their highest absorption at

440 nm, for this reason the suggested evaluation of these two peaks is at 440 nm if it is possible. When two amino acids are not completely separated, an error is introduced. If the separation is better than 65% of the peak height, it is possible to assume that the two peaks are symmetrical and to calculate the width of the peak at a height where the influence of the neighbouring peak is negligible.

During the manual peak evaluation the baseline, total height, net height, half height and the width of the peak at the half height have to be determined, and from these data the basic area of the peak can be calculated by multiplying the net height with the width. This value represents the area under the peak, which is linear in function to the concentration of the amino acids. If the area is known for a given amount of an amino acid the amount corresponding to any peak size can be determined. If computer program is used for determination of the quantity of amino acids, the peak parameters can be edited directly in the graph or in the peak table. In the graph you can also edit the baseline and the integration marks of the peaks.

REFERENCES

- Amino acids in animal nutrition. A compendium of recent reviews and reports (2002). Szerk.: Bologna U. L., Degussa 1-558.
- Amino acid analyser AAA 400. (2002). User manual INGOS.
- Amino acid analysis Handbook and application (1982). LKB Biochrom.
- Andersen, T.T. (1994). Practical amino acid analysis. ABRF News, 1-5.
- Ashworth, R.B. (1987). J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70. 248-252.
- Belitz, H.D. Grosch, W. (1999). Food chemistry .Springer, 1-992.
- Le Boucher, J., Charret, C., Coudray-Lucas, C., Giboudeau, J., Cynober, L., (1997). Amino acid determination in biological fluids by antired ion-exchange chromatography: performance of Hitachi L-8500A. Clinica Chimica Acta 257. 1421-1428.
- Cooper, C., Packer, N., Williams, K. (2001). Amino acids protocols. Humana Press, 1-265.
- Davey, J.F., Ersser, R.S. (1990). J. Chromatography, 528. 9-23.
- Davies, R.L., Bagient, D.R., M.S. Levitt, M.S., Mollah, Y., Rayner, C.J., Frensham, A.B. (1992). J. Sci. Food Agric., 59. 423-436.
- Ding, Y., Yu, H., Mou, S. (2003). J. Chromatography, 997. 155-160.
- Friedman, M. (1975). Protein nutrition quality of foods and feeds. Assay methods-biological, biochemical and chemical. Marcel Dekker 1-626.
- Grunau, J.A., Swiader, M. (1992). J. Chromatography, 594. 136-171.
- Hanko, V.P., Heckenberg, A., Rohrer, J.S. (2004). J. Biomolecular Techniques 15. 317-324.
- Hanko, V.P., Rohrer, J.S. (2002). Analytical Biochemistry, 308. 204-209.
- Holm, D.J., Peck, H. (1998). Analytical Biochemistry. Longman 91-168.
- Jandik, P., Cheng, J., Jensen, D., Manz, S., Avdalovic, N. (2001). J. Chromatography, 758. 189-196.
- Moore, S., Stein, W.H. (1951). Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. J. Biol. Chem., 192. 663-681.
- Moore, S., Stein, W.H. (1963). Chromatographic determination on amino acids by the use of automatic recording equipment. Methods Enzymol. 6. 819-831.
- Feed evaluation. Principles and practice. Szerk.: Moughan, P.J., Verstegen, M.W.A., Visser-Reyneveld, M.I. (2000). Wageningen Pers. 1-290.

- Parvy, P., Bardet, J., Rabier, D., Gasquet, M., Kamoun, P. (1993). Clin. Chem., 39. 1831-1836.
- Pickering, M.V. (1981). U.S. Patent 4. 274. 833.
- Pickering, M.V. (1989). Ion-exchange chromatography of free amino acids. LC-GC 6 484-490.
- Ravindran, G., Bryden, W.L. (2005). Food Chemistry ,89. 309-314.
- Sarwar, G., Botting, H.G. (1993). J. Chromatography. 544. 9-23.
- Schwarz, E.L., Roberts, W.L., Pasquali, M. (2004). Clinica Chimica Acta, 343. 204-209.
- Teik, Ng.L., Wong, Y.D., Francis, T., Andersen, G.H. (1991). Nutr. Biochem. 2. 671-697.
- Walker, J.M. (2002). The protein protocols Handbook. Humana Press, 1-1146.
- Williams, A.P., Cockburn, J.E. (1988). Chromatography and Analysis, 1. 9-11.

Corresponding author (*levelezési cím*):

János Csapó

University of Kaposvár, Faculty of Animal Science
H-7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40.
Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar
7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40.
Tel.: +36-82-314 155, fax: +36-82-321 251
e-mail: csapo@mail.atk.u-kaposvar.hu



Use of dried microalgal biomasses to stimulate acid production and growth of *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium* in milk

B. Gyenis, J. Szigeti, N. Molnár, L. Varga

Institute of Food Science, Faculty of Agricultural and Food Sciences, University of West Hungary
Mosonmagyaróvár, H-9200 Lucsony u. 15-17.

ABSTRACT

Microalgae have been commercially cultured for nearly four decades with the main species grown being Chlorella and Spirulina. The effect of dried Spirulina platensis and Chlorella vulgaris biomasses, added at a concentration of 3 g/dm³, on acid production and growth of Lactobacillus plantarum and Enterococcus faecium strains used for feed fermentation purposes was evaluated in milks with total solids contents ranging from 12% to 30%. Our results showed that acid development by and growth rate of L. plantarum and E. faecium were stimulated significantly ($P < 0.05$) by S. platensis and C. vulgaris, respectively, in all culture media formulations tested. In conclusion, the powdered Chlorella and Spirulina biomasses rich in biologically active compounds are potentially suitable for use in cost-effective production of novel, milk-based fermented feeds.

(Keywords: *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, milk)

ÖSSZEFOGLALÁS

***Lactobacillus plantarum* és *Enterococcus faecium* savtermelésének valamint szaporodásának serkentése tejben, szárított mikroalga biomasszák felhasználásával**

Gyenis B., Szigeti J., Molnár N., Varga L.

Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Élelmiszer-tudományi Intézet
Mosonmagyaróvár, 9200 Lucsony u. 15-17.

A mikroalgák (elsősorban a Chlorella és Spirulina fajok) kereskedelmi célú termesztése közel négy évtizedes múltra tekint vissza. Kísérleteink során szárított, 3 g/dm³ koncentrációban alkalmazott Spirulina platensis, ill. Chlorella vulgaris biomasszáinak takarmányfermentálásra használt Lactobacillus plantarum és Enterococcus faecium törzsek szaporodására és savtermelésére gyakorolt hatását teszteltük 12-30% szárazanyag-tartalmú modell tej-tápközegekben. A kapott eredmények azt mutatták, hogy a S. platensis, ill. a C. vulgaris szárított biomasszájának adagolása szignifikánsan ($P < 0,05$) serkentette a L. plantarum és az E. faecium szaporodási sebességét, továbbá savtermelő aktivitását, az összes alkalmazott tápközegekben. Megállapítható, hogy a bioaktív komponensekben gazdag, szárított Chlorella ill. Spirulina biomassza potenciálisan alkalmas új típusú, tejalapú fermentált takarmányok gazdaságos előállítására.

(Kulcsszavak: *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, tej)

INTRODUCTION

Microalgae are photosynthetic microorganisms that can be used to produce high value compounds (Kreitlow et al., 1999). Spray-dried microalgal biomasses typically contain 3% to 7% moisture, 46% to 63% protein, 8% to 17% carbohydrates, 4% to 22% lipids, 2% to 4% nucleic acid, 7% to 10% ash, and a wide range of vitamins and other biologically active substances. Microalgae have been commercially produced for approximately 40 years now with the main species grown being *Chlorella* and *Spirulina* for health food (Borowitzka, 1999). *Chlorella vulgaris* is a green algal species that produces astaxanthin, canthaxanthin and, in minor amounts, β -carotene and lutein (Mendes et al., 2003). *Spirulina platensis* is a planktonic cyanobacterium belonging to prokaryotic algae. It produces γ -linolenic acid in large amounts (Cohen, 1997).

Particular microorganisms such as *Lactobacillus plantarum* or *Enterococcus faecium* have been increasingly used as probiotics in animal nutrition for more than 15 years, and have been strictly regulated since 1993 (Vescovo et al., 1993; McAllister et al., 1998; Becquet, 2003). *Lactobacillus plantarum* is a Gram-positive, non-motile, non-sporeforming bacterium. Its cells are straight rods with rounded ends, occurring singly, in pairs or in short chains. *Lactobacillus plantarum* is a widely distributed species in most fermented products of animal and plant origin, where it is either used in controlled fermentation or is derived from the environment (Corsetti & Gobbetti, 2003). As for *E. faecium*, it is a Gram-positive, catalase-negative, coccus-shaped bacterium, characterized by its capability to grow at 10°C and 45°C, in 6.5% NaCl at pH 9.6 and its ability to survive heating at 60°C for 30 min. Thus, it is among the most thermotolerant species of non-sporeforming bacteria. *Enterococcus faecium* is significant in dairy manufacturing by having both beneficial and detrimental effects in products. Beneficial effects include desirable flavor enhancement, bacteriocin production, and probiotic impact, whereas detrimental effects include product spoilage (Flint, 2003).

Varga et al. (1999) reported that a cyanobacterial biomass significantly stimulated ($P < 0.05$) growth and acid production of thermophilic dairy starter bacteria, therefore, it proved to be suitable for cost-effective manufacture of novel functional fermented dairy foods. The aim of this work was to test the capability of *Spirulina* and *Chlorella* microalgal biomasses, in milks with various total solids contents, to stimulate selected lactobacilli and enterococci used for feed fermentation purposes.

MATERIALS AND METHODS

Reconstituted skim milks with total solids contents ranging from 12% to 30% were used as raw material, which were heated to 90°C and held for 10 min before being cooled to inoculation temperature.

The *L. plantarum* and *E. faecium* freeze-dried starter cultures were kindly supplied by the Department of Animal Nutrition, University of West Hungary (Mosonmagyaróvár, Hungary). Before the start of the trials, the strains were subcultured twice at 30°C for 24 h in De Man–Rogosa–Sharpe (MRS) broth and MRS agar (*L. plantarum*) and at 37°C for 24 h in Casein-peptone Soymeal-peptone (CASO) broth and Citrate Azide Tween[®] Carbonate (CATC) agar (*E. faecium*). All these culture media were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

The *S. platensis* and *C. vulgaris* biomasses were obtained from the Institute of Cereal Processing (Bergholz-Rehbrücke, Germany). Previous work (Springer et al.,

1998) indicated that 3 g/dm³ of microalgal biomass was optimal in regards to sensory properties and cost.

The heat-treated and cooled microalgae-supplemented and control milks were inoculated with *L. plantarum* or *E. faecium* at the rate of 1%, corresponding to approximately 6.5×10⁶ cfu/cm³ of milk, and were then incubated at 30°C or 37°C, respectively.

The pH value of three replicate samples from each treatment at each sampling time was measured with an HI 8521 pH-meter and combined glass electrode (Hanna Instruments, Karlsruhe, Germany).

Viable cell counts were determined by using the standard pour-plate technique. MRS agar was employed for enumeration of *L. plantarum*. The plates were incubated at 30°C for 24 to 48 h. CATC agar was used to enumerate *E. faecium*. The inoculated plates were incubated at 37°C for 24 h. The entire experimental program was repeated twice.

The influence of microalgal biomasses on acid production and growth of *L. plantarum* and *E. faecium* during the fermentation process was analyzed with the Student's *t*-test, by means of the STATISTICA data analysis software system, version 6.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Significance of difference was set at *P*<0.05 in all cases.

RESULTS AND DISCUSSION

Tables 1 to 3 show the results obtained.

Table 1

Effect of 3 g/dm³ *Chlorella vulgaris* biomass on acid production¹ of *Enterococcus faecium* in milks with total solids contents ranging between 12% and 30%

Time h (1)	Milk with							
	12% total solids (2)		18% total solids (3)		24% total solids (4)		30% total solids (5)	
	Control (6)	<i>Chlorella</i> (7)	Control (6)	<i>Chlorella</i> (7)	Control (6)	<i>Chlorella</i> (7)	Control (6)	<i>Chlorella</i> (7)
0	6.31±0.07 ^a	6.31±0.08 ^a	6.33±0.06 ^a	6.33±0.05 ^a	6.34±0.07 ^a	6.34±0.09 ^a	6.31±0.08 ^a	6.31±0.06 ^a
10	6.13±0.08 ^a	5.64±0.12 ^b	6.06±0.09 ^a	5.20±0.07 ^b	5.95±0.06 ^a	5.15±0.12 ^b	5.84±0.06 ^a	5.23±0.08 ^b
12	5.76±0.07 ^a	5.37±0.10 ^b	5.80±0.08 ^a	4.92±0.09 ^b	5.83±0.09 ^a	4.91±0.11 ^b	5.64±0.07 ^a	4.89±0.06 ^b
14	5.40±0.09 ^a	5.04±0.08 ^b	5.42±0.08 ^a	4.55±0.11 ^b	5.70±0.08 ^a	4.50±0.08 ^b	5.43±0.09 ^a	4.55±0.06 ^b
17	5.32±0.06 ^a	4.44±0.08 ^b	5.36±0.06 ^a	4.48±0.05 ^b	5.41±0.07 ^a	4.19±0.07 ^b	5.39±0.09 ^a	4.52±0.06 ^b
20	5.13±0.07 ^a	4.10±0.07 ^b	5.14±0.08 ^a	4.16±0.07 ^b	5.14±0.06 ^a	4.07±0.09 ^b	5.21±0.10 ^a	4.51±0.09 ^b
22	5.07±0.05 ^a	4.04±0.06 ^b	5.08±0.05 ^a	4.06±0.10 ^b	5.06±0.08 ^a	3.92±0.06 ^b	5.15±0.06 ^a	4.49±0.10 ^b

¹Values are pH means±SD based on 6 observations: 3 samples, 2 replicates. (¹Az adatok 6 mérés – 3 párhuzamos×2 ismétlés – pH-átlagát±szórását jelölik.); ^{a,b}Values bearing different superscript letters within a row in the same total solids subcolumns differ significantly. (^{a,b}Az azonos szárazanyag-tartalmat jelző oszlopok ugyanazon soraiban szereplő eltérő betűk szignifikáns különbséget jeleznek.) (*P*<0.05)

1. táblázat: 3 g/dm³ *Chlorella vulgaris* biomassza hatása *Enterococcus faecium* savtermelésére¹ 12-30% szárazanyag-tartalmú tej-tápközegekben

Idő, óra(1), 12% szárazanyag-tartalmú tej(2), 18% szárazanyag-tartalmú tej(3), 24% szárazanyag-tartalmú tej(4), 30% szárazanyag-tartalmú tej(5), Kontroll(6), Chlorellával kiegészített(7)

Table 2

Effect of 3 g/dm³ *Spirulina platensis* biomass on acid production¹ of *Lactobacillus plantarum* in milks with total solids contents ranging between 12% and 30%

Time h (1)	Milk with							
	12% total solids (2)		18% total solids (3)		24% total solids (4)		30% total solids (5)	
	Control (6)	<i>Spirulina</i> (7)	Control (6)	<i>Spirulina</i> (7)	Control (6)	<i>Spirulina</i> (7)	Control (6)	<i>Spirulina</i> (7)
0	6.45±0.06 ^a	6.48±0.05 ^a	6.47±0.06 ^a	6.47±0.06 ^a	6.45±0.08 ^a	6.47±0.07 ^a	6.47±0.06 ^a	6.47±0.05 ^a
10	5.92±0.05 ^a	5.37±0.07 ^b	5.93±0.06 ^a	5.54±0.09 ^b	5.94±0.07 ^a	5.55±0.11 ^b	5.95±0.06 ^a	5.74±0.05 ^b
12	5.73±0.06 ^a	5.09±0.09 ^b	5.76±0.07 ^a	5.32±0.10 ^b	5.75±0.06 ^a	5.31±0.10 ^b	5.83±0.05 ^a	5.55±0.09 ^b
14	5.55±0.08 ^a	4.95±0.06 ^b	5.60±0.08 ^a	5.17±0.11 ^b	5.61±0.09 ^a	5.16±0.12 ^b	5.70±0.08 ^a	5.41±0.06 ^b
17	5.40±0.10 ^a	4.81±0.05 ^b	5.38±0.06 ^a	5.00±0.07 ^b	5.47±0.06 ^a	5.02±0.12 ^b	5.50±0.05 ^a	5.23±0.06 ^b
20	5.24±0.11 ^a	4.71±0.08 ^b	5.29±0.05 ^a	4.93±0.08 ^b	5.34±0.09 ^a	4.94±0.08 ^b	5.42±0.07 ^a	5.15±0.05 ^b
22	5.15±0.06 ^a	4.62±0.10 ^b	5.20±0.07 ^a	4.85±0.06 ^b	5.29±0.08 ^a	4.86±0.09 ^b	5.34±0.05 ^a	5.10±0.06 ^b

^{1, a, b}See Table 1 (lásd 1. táblázat)

2. táblázat: 3 g/dm³ *Spirulina platensis* biomassza hatása *Lactobacillus plantarum* savtermelésére¹ 12-30% szárazanyag-tartalmú tej-tápközegekben

(1-6) Lásd 1. táblázat, Spirulinával kiegészített(7)

Table 3

Effect of 3 g/dm³ *Chlorella vulgaris* biomass on growth¹ of *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium* in milk with 12% total solids content

Time, h (1)	Control (2)	<i>Chlorella</i> -enriched (3)	Control (4)	<i>Chlorella</i> -enriched (5)
	milk inoculated with			
	<i>Lactobacillus plantarum</i>		<i>Enterococcus faecium</i>	
0	6.78±0.12 ^a	6.88±0.08 ^a	6.83±0.10 ^a	6.93±0.09 ^a
8	8.18±0.09 ^b	8.52±0.07 ^a	8.26±0.09 ^b	8.66±0.08 ^a
12	8.31±0.10 ^b	8.92±0.09 ^a	8.41±0.11 ^b	8.96±0.06 ^a
22	8.61±0.10 ^b	8.98±0.08 ^a	8.72±0.10 ^b	9.08±0.07 ^a

¹Values are log cfu/cm³ means±SD, based on 6 observations: 3 samples, 2 replicates. (¹Az adatok 6 vizsgálat – 3 párhuzamos×2 ismétlés – log cfu/cm³-átlagát±szórását jelölik.);

^{a, b}Values bearing different superscript letters within a row in the same bacterial subcolumns differ significantly. (^{a, b}Az azonos baktériumfajt jelző oszlopok ugyanazon soraiban szereplő eltérő betűk szignifikáns különbséget jeleznek.) (P<0.05)

3. táblázat: 3 g/dm³ *Chlorella vulgaris* biomassza hatása *Lactobacillus plantarum* és *Enterococcus faecium* szaporodására¹ 12% szárazanyag-tartalmú tej-tápközegben

Idő, óra(1), *Lactobacillus plantarum*mal beoltott kontroll-tej(2), *Lactobacillus plantarum*mal beoltott *Chlorella*-tartalmú tej(3), *Enterococcus faecium*mal beoltott kontroll-tej(4), *Enterococcus faecium*mal beoltott *Chlorella*-tartalmú tej(5)

As can be seen, acid production and growth of *E. faecium* and *L. plantarum* were stimulated significantly ($P<0.05$) by *C. vulgaris* and *S. platensis*, respectively, in all culture media formulations used. Our findings are consistent with those of Varga *et al.* (1999), who demonstrated that acid production and growth rate of thermophilic dairy starter cultures, such as *Streptococcus thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, and *Bifidobacterium bifidum*, could be stimulated significantly ($P<0.05$) by a *S. platensis* biomass. In accordance with previous reports by various authors (Shirota *et al.*, 1964; Stengel, 1970; Zielke *et al.*, 1978; Kurita *et al.*, 1979; Webb, 1982), the substances responsible for the stimulatory properties of this cyanobacterial biomass were identified as adenine, hypoxanthine, and free amino acids (Varga *et al.*, 1999).

Considerable work on acid production of *Enterococcus* species in milk has been reported. In general, enterococci exhibit low milk acidifying ability (Giraffa, 2003). Recent investigations on enterococci of dairy origin confirmed the poor acidifying capacity of these microorganisms in milk with only a small percentage of the strains showing a pH below 5.0 to 5.2 after 16 to 24 h of incubation at 37°C (Andrighetto *et al.*, 2001; Durlu-Ozkaya *et al.*, 2001; Sarantinopoulos *et al.*, 2001). It was also demonstrated that *E. faecalis* is generally a stronger acidifier than *E. faecium*. A high acidifying potential in skim milk with a pH lowering to approximately 4.5 after 24 h of fermentation was observed for *E. faecalis* strains isolated from an Italian artisanal cheese (Giraffa *et al.*, 1993; Suzzi *et al.*, 2000). The specific enterococcal strain used in our trial showed good acidification properties by lowering the pH of control milks to between 5.06 and 5.15 after 22 h of fermentation at 37°C (Table 1). The acidity levels of 3.92 to 4.49 reached by the same *E. faecium* strain in *Chlorella*-supplemented milks under identical conditions were even lower than the value of 4.5 reported by Giraffa *et al.* (1993) and Suzzi *et al.* (2000) for the strong acidifier *E. faecalis*.

Lactobacillus plantarum proved to be a slightly poorer acidifier than *E. faecium* because the pH value of products ranged from 5.15 to 5.34 and from 4.62 to 5.10 in control and *Spirulina*-enriched samples, respectively, after 22 h of fermentation at 30°C. However, similar to what was experienced with *E. faecium*, the addition of microalgal biomass had a significant stimulatory effect ($P<0.05$) on *L. plantarum* throughout the entire fermentation process (Table 2).

CONCLUSIONS

The stimulatory properties of microalgal biomasses on acid production and growth of *L. plantarum* and *E. faecium* are of practical importance because, thus, shorter time is needed for the manufacture of the same amount of fermented feed and, consequently, productivity will improve. In addition, a rapid rate of acid production also prevents the growth of undesirable microorganisms. Therefore, *Chlorella* and *Spirulina* biomasses rich in bioactive compounds are potentially suitable for use in cost-effective production of novel, milk-based fermented feeds.

ACKNOWLEDGMENT

Author L. Varga is grateful to the Hungarian Academy of Sciences for the award of a János Bolyai Research Scholarship.

REFERENCES

- Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J., Dellaglio, F. (2001). Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *J. Dairy Res.*, 68. 303–316.
- Becquet, P. (2003). EU assessment of enterococci as feed additives. *Int. J. Food Microbiol.*, 88. 247–254.
- Borowitzka, M.A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J. Biotechnol.*, 70. 313–321.
- Cohen, Z. (1997). The chemicals of *Spirulina*. In: Vonshak, A. (ed.) *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology*. Taylor and Francis Ltd., London. 175–204.
- Corsetti, A., Gobbetti, M. (2003). *Lactobacillus plantarum*. In: Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F. (eds) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Vol. 3. Academic Press & Elsevier Science, Amsterdam, Boston, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo. 1501–1507.
- Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. (2001). Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *J. Appl. Microbiol.*, 91. 861–870.
- Flint, S. (2003). *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. In: Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F. (eds) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Vol. 2. Academic Press & Elsevier Science, Amsterdam, Boston, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo. 904–907.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.*, 88. 215–222.
- Giraffa, G., Gatti, M., Carminati, D., Neviani, E. (1993). Biochemical and metabolic characteristics of strains belonging to *Enterococcus* genus isolated from dairy products. *Proceedings of the Congress on Biotechnology and Molecular Biology of Lactic Acid Bacteria for the Improvement of Foods and Feeds Quality*, Naples, February 23–24.
- Kreitlow, S., Mundt, S., Lindequist, U. (1999). Cyanobacteria — a potential source of new biologically active substances. *J. Biotechnol.*, 70. 61–63.
- Kurita, H., Tajima, O., Fukimbara, T. (1979). Isolation and identification of nucleosides in *Chlorella* extract. *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 53(4). 131–133.
- McAllister, T.A., Feniuk, R., Mir, Z., Mir, P., Selinger, L.B., Cheng, K.J. (1998). Inoculants for alfalfa silage: effects on aerobic stability, digestibility and the growth performance of feedlot steers. *Livestock Prod. Sci.*, 53. 171–181.
- Mendes, R.L., Nobre, B.P., Cardoso, M.T., Pereira, A.P., Palavra, A.F. (2003). Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorg. Chim. Acta*, 356. 328–334.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. (2001). Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *Int. Dairy J.*, 11. 621–647.
- Shirota, M., Nagamatsu, N., Takechi, Y. (1964). Method for cultivating lactobacilli. U.S. Pat. No. 3,123,538.
- Springer, M., Pulz, O., Szigeti, J., Ördög, V., Varga, L. (1998). Verfahren zur Herstellung von biologisch hochwertigen Sauermilcherzeugnissen. Eur. Pat. No. DE 19,654,614,A1.

- Stengel, E. (1970). Anlagentypen und Verfahren der technischen Algenmassenproduktion. Ber. Dtsch. Bot. Ges., 83. 589–606.
- Suzzi, G., Lombardi, A., Lanorte, M.T., Caruso, M., Andrighetto, C., Gardini, F. (2000). Characterization of autochthonous enterococci isolated from Semicotto Caprino cheese, a traditional cheese produced in Southern Italy. J. Appl. Microbiol., 89. 267–274.
- Varga, L., Szigeti, J., Ördög, V. (1999). Effect of a *Spirulina platensis* biomass and that of its active components on single strains of dairy starter cultures. Milchwissenschaft, 54. 187–190.
- Vescovo, M., Torriani, S., Dellaglio, F., Botazzi, V. (1993). Basic characteristics, ecology and applications of *Lactobacillus plantarum*: a review. Annali di Microbiologia ed Enzimologia, 43. 261–284.
- Webb, L.E. (1982). Detection by Warburg manometry of compounds stimulatory to lactic acid bacteria. J. Dairy Res., 49. 479–486.
- Zielke, H., Kneifel, H., Webb, L.E., Soeder, C.J. (1978). Stimulation of lactobacilli by an aqueous extract of the green alga *Scenedesmus acutus* 276–3a. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 6. 79–86.

Corresponding author (*levelezési cím*):

László Varga

Department of Dairy Science, Institute of Food Science, Faculty of Agricultural and Food Sciences, University of West Hungary

H-9200 Mosonmagyaróvár, Lucsony u. 15-17.

Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Élelmiszer-tudományi Intézet, Tejgazdaságtani Tanszék

9200 Mosonmagyaróvár, Lucsony u. 15-17.

Tel.: +36 96 566 652, fax: +36 96 566 653

e-mail: VargaL@mtk.nyme.hu



Különböző technológiával készült sajtok összes szabad és szabad D-aminosav tartalma (előzetes közlemény)

¹Csapó, J., ¹Csapóné Kiss Zs., ¹Vargáné Visi É.

²Albert Cs., ²Salamon R.

¹Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Kaposvár, H-7400 Guba Sándor u. 40.

²Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Csíkszeredai Campus, Csíkszereda, R-530104 Szabadság tér 1.

ÖSSZEFOGLALÁS

Meghatároztuk az érett ardrahan ír és a camembert sajt fél cm vastag külső rétegének, ill. belső részének, a dán kék, az emmentáli, a gouda, a mozzarella, a parmezan, továbbá a különböző módszerekkel előállított cheddar sajt szabad összes aminosavtartalmát (AS) ioncserés oszlop-kromatográfiával; a szabad D-aszparaginsav (D-Asp), a D-glutaminsav (D-Glu) és a D-alanin (D-Ala) tartalmát nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával. Megállapítottuk, hogy a parmezan és a gouda sajt tartalmazza a legtöbb szabad AS-t (39000-24000 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$). A mozzarella és a különböző technológiákkal előállított cheddar pedig a legkevesebbet (2400-7400 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$). A többi sajt szabad AS tartalma 13000-19000 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ között változott. A szabad D-aminosavak közül a D-Asp átlagosan 58 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ (30,3%); a D-Glu 117 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ (15,8%); a D-Ala pedig 276 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ (37,2%) koncentrációban fordult elő a különböző sajtokban. A zárójelben lévő számok a D-AS-ak %-át mutatják az összes szabad AS százalékában. A D-AS-ak mennyiségében jelentős volt a különbség az egyes sajtok között. A D-AS-ak százalékos összetétele a D-Asp-ban 13,9-46,3%; a D-Glu-ban 12,9-26,6%; a D-Ala-ban 16,1-48,1% között változott. A három D-aminosavon kívül a többi D-AS csak nyomnyi koncentrációban, a kimutathatóság határán volt jelen a sajtokban. Nagyobb D-aminosav tartalmat mértünk azokban a cheddar sajtokban, ahol *Lactobacillus*-okat is használtak az előállításban.

(Kulcsszavak: különböző technológiával készült sajtok, szabad aminosavak, szabad D-aminosavak)

ABSTRACT

Total free and free D-amino acid content of cheeses produced by different technologies (preliminary report)

J. ¹Csapó, Zs. ¹Kiss Csapóné, É. ¹Visi Vargáné, Cs. ²Albert, R. ²Salamon

¹University of Kaposvár, Faculty of Animal Science, Kaposvár, H-7400 Guba Sándor u. 40.

²Sapientia Hungarian University of Transylvania, Csíkszereda, R-530104 Szabadság tér 1.

The concentration of total free AA and free D-AA were determined by ion exchange column chromatography and by high performance liquid chromatography in the outer layer and inner part of Ardrahan (Irish smear-ripened cheese) and Camembert cheeses, Danish blue, Emmentali, Gouda Mozzarella, Parmesan and five Cheddar cheeses produced by different technologies. It was established that the total free AA concentration was highest in Parmesan and Gouda

cheeses (39000-24000 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$), and lowest in Mozzarella and Cheddar cheese produced by different technologies (2400-7400 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$), while the other cheeses examined contained 13000-19000 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ free AA. The average concentrations of free D-AA in the different cheeses were the following: D-Asp 58 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ (30.3%), D-Glu 117 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ (15.8%), D-Ala 276 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ (37.2%). The values in brackets are the free D-AA concentration as a percentage of total free (D+L) AA. The amount of free D-AA showed differences between cheeses. D-AA as a percentage of total free AA was changed 13.9-46.3% for D-Asp, 12.9-26.6% for D-Glu and 16.1-48.1% for D-Ala. Except for these three D-AA, the other D-AA were present in the cheeses at very low concentrations, at the limit of the identification and determination. In the case of Cheddar cheese concentrations of the D-AA were a little higher, when lactobacilli were added during cheese making.

(Keywords: free amino acids, free D-amino acids, cheeses produced by different technologies)

BEVEZETÉS

Az utóbbi évek kutatásai tisztázták, hogy élelmiszereink vagy a technológiai beavatkozás következtében vagy az élelmiszer mikrobiológiai állapotában történő változásnak köszönhetően (Boehm és Bada, 1984; Bunjapamai és mtsai., 1982; Csapó és Henics, 1991; Friedman és mtsai., 1981; Fuse és mtsai., 1984; Hayashi és Kameda, 1980; Liardon és Lederman, 1986; Lubec és mtsai., 1990; Man és Bada, 1987; Masters és Friedman, 1980) jelentős mennyiségben tartalmazhatnak D-aminosavakat. Több cikk jelent meg tej és tejtermékek D-aminosav tartalmával kapcsolatban is (Brückner és Hausch, 1990a, 1990b; Gandolfi és mtsai., 1992; Palla és mtsai., 1989). Ezekből nyilvánvalóvá vált, hogy a D-aminosavak elsősorban nem a technológiai beavatkozás (hőkezelés, hőtartás) miatt jönnek létre, hanem a mikrobiális hatások következményei. Kevés adattal rendelkezünk a különböző sajtok összes szabad és a szabad D-aminosav tartalmáról. Nem tudunk arról, hogy a különféle sajtok D-aminosav tartalmát hazánkban rajtuk kívül más is mérte volna, ezért úgy gondoljuk, hogy a közleményünkben szereplő adatok hézagpótlónak tekinthetők és a tejipari szakemberek érdeklődésére tarthatnak számot.

A masztitiszes tőgyből származó tej és az egészséges tőgyből fejt első tejsugarak D-aminosav tartalmát vizsgálva (Csapó és mtsai., 1995) megállapítottuk, hogy a normál tejhez viszonyított magas D-aminosav tartalom a bakteriális fertőzöttség eredménye. Jelen közleményünkben arra keressük a választ, hogy a különböző sajtok előállítása során felhasznált mikroorganizmusok mennyiben járulnak hozzá a sajt szabad és a szabad D-aminosav tartalmához, hisz a D-aminosavak a mikroorganizmusok anyagszere termékeiként kerülnek a tejbe.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) és ioncserés oszlopkromatográfia (IEC) a D, továbbá az összes szabad aminosav meghatározására

Készülékek

Vizsgálatainkat a University of Göteborg and Chalmers University of Technology, Analitikai és Tengerkémi Tanszékén; a Veszprémi Egyetem, Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar, Kémiai Tanszékén, továbbá a Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Kémiai Intézetében végeztük.

A Göteborgban alkalmazott Varian LC gradiens képzésre alkalmas rendszerrel, Varian 9090 mintaadagolóval és gázműködtetésű, 25 μl -es hurokkal ellátott (belső átmérő

0,25 mm) Valco injektorral rendelkezett. Shimadzu RF-535 fluoreszcenciás detektort használtunk a származékok mennyiségének mérésére. A gerjesztési és az emissziós hullámhossz 325 és 420 nm volt. Az elválasztás folyamatának és az automatikus mintaadagoló munkájának ellenőrzésére, a mintafelvitelre és a kromatogrammok tárolására a Varian DS 651 vezénylő rendszert alkalmaztuk.

Kaposváron ISCO 100 DM syringe pumpákból, 20 µl-es hurokkal ellátott Rheodyne injektorból állítottuk össze kromatográfias rendszerünket. Az elválasztás folyamatának ellenőrzésére és a kromatogrammok tárolására a ISCO Chem Research rendszert alkalmaztuk. A származékképzést és a mintafelvitelt kézzel végeztük.

Vegyszerek

Az acetonitrilt és a metanolt a Rathburn (Walkerburn, U.K.) cégtől, az aminosav standardokat, az o-ftálaldehidet (OPA) és a 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio-β-glükopiranozidot (TATG) a Sigmától (St. Louis, Mo) vásároltuk. Az elúciós puffereket mono- és dinátrium-hidrogén-foszfátból állítottuk elő. A pH-t nátrium-hidroxiddal állítottuk be.

Származékképzés

A reakciót 120 µl-es mikroampullában végeztük, melyet 1,8 ml-es térfogatú, teflonbevonatú belső zárólappal és kupakkal ellátott ampullába helyeztünk. Az automatikus mintaadagolót úgy programoztuk, hogy a 90 µl borátpufferben (0,4M; pH=9,5) oldott mintát (szabad aminosavak vagy nitrogén áramban bepárolt fehérje hidrolizátum) keverjen össze 15 µl reagenssel (8 mg OPA és 44 mg TATG feloldva 1 ml metanolban). Ezt követően az oldatot 100 µl levegő átbuborékolatásával jól összekevertük, majd 6 percig állni hagytuk. E reakcióelegyből – az injektáló apparátus előzetes átöblítése után – 25 µl-t injektáltunk az analitikai oszlopra. Az injektálást befejezve a rendszert 100 µl aceton: víz 70:30 arányú elegyével háromszor átöblítettük.

Az ISCO rendszernél végzett elválasztáskor a kézi származékképzés során az előzőekben ismertettekkel azonos módon jártunk el azzal a kivétellel, hogy a származékképzési lépések során a keverést IKA Vibro Fix készülékkel végeztük.

Az enantiomerek szétválasztása és meghatározása

Az enantiomerek szétválasztását Einarsson és mtsai. (1987) módszere szerint fordított fázisú (250x4,6 mm belső átmérő, 5 µm részecskeméret, Kromasil oktil (C8) töltet) analitikai oszloppal végeztük. Az oszlop élettartamának megnövelésére a mintaadagoló és az analitikai oszlop közé egy biztonsági oszlopot (RP8, Newguard, 25x3,2 mm belső átmérő, 7 µm részecskeméret, Brownlee), a pumpa és a mintaadagoló közé pedig egy tisztítóoszlopot (C18, 36x 4,5 mm belső átmérő, 20 µm részecskeméretű Rsil) csatlakoztattunk. Az enantiomerek szétválasztására két komponensből álló gradiens rendszert alkalmaztunk, melynek összetétele az alábbi volt: A=40% metanol foszfátpufferben (9,5 mM, pH=7,05); B=acetonitril. Az áramlás sebessége 1 ml/perc volt, a gradiens pedig az alábbiak szerint változott az idő függvényében:

Idő (perc)	A%	B%
0	95	5
10	95	5
35	83	17
55	72	28
56	67	33
74	67	33
75	62	38

Az összes szabad aminosav meghatározása

Ioncserés oszlopkromatográfiával, automatikus aminosav-analizátorral végeztük nátrium-citrát pufferekkel és ninhidrinnel történő oszlop utáni származékképzéssel.

A vizsgált sajtok

Nyolc különböző technológiával készült sajt szabad- és szabad D-aminosav összetételét határoztuk meg. A vizsgált sajtok a következők voltak:

- érett ardrahan ír sajt külső (kb. fél cm vastag) rétege és belső része,
- camembert sajt külső (kb. fél cm vastag) rétege és belső része,
- dán kék sajt,
- ementáli sajt,
- gouda sajt,
- mozzarella sajt,
- parmezan sajt,
- közönséges cheddar sajt,
- Különböző módszerekkel előállított cheddar sajt.

- Az 1. kísérlet csak starterrel,
a 2. kísérlet starterrel és laktobacillusokkal,
a 3. kísérlet csak starterrel,
a 4. kísérlet starterrel és laktobacillusokkal
előállított cheddar sajt.

A sajtok előkészítése analízisre

A sajtokat 4°C-on tároltuk (két hét) az analízisek kezdetéig. A sajtmintákból 25-30°C-ra történő felmelegítés után 2,5-5,0 g-ot mértünk be egy homogenizátorba, és a szabad aminosavakat 20 ml 0,1 mólos sósavoldattal egy órán át 2850 fordulaton végzett homogénezéssel oldottuk ki. Az így kapott anyagot 5000 g-n centrifugáltuk 20 percig, melynek során egyrészt eltávolítottuk a sajtban lévő alakos elemeket, melyek leülepedtek a centrifugacső aljára, másrészt elvégeztük a szuszpenzió zsírtalanítását is. Ezt követően 10 cm³ mintához hozzáadtunk 1,25 g triklórecetsavat, majd 30 perc állás után a kivált csapadékot 10000 g-n centrifugáltuk 30 percig. A kapott felülúszó pH-ját az összes szabad aminosav meghatározása esetén 4M nátrium-hidroxiddal pH=2,2-re, a D-aminosavak meghatározásakor pedig pH=7-re állítotuk be. Az így kapott oldatokat liofilezővel 10°C-os tálcáfűtést alkalmazva beszárítottuk, majd az összes szabad aminosav meghatározásakor a beszárított anyagot 10 cm³ pH=2,2-es citrátpufferben, a szabad D-aminosavak meghatározásakor pedig 1 cm³ bidesztillált vízben oldottuk fel. Az így előkészített mintákat -25°C-on tároltuk az analízisek megkezdéséig.

EREDMÉNY ÉS ÉRTÉKELÉS

A különböző sajtok ioncserés oszlopkromatográfiával meghatározott összes szabadaminosav-tartalmát az 1-4. táblázatban, szabad D-aminosav-tartalmát pedig az 5. táblázatban foglaltuk össze. A táblázatokban az aminosavak µmol/100 g mértékegységgel szerepelnek.

A különböző sajtok összes szabadaminosav-tartalmát vizsgálva megállapítható, hogy a legtöbb szabad aminosavat – 39677 µmol/100 g-ot, amely 128-as átlagos aminosav molekulatömeggel számolva mintegy 5,1 g szabad aminosavnak felel meg 100 g sajtban – a parmezan sajt tartalmazza. A legkevesebbet pedig 2446 µmol/100 g-mal a mozzarella. A szabad aminosavak mennyiségét illetően a második helyen a gouda sajt

található 24010 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ -mal. Ezt követi az ardrahan sajt belső, ill. külső része 19982 és 19521 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ -mal. Ötödik helyre az ementáli sajt került 18460 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ -mal alig maradvány az ardrahanétól. A camembert külső rétegének (16458 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$) szabad aminosav koncentrációja némileg nagyobb, mint a belső résznél (14709 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$), ellentétben az ardrahannal, ahol a külső és belső rész között a szabad aminosavakban nem volt lényeges különbség. Kissé kevesebb szabadaminosav-tartalmat mértünk a dán kék sajtban 13008 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ -mal.

1. táblázat

Az ardrahan ír és a camembert sajt külső rétegének, továbbá belső részének összes szabadaminosav-tartalma ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)

Amino-savak (1)	Érett ardrahan ír sajt külső rétege(2)	Érett ardrahan ír sajt belső része(3)	Camembert sajt külső rétege(4)	Camembert sajt belső része(5)
Asp	272	337	302	259
Thr	274	320	209	195
Ser	364	465	337	232
Glu	1325	1634	945	1193
Pro	1169	1207	1970	1544
Gly	938	708	875	616
Ala	1598	1395	1858	1613
Cys	194	145	24	29
Val	1850	1826	1629	1264
Met	639	558	623	530
Ile	972	904	938	790
Leu	2661	3078	1836	1533
Tyr	340	260	625	524
Phe	1327	1467	1081	945
His	3256	3116	1353	1584
Lys	1062	1389	1393	1336
Arg	1280	1173	487	522

Table 1: Total free amino acid content of outer layers and inner parts of Ardrahan Irish and Camembert cheeses ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)

Amino acids(1), Ardrahan Irish smear ripened cheese outer layer(2), Ardrahan Irish smear ripened cheese inner part(3), Camembert outer layer(4), Camembert inner part(5)

A cheddar sajtok szabadaminosav-tartalma lényegesen kisebb volt az előbbieken felsoroltaknál. A közönséges cheddarban kaptuk a legkisebb szabadaminosav-tartalmat (3977 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$). A kísérletben előállított cheddar sajtban pedig ott volt nagyobb a szabadaminosav-tartalom, ahol nemcsak starterkultúrát (6567, ill. 5393 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$), hanem laktobacillusokat is felhasználtak (7359, ill. 6028) az előállítás során.

Az egyes aminosavak mennyiségét külön-külön vizsgálva megállapítható, hogy legkisebb koncentrációban a cisztin (Cys) fordul elő (2,4-194 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$). Ezen belül az ardrahan külső és belső rétege valamint az ementáli tartalmazta a legtöbb cisztint

(118-194 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$). A camembert, a dán kék és a gouda cisztintartalma mintegy 20%-a, a mozzarella, a parmezan és a cheddar sajtok cisztintartalma pedig csak mintegy 2-5%-a volt a az elsőként említetteknek.

2. táblázat

A dán kék, az ementáli, a gouda és a mozzarella sajt összes szabad D-aminosav tartalma ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)

Aminosavak(1)	Dán kék(2)	Ementáli(3)	Gouda	Mozzarella
Asp	286	157	214	18
Thr	360	613	980	44
Ser	773	661	2223	110
Glu	739	734	1077	40
Pro	827	2425	3446	226
Gly	426	865	1306	117
Ala	500	888	1204	156
Cys	36	118	24	2.4
Val	735	1657	2360	197
Met	712	504	712	130
Ile	569	928	1546	139
Leu	1467	2380	2586	299
Tyr	787	471	468	126
Phe	964	1120	1610	190
His	2137	2616	1541	360
Lys	1314	1672	2231	256
Arg	376	651	482	106

Table 2: Total free amino acid content of Danish Blue, Ementhal, Gouda and Mozzarella cheeses ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)

Amino acids(1), Danish Blue(2), Ementhal(3)

Az ardrahan és a camembert külső és belső részének szabad aminosav összetételét vizsgálva megállapítható, hogy az aszparaginsav (Asp), a treonin (Thr), a szerin (Ser) és a tirozin (Tyr) mennyisége 200-600 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ között, a metionin (Met), a glicin (Gly) és az izoleucin (Ile) mennyisége pedig 550-950 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ között változik. Ezeket követi növekvő sorrendben az arginin (Arg), a lizin (Lys), a glutaminsav (Glu), a valin (Val), a prolin (Pro), a fenilalanin (Phe) és az alanin (Ala) 1000-2000 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ koncentrációval, míg a sort az ardrahan sajt zárja a maga igen magas leucin (Leu, 2600-3100 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$) és hisztidin (His, 3100-3300 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$) tartalmával.

A parmezan és a gouda vonatkozásában a helyzet lényegesen megváltozik egyes aminosavakban. Ezekben a sajtokban jelentősen megnőtt a Thr, de különösen a szerin és a prolin mennyisége. A parmezanban a Pro-ban mértük az összes sajt és összes vizsgált aminosav vonatkozásában a legnagyobb értéket 6193 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ -mal, a második legnagyobbat pedig a Ser-ben 4433 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ -mal. A többi aminosav mennyisége hasonlóan alakul az ardrahannál és a camembertnél tárgyaltakhoz azzal a

különbséggel, hogy a parmezanban a Lys-tartalmat is nagynak (3457 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$) mértük.

3. táblázat

A parmezan, a kereskedelmi forgalomban kapható cheddar és a különböző technológiával készült cheddar sajt összes szabadaminosav-tartalma ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)

Amino-savak(1)	Parmezan	Kereskedelmi cheddar(2)	Cheddar 1-es kísérlet(3)	Cheddar 2-es kísérlet(4)
Asp	273	160	170	215
Thr	2120	95	151	179
Ser	4433	218	401	479
Glu	678	319	497	527
Pro	6193	432	560	610
Gly	2096	139	212	262
Ala	2018	212	331	343
Cys	5.4	4,8	2,4	4,7
Val	3542	234	495	490
Met	1156	158	204	243
Ile	2742	154	213	276
Leu	3391	352	999	1250
Tyr	1153	189	188	156
Phe	2162	268	646	673
His	1727	521	805	933
Lys	3457	362	481	562
Arg	2531	159	212	157

Table 3: Total free amino acid content of Parmezan, Commercial Cheddar and Cheddar cheeses manufactured under different conditions ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)

Amino acids(1), Commercial Cheddar(2), Cheddar Cheese Trial 1(3), Cheddar Cheese Trial 2(4)

A cheddar sajtokban nem volt lényeges különbség a különböző módszerekkel előállított sajtok között a szabad aminosavak arányát tekintve. Egyedül a közönséges cheddar tért el jobban a másik négytől a lényegesen alacsonyabb Val-, Leu- és His-tartalmával. Amennyiben a cheddar sajtokat a camemberhez vagy az ardrahanhoz hasonlítjuk megállapítható, hogy a szabad aminosavak közötti arányok egy-két esettől eltekintve gyakorlatilag megegyeznek. Említést érdemlő különbség az, hogy a cheddar sajtokban alacsonyabb az Ala és a Val részaránya, ezzel ellentétben viszont lényegesen nagyobb a Ser-é.

Amennyiben az összes általunk vizsgált sajt szabad aminosavainak arányait hasonlítjuk össze akkor megállapítható, hogy az ardrahan és a cheddar sajt a Leu és a His igen magas részarányával, a parmezan és a gouda a magas Ser és Pro, továbbá a viszonylag alacsonyabb Glu és His részarányával tűnik ki. A többi sajtban kiegyenlítettebb szabad aminosav arány mutatkozik.

4. táblázat

A különböző technológiával készült cheddar sajtok összes szabadaminosav-tartalma ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)

Aminosavak(1)	Cheddar 3-as kísérlet(2)	Cheddar 4-es kísérlet(3)
Asp	130	137
Thr	104	100
Ser	241	285
Glu	426	384
Pro	437	605
Gly	187	198
Ala	336	271
Cys	2,4	2,4
Val	378	445
Met	175	214
Ile	106	112
Leu	932	1069
Tyr	155	192
Phe	587	671
His	778	874
Lys	316	363
Arg	103	106

Table 4: Total free amino acid content of Cheddar cheeses manufactured under different conditions ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)

Amino acids(1), Cheddar Cheese Trial 3(2), Cheddar Cheese Trial 4(3)

A sajtok szabad D-aminosavait vizsgálva megállapítottuk, hogy a 14 vizsgált minta átlagában a D-Asp mennyisége a legkisebb ($5,2\text{-}89\text{ }\mu\text{mol}/100\text{ g}$), a D-Ala-é a legnagyobb ($52\text{-}752\text{ }\mu\text{mol}/100\text{ g}$), míg a D-Glu-é közbülső értéket foglal el $9,6\text{-}244\text{ }\mu\text{mol}/100\text{ g}$ -mal. A D-aminosavak mennyiségét az összes szabad aminosav százalékában kifejezve a D-Glu-ban kaptuk a legkisebb értéket $15,84\%$ -ot, míg a D-Asp ($30,31\%$) és a D-Ala ($37,15\%$) százalékos összetétele lényegesen kisebb mértékben különbözött egymástól.

Az egyes sajtokat tekintve mind a szabad D-aminosavak mennyisége, mind százalékos aránya jelentős eltérést mutat. Az ardrahan és a camembert külső és belső rétegében a szabad D-aminosavak mennyisége gyakorlatilag megegyezik. Mind a négy vizsgált mintában a D-Asp mennyisége a legkisebb ($36\text{-}42\text{ }\mu\text{mol}/100\text{ g}$ a camembertnél és $70\text{-}74\text{ }\mu\text{mol}/100\text{ g}$ az ardrahannál). A D-Glu közbülső helyet foglal el ($122\text{-}235\text{ }\mu\text{mol}/100\text{ g}$), míg a legnagyobb mennyiségben a D-Ala található a mintákban ($259\text{-}433\text{ }\mu\text{mol}/100\text{ g}$). Egészen más a helyzet ha a D-aminosavak százalékos arányát tekintjük az összes aminosav százalékában. Ekkor az ardrahannál a D-Asp ($23,2\text{-}27,2\%$) és a D-Ala ($27,1\text{-}28,2\%$) százalékos aránya lényegesen nagyobb mint a camemberté ($13,9\text{-}14,0\%$, ill. $16,1\text{-}18,0\%$). A D-Glu százalékos arányában viszont nincs különbség a két sajt között ($13,1\text{-}14,4\%$ az ardrahanban és $12,9\text{-}14,8\%$ a camembertben). Sem a D-aminosavak mennyiségében, sem azok részarányában nem találtunk lényeges különbséget a külső réteg és a belső rész között.

5. táblázat

A különböző sajtok fő **D-aminosav-tartalma (μmol/100 g)

Sajtok(1)	D-aminosavak(2)					
	D-Asp	D-Asp %, *	D-Glu	D-Glu %, *	D-Ala	D-Ala %, *
Érett ardrahan ír sajt külső rétege(3)	74	27,2	173	13,1	433	27,1
Érett ardrahan ír sajt belső része(4)	70	23,2	235	14,4	393	28,2
Camembert sajt külső rétege(5)	42	13,9	122	12,9	334	18,0
Camembert sajt belső rétege(6)	36	14,0	176	14,8	259	16,1
Dán kék sajt(7)	89	31,1	149	20,2	212	42,4
Ementáli(8)	42	26,8	195	26,6	405	45,6
Gouda sajt	61	28,5	244	22,7	462	38,4
Mozzarella	5,2	28,9	9,6	24,0	52	33,3
Parmezan	57	20,8	72	10,6	752	37,3
Kereskedelmi cheddar(9)	74	46,3	45	14,1	96	45,3
Cheddar 1-es kísérlet(10)	74	43,5	62	12,5	153	46,3
Cheddar 2-es kísérlet(11)	89	41,4	65	12,4	165	48,1
Cheddar 3-as kísérlet(12)	59	45,4	53	12,5	161	47,9
Cheddar 4-es kísérlet(13)	41	33,4	42	10,9	125	46,1

$$* D\% = \frac{D}{D+L} \times 100$$

**Az összes D-aminosavat analizáltuk, de néhány kivételtől eltekintve, a D-aminosav kis koncentrációban volt jelen. Ezen D-aminosavak meghatározása bizonytalan volt. (*All of the D-amino acids were analysed, but except some cases, the other D-amino acids were present only in very few concentrations, and the determination of these D-amino acids were uncertain.*)

Table 5: Main free **D-amino acid content of different cheeses (μmol/100 g)

Cheeses(1), D-amino acids(2), Ardrahan Irish smear ripened cheese outer layer(3), Ardrahan Irish smear ripened cheese inner part(4), Camembert outer layer(5), Camembert inner part(6), Danish Blue(7), Ementhal(8), Commercial Cheddar(9), Cheddar Cheese Trial 1(10), Cheddar Cheese Trial 2(11), Cheddar Cheese Trial 3(12), Cheddar Cheese Trial 4(13)

Az előzőekben elmondottakhoz hasonló a helyzet akkor, ha a dán kék, az ementáli, a gouda a mozzarella és a parmezan szabad D-aminosavainak mennyiségét hasonlítjuk

össze. Mindegyik sajtban a D-Asp mennyisége a legkisebb, a D-Ala-é a legnagyobb, a D-Glu pedig közbülső helyet foglal el. Szembeötlő a mozzarella igen kis D-aminosav-tartalma, ami nem meglepő ha tudjuk, hogy az összes szabad aminosav tekintetében is a mozzarella van az utolsó helyen. Ugyancsak szembeötlő az, hogy a parmezán D-Asp-tartalma nem különbözik lényegesen a másik hárométól, D-Glu-tartalma közülük a legkisebb, legnagyobb viszont – az összes többi sajttal összehasonlítva is – a D-Ala-tartalma, amit talán magyaráz a parmezán kiemelkedően magas összes szabad Ala-tartalma. Ha a D-aminosavak mennyiségét vizsgáljuk az összes szabad aminosav százalékos arányában akkor megállapítható, hogy az ementáli kivételével – ahol a D-Asp és a D-Glu százalékos aránya gyakorlatilag megegyezik – a D-Asp %-os részaránya 5-20%-kal nagyobb mint a D-Glu-é. Lényegesen nagyobb a D-Ala részaránya az összes D-aminosavon belül 33,3-45,6%-kal.

A különböző technológiával kapott cheddar sajtok szabad D-aminosav összetételét összehasonlítva a sajtelőállítás technológiája és a szabad D-aminosav-tartalom között nem tudunk törvényszerűségeket megállapítani. A különböző technológiával előállított cheddar sajtok szabad D-Asp-tartalma 41-89, D-Glu-tartalma 42-65, D-Ala-tartalma pedig 125-165 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ között változott. Amennyiben a D-aminosavak %-os arányát hasonlítjuk össze akkor megállapítható, hogy a negyedik kísérletben kapott sajt kissé alacsonyabb D-Asp arányától eltekintve az összes D-aminosav aránya megegyezik mindegyik általunk vizsgált – különböző technológiával készült – sajtban. Úgy tűnik, hogy a sajtelőállítás módszere a cheddar sajtokban nem befolyásolja a sajt D-aminosav-tartalmát és a D-aminosavak arányát.

IRODALOM

- Boehm, M.F., Bada, J.L. (1984). Racemization of aspartic acid and phenylalanine in the sweetener aspartame at 100°C. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 81. 5263.
- Brückner, H., Hausch, M. (1990a). D-Amino acids in dairy products: detection, origin and nutritional aspects. I. Milk, fermented milk, fresh cheese and acid crude cheese. *Milchwissenschaft*, 45. 357.
- Brückner, H., Hausch, M. (1990b). D-Amino acids in dairy products: detection, origin and nutritional aspects. II. Ripened cheeses. *Milchwissenschaft*, 45. 421.
- Bunjamai, S., Mahoney, R.R., Fagerson, S.I. (1982). Determination of D-amino acids in some processed foods and effect of racemization on in vitro digestibility of casein. *J. Food Sci.*, 47. 1229.
- Csapó, J., Henics, Z. (1991). Quantitative determination of bacterial protein from the diaminopimelic acid and D-alanine content of rumen liquor and intestine. *Acta Agronomica Hungarica*, 1-2. 159-173.
- Csapó, J., Csapó-Kiss, Zs., Stefler, J., Martin, T.G., Némethy, S. (1995). Influence of mastitis on D-amino acid content of milk. *J. Dairy Sci.*, 78. 2375-2381.
- Einarsson, S., Folestad, S., Josefsson, B. (1987). Separation of amino acid enantiomers using precolumn derivatization with *o*-phthalaldehyde and 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- β -glucopyranoside. *J. Liquid Chromatogr.*, 10. 1589.
- Friedman, M., Zahnley, J.C., Masters, P.M. (1981). Relationship between in vitro digestibility of casein and its content of lysinoalanine and D-amino acids. *J. Food Sci.*, 46. 127.
- Fuse, M., Hayase, F., Kato, H. (1984). Digestibility of proteins and racemization of amino acid residues in roasted foods. *J. Jpn. Soc. Food. Nutr.*, 37. 348.

- Gandolfi, I., Palla, G., Delprato, L., DeNisco, F., Marchelli, R., Salvadori, C. (1992). D-amino acids in milk as related to heat treatments and bacterial activity. *J. Food Sci.*, 57. 377.
- Hayashi, R., Kameda, I. (1980). Decreased proteolysis of alkali treated proteins: consequences of racemization in food processing. *J. Food Sci.*, 45. 1430.
- Liardon, R., Lederman, S. (1986). Racemization kinetics of free and protein-bound amino acids under moderate alkaline treatment. *J. Agric. Food. Chem.*, 34. 557.
- Lubec, G., Wolf, C.H.R., Bartosch, B. (1990). Amino acid isomerisation and microwave exposure. *Lancet* (Mar 31) 792.
- Man, H., Bada, J.L. (1987). Dietary D-amino acids. *Ann. Rev. Nutr.*, 7. 209.
- Masters, P.E., Friedman, M. (1980). Amino acid racemization in alkali treated food proteins -chemistry, toxicology, and nutritional consequences, 165-194, in *Chemical Deterioration of Proteins*. ACS Symp. Ser. 123 165. Ed. Whitaker, J.R., Fujimaki, M.: Am. Chem. Soc., Washington, DC.
- Palla, G., Marchelli, R., Dossena, A., Casnati, G. (1989). Occurrence of D-amino acids in food. Detection by capillary gas chromatography and by reversed-phase high-performance liquid chromatography with L-phenylalaninamides as chiral selectors. *J. Chromatogr.*, 45. 475.

Levelezési cím (*corresponding author*):

Csapó János

Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar

7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40.

University of Kaposvár, Faculty of Animal Science

H-7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40.

Tel.: +36-82-314 155, fax: +36-82-321 749

e-mail: csapo@mail.atk.u-kaposvar.hu



Issues why the European agricultural subsidies were voidable in terms of decouplement

B.I. * Kárpáti

University of Reading, Faculty of Life Sciences, School of Agriculture, Policy and Development
Reading, United Kingdom

ABSTRACT

The finance of the Agribusiness Industry is a highly criticised issue both on national and on international levels. Moreover, this will be one of the most questioned and negotiated key issues of the forthcoming WTO negotiations in Hong Kong. The developing countries continue to argue that the EU's agriculture subsidy system is not decoupled enough. This paper discusses the major origins of these arguments and seeks an answer to whether these arguments are correct. Also, it discusses the box system of the EU agricultural subsidies. Moreover, it tries to exceed the decouplement issue to the new agricultural point of view of the EU, namely the multifunctionality, and to show why this question can raise more arguments from the developing world against the Common Agricultural Policy (CAP). (Key words: agriculture, subsidy, decoupled, green box)

ÖSSZEFOGLALÁS

Az európai agrártámogatások problémái a termelésfüggetlenséggel kapcsolatban

*Kárpáti B.I.

Readingi Egyetem, Élettudományi Kar, Agrárpolitikai és Fejlesztési Iskola, Reading, Nagybritannia

Az agrár szektor finanszírozása erősen vitatott kérdés, mind hazai mind nemzetközi szinten. A WTO is különös figyelmet fordít rá, a soron következő honkongi csúcsnak ez a szakterület lesz az egyik központi témája. A fejlődő országok folyamatosan támadják az Európai Unió finanszírozási és támogatási rendszerét, amelynek legfőbb oka az, hogy nem piacfüggetlen és a piaci-mechanizmusokat erősen befolyásoló elemeket tartalmaz. A tanulmány legfőbb célja a rendszer előnyeinek, hátrányainak részletes bemutatása. Vizsgálja az Unió agrár támogatások és a WTO „doboz rendszerének” (piros, zöld, sárga) kapcsolatát, röviden áttekintve az egyes dobozok paramétereit. Végül azt a kérdéskört is érinti, hogy vajon a mezőgazdaság multifunkciós felfogása és értelmezése miért adhat okot a fejlődő országok újabb támadásaira.

(Kulcsszavak: ágárgazdaság, támogatás, termelés-független, zöld-doboz, KAP)

INTRODUCTION

The financial condition of the agricultural sector is a broadly discussed and highly debated issue; indeed, it is one of the most important items on the agenda of the current WTO negotiations.

*Chevening Scholarship Student

The focus of this paper is on the “greenness” of the EU’s Agricultural subsidy system before the newly implemented SFP (single farm payment) system¹. (The paper will not discuss the SFP system.) The study particularly will discuss the issues of the so-called “decoupled” payment and agro-insurance (farmer income, etc.) systems and it will debate the question: whether these support/ policy instruments were appropriate to the Green box’s flag or whether the lack of neutral marketing resulted in the EU having to reallocated them under the SPF. Moreover, the paper will briefly discuss the issue and the awarding of the so-called Agri-Environmental Programs in the EU according to the “multifunctional agriculture” theory.

The paper proceeds as follows. First, it briefly examines the “box system” of agricultural finance, according to the Uruguay Round Agreement on Agriculture (referred to as the URAA in this paper), by highlighting the *Green box*. Second, it gives a short summary of the former EU agricultural support system under the previously introduced boxes with the limitation on the land and COP (cereals, oilseed and protein crops) payments. Third, it focuses on the issues of the decoupled payments and will discuss some of the theoretical problems from recent studies as to whether it was “*green enough*”. Fourth, it will consider the insurance issues as well, and find the cardinal criticism against their “greenness”. Fifth, it notes some controversial issues of the Agri-Environmental Programs.

DISCUSSION

The agricultural box system focused on the green box

To understand the question under discuss we recall briefly the box system of the URAA (1994). According to this agreement, agriculture finance in all WTO members, thus in the EU also, should follow the 3-box system: the Amber, the Blue and the Green box. The *Amber box* encompasses those agricultural subsidies, which were considered to distort trade and to be an obstacle to the fair trade situations; however, these should have been reduced by 20% by 2000 (²Walter and Trine, 2001). These are, for instance, the product specific supports (based on administrative prices etc.).

The second category is the *Blue box* supports, which are implemented under certain production-limiting projects and programs, and which are exempt from reduction requirements (Frandsen et al., 2002). There are subsidies such as the headage or area payments, which have become less coupled during the CAP reforms, thus the EU wanted to qualify them as *Green box* subsidies, but they were still declared in the *Blue box* (Beard & Swinbank, 2001) by 2004, since the SFP reformed them.

Perhaps the most crucial question of the forthcoming WTO agricultural negotiations will be the issue of the rearrangement of these two boxes. Some agro-political groups would like to tighten the *Amber box*; however, there are members who would like to move the entire *Blue box* into the *Amber box* (³Frandsen et al., 2002).

The third box is the *Green box*, which encompasses all those policy instruments which have “*no or at most minimal trade-distorting effects or effects on production*”

¹The EU launched the SFP in 2004, which changed and reformed the concept of the CAP; information available: www.europa.eu.int/scadplus/leg/en/lvb/l11089.htm

²The time period encompassed originally the years between 1995- 2000 (Walter and Trine 2001)

³The Blue box policies were protected until 2003 according to the “Peace Clause”, which expired at the end of 2003 (13. article of URAA, cit Frandsen et al., 2002)

(URAA, 1994). Here are found policy instruments such as domestic food aid, direct payments, income insurance and income safety-net programmes, producer retirement programmes, agri-environmental programmes and decoupled payments etc. (URAA, 1994). According to the URAA (1994), all the conditions and specifications, which enable a policy to be declared as qualifying as a *Green* box category, are in the Annex 2. As for decoupled payments, there are five main definitions in the 6th paragraph, which declare the main features of a decoupled payment and define which subsidies are endorsed here.

The EU support system according to the *Box structure* before the SFP

Before the Uruguay Round the preferred policy instrument of the EU agricultural policy was the market price policy, which had to be changed after the Round in response to the *McSharry* reform in 1993. According to this reform, two types of direct payments have compensated farmers: area and headage payments (*Walter and Trine*, 2001). However, the Agenda 2000⁴ modified the payment system, both the amount and the proportion. According to that structure, COP producer farmers had to decide between two different types of finance system: the so-called general scheme and the simplified scheme (*Frandsen et al.*, 2002). The basic differences between these are in the set-aside program⁵ and in the connected support payments. In the simplified scheme, farmers were not requested to participate in the set-aside program, but received a “*non crop-specific payment*”. However, those producers who preferred the general scheme had to set aside a certain percentage of the farmed area, but were able to receive a “*compensatory payment*” based on the amount of the land which was being set-aside, and also were eligible to receive the so-called “*crop-specific payment*” for the land which was being farmed (*Walter and Trine* 2001; *Frandsen et al.*, 2002). All EU member countries have their own fixed “*Member State basis*” which declares clearly the country’s quota for payments under COP reasons. Naturally, if the county exceeded its own payments limit, the payments per hectare decreased proportionately. For example, in Hungary the Member State basis was 3.48 million hectare and the basis output is 4.73 t/hectare and the payment is 298 Euro/hectare for the year 2004 (*Szendrő, MARD*, 2004).

Although the structure, introduced above, was planned to be market neutral, and tended not to affect or just minimally affect the equilibrium, it was strongly criticized. Therefore the EU changed it and launched the SFP system in 2004. According to this regulation, the system may be more appropriate to the “*Green box*” declarations (*Europa*, 2004).

But why was the former system not appropriate on international level? Why was it so strongly criticised? In the following the paper will discuss these issues.

Problematic questions of the decoupled payments:

The first problem of the decoupled payments implementation may arise from the theoretical point of view. There is a significant difference between the two leading concepts. Namely, according to an *OECD* paper (2001), *OECD* has two possible readings of these definitions. It is possible to define an “*effective full decoupling*” and a “*full decoupling (in the restrictive sense)*” category. The basic difference between the two concepts is in their objectives. While the former highlights the equilibrium

⁴More inform about the Agenda 2000 available at The European Commission’s homepage: <http://europa.eu.int/comm/agenda2000>

⁵More information about the set-aside program is available by the *OECD* 2001 reference

quantities, the latter is more focused on the adjustment processes. Consequently, in the first case the emphasis on a decoupled payment is that the equilibrium level of production and market should not change after applying the policy, if it is to be declared a decoupled payment. However, in the second case, the stress is more on the reaction to the policy, namely, not just that the market equilibrium should not change, but no outside shock should be caused by the system (OECD, 2001). Therefore, there must be a distinction between policy as influence and as design. Consequently, before judging a whether a policy meets the declarations of the decoupled payments, policy makers also should recognise the outside effects of the policy. It can easily happen, that although the policy has been designed to be production and market equilibrium neutral, it has an impact on another, unmeasured, factor in the market, which could lead to an increase in the production or an outside shock. Thus, decoupled policies should give more attention to their “market-environment” as well. This could be one of the reasons why some decoupled subsidies, which are launched, according to the URAA definitions in the EU, have received such a strong criticism among developing countries.

Connected to this theoretical issue, Frandsen *et al.* argues (2002), that decoupling policies should be evaluated on a broader level rather than just as single instruments, since they can have an impact on “non-targeted” commodities through cross-commodity effects. Therefore the second basic problem of the decoupled payment system’s five declarations, given by the URAA, could be that they allow policy instruments to be treated as policy packages. However, as some experts suggest, these should be handled as single instruments instead of packages, because of fair trade reasons (Gohin *et al.*, 1999).

As this section has showed the first and basic problem of the decoupled issue is that there are differences in the theoretical concepts of understanding and interpretation, which are quite opposite to each other. Thus, obviously there are arguments in its implementation.

Does the “expectation mechanism” cause payments not to be decoupled?

Farmers’ investment decisions and production depend on three main issues, which are interconnected: 1, recent policies; 2, expectations about the future policies; 3, risk aversion. Theoretically in a given perfect market, where the policy instruments are explicitly decoupled, farmers will have a quite steady investment and production level and strategy, so the market equilibrium presumably will not change. However, markets tend to be imperfect. Therefore, despite the strictly decoupled payments, farmers will not be able to make clear decisions between investment and production or consumption, and the policy will affect the level of the production. Thus, it will become coupled instead of decoupled. Consequently, because of current policies, the farmer’s expectation will change also, as the risk effect increases. It is like a “domino effect”.

The expectation factor has also another issue, which is interconnected with decoupled payments. If farmers think future payments and supports – like the income support under the URAA *Green box* – depend on former production levels, they will still increase production because of the “expectation mechanism” (Frandsen *et al.*, 2002). In other words, farmers will expect the government to update the basic production level of the payments; consequently, the current production will determine the future subsidies. Thus, the current production should increase to guarantee a higher future payment (OECD, 2001). Moreover, the briefly explained COP payment system was definitely not separate from the current production but directly linked to it because of the farmers expectation, since it stimulated farmers to farm on larger areas than they normally

would. It is important to highlight that those rules did not require farmers to harvest the reported field, just to sow it. Consequently, the final decision of the production depended just on the cost of the harvest (*Frandsen et al.*, 2002).

In other words, although the EU decoupled payments met the *Green box* declarations, they could have been criticised as not “green enough” due to the expectation mechanism of farmers. Since farmers will increase their production level with the hope that the payments will also rise, these seems to be interrelated. Therefore, the decoupled subsidy structure might become coupled instead of adhering to the initial design.

The income and crop insurance systems and their criteria

As was mentioned above, the risk-aversion of the farmers also is a highly problematic issue. Agricultural production contains a wide range of risk factors anyway, such as weather and water or technological problems etc.; therefore, policies should aim to minimising the risk of production. If policy failures increase the income risk-aversion of farmers, they will try to change the production level as an automatic survival mechanism. Thus, policies must try to launch instruments that are able to secure farmers’ income level. However, these instruments must also meet the URAA declarations. Moreover, this issue is very sensitive, as the position of farmers is highly related to their production.

In the Annex 2, there are two paragraphs that deal with the “insurance” concept: the 7th which is focused on “income insurance and income safety-net programmes”; and the 8th which deals with the “crop insurance schemes” (*URAA*, 1994). According to *Rude* (2001), there are two main justifications of these programmes. The first is a simple economic theoretical issue, explained by the market failures, saying that the contingency markets⁶ force farmers to deal with production and price risk. The second point of view is a resource reallocation, so these kinds of programmes are originated and based on income reallocation to the farmers from the industrial sector. *Rude* also argues (2001) the redistribution is not the same across time and across individuals, which is an interesting concept. He also claims that as the objectives of the two points of views are so different, it is difficult to develop standard criteria for these programmes.

To insure farmers’ income, either the policy creates a “*missing market*” or tries to raise a bridge system between good and bad income periods. Consequently, these policy instruments are not neutral for the market, and can have a strong influence on the equilibrium; however, they should be decoupled under the URAA. The income insurance policies are extremely strong instruments, and to decouple them from production decisions is not so straightforward, since they are designed to affect producers’ behaviour according to market failures. Moreover – as *Rude* claims (2001) – if an insurance policy compensates for bad periods but does not tax in good times, it will automatically raise the income level and stimulate a gradual rise in the production. Therefore, the criteria contained in paragraph 7 are very important. These exclude the possibility of distortion and place strict limits on the amount that can be used for these programs. Also, a criteria which, for instance, declares that income safety payments must be related to income and not to price or level of production, limits the possibility of a market distortion effect and makes the policy more neutral (*Rude*, 2001).

⁶More information about contingency market issues available at Contingency Analysis <http://www.contingencyanalysis.com>

Then, again, policies can achieve risk reduction by forcing and improving diversification in the production and by adopting new technology. In this case, to reach the aim it could be helpful to connect the policy with a credit policy, as has been done in Hungary, for instance (MARD, 2005). However, the information channels must be clear between the policy makers and the farmers, because if the flow of the information is not secure and appropriate, although the aims are right and decoupled, the outcome may be different than intended.

Crop insurance programs are also criticised as not being decoupled enough. This criticism originates from theory that these programs may encourage farmers to farm on fields where the production risk is higher (Rude, 2001). Consequently, although the production at that field will be naturally poorer than in the areas that are more appropriate for crop production, the aggregate level of production can increase. Moreover, there is an argument whether these programmes encourage the aims of the agri-environmental feature of the EU agriculture. According to Rude (2001), there are two researcher groups who are arguing directly the opposite of each other. Whereas, cited by to Rude (2001), Horowitz & Lichtenberg stated that crop insurance programs lead to an increase in the use of pesticides and fertilisers, Smith & Goodwin concluded exactly the opposite of this theory (Rude, 2001). Thus, in the former theory, the policy will result in an increase in the production level, the latter will decrease the current production, so from this point of view the system seems to be more neutral and acceptable.

As can be seen, the issue of the insurance policies, which play a significant role in the CAP, has not settled down yet, and has been widely criticised. The policies are strongly objected to in both theoretical and implementation concepts. However, this kind of support for farmers is vital to enable them to participate in the market system and to produce on a steady level⁷.

The issue of the agri-environmental programmes

As was mentioned above, improved diversification is also a good method to increase the safety of the farmers, and it is decoupled and based on the URAA Annex 2, also. This idea, additionally, fits well into the “multifunctional” theory of European agriculture. Environmentally friendly agriculture, which puts less pressure on nature, is also a highly debated issue. Although environmentally friendly production is widely accepted, there is strong criticism against the EU’s “multifunctional” idea, which contains those elements. In the URAA Annex 2, the 12th paragraph particularly deals with environmental programmes. Albeit EU launched its agri-environmental policy according to those determinations, this policy is strongly criticised by the developing countries as being just an “umbrella” and “excuse” for a hidden and not decoupled subsidy system (Glebe, 2003). There are even voices which, although agreeing with the aims of the EU’s agri-environmental policy, call it just a “*new label and trick*” of the European agro lobby “*to do business as usual and to hide protectionist policies behind*” this title (Mahe, 2001). Moreover, according to Glebe (2003), the payment scheme before the SFP did not lead to an improvement in the landscape and biodiversity, although one of the main aims of the environmentally friendly and multifunctional system is to improve these and analogues factors. In addition, there was another reason why these programmes were widely discussed, namely in the EU countries farmers were given a premium for using

⁷During my research I could not find any new declaration about income insurance projects in the SFP scheme.

fewer chemicals, rather than tax incentives, which makes it a somewhat controversial paradox (Glebe, 2003). However, *Latacz-Lohmann and Hodge* argues (2001) that although the agri-environmental policies may have more than minimal effect on the production and trade, they do not contradict the fair trade requirement agreements even though they are not 100% decoupled.

As this section showed, the idea of “multifunctionality ” is strongly objected to, also, and criticised as being just an extra “excuse” for the coupled and non-market neutral support system of the EU. However, this issue will play a major role in the CAP system in the future as environmental and conservation issues are getting to be more and more important within the EU.

CONCLUSIONS

We have seen that the EU’s subsidy policy before the SFP was highly debated among the professionals as to whether it was appropriate to the context of the URAA and its box system. Moreover, it was directly questioned whether the policy could have been defended and justified in the long term.

The system before the SFP was widely criticised. Firstly, there was a basic theoretical argument among professionals since the idea of decoupling can be reflected from two different points of view, according to the URAA declarations. Secondly, according to the quoted professionals in the paper, the policy may did not pay enough attention to the farmers’ “expectation mechanism”, and, therefore, it became coupled and led to market distortions. Thirdly, there were papers, which recommended the restructuring of the whole Green box system and argued that it just operates as income insurance for the farmers in the industrialised countries, and pushes the developing countries into an even worse and more unfair market position. Finally, the EU’s Agri-Environmental concept also is strongly criticised as being just an extra “excuse” for not decoupling payments. In addition, there is no consensus among European professionals about the agricultural finance, but it is agreed that the CAP is vital for European Agriculture.

In the view of all these criticism and issues, it is not surprising that the EU changed its CAP and launched the SFP. However, whether the SFP will be more accepted among countries at the international level is still an issue.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank Professor Alan Swinbank from the University of Reading for his professional support, and, also, the Chevening Scholarship for its financial support which furthered my work at the University of Reading.

REFERENCES

- Beard, N., Swinbank, A. (2001). Decoupled payments to facilitate CAP reform, Food Policy 2. 121-145.
- Europa (2004). Accessed on 13/02/2005, last updated 01/06/2004.
www.europa.eu.int/scadplus/leg/en/lvb/l11089.htm
- Frandsen, E.S., Brigitte, G., Hans, G.J. (2002). Decoupling Supports in Agriculture, Impacts of redesigning European Agricultural Support, Danish Research Institute of Food Economics, Oxford, UK: 2003. 2. 106-131.

- Glebe, W.T. (2003). Multifunctionality: How „Green“ is the „European Model of Agriculture“, Techinsche Universitat München, München.
- Gohin, A., Guyomard, H., Le Mouel, C. (1999). Measuring the Degree of Decoupling of Alternative Internal Support Policy Instruments: The Green Box Issue, European Agriculture Facing. The 21st Century in a Global Context, EAAE IX Congress, Warsaw, 78-95.<http://www.rennes.inra.fr/economie/pdf/AJAE1.pdf>
- Rude, J. (2001). Under the Green Box – The WTO and Farm Subsidies. Journal of World Trade, 5. 1015-1033.
- Latacz-Lohmann, U., Hodge, I. (2001). Multifunctionality and free trade conflict or harmony? EuroChoices, Tangley Andover, 42-47.
- MARD (Ministry of Agricultural and Rural Development) (2005). Europe Plane – Agricultural Credit Program 2004, accessed on 06/02/2005.
<http://www.fvm.hu/main.php?folderID=872&articleID=6164&ctag=articlelist&iid=1>
- Mahe, L.P. (2001). Can the European Model be Negotiable in the WTO? EuroChoices, Tangley Andover, 10-15.
- OECD (2001). Decoupling: A Conceptual Overview.
<http://www.oecd.org/dataoecd/23/51/25481500.pdf>
- Szendrő, MARD (Ministry Agricultural and Rural Development) (2004).
<http://www.otk.hu/cd03/2szek/Szendr%C5%91D%C3%A9nes.htm>
- URAA, Uruguay Round Agreement on Agriculture (1994).
www.wto.org/english/docs_e/legal_e/14-ag.pdf
- Walter, J., Trine, V.J. (2001). The CAP and the international trade negotiations. Rapport nr. 123 Statens Jordbrugs- og Fiskeriøkonomiske Institut, København.

Corresponding author (*levelezési cím*):

Béla Imre Kárpáti

University of Reading, Faculty of Life Sciences, School of Agriculture
Policy and Development
The University of Reading, Earley Gate, Whiteknights Road, Reading RG6 6AR
United Kingdom
Readingi Egyetem, Élettudományi Kar, Agrárpolitikai és Fejlesztési Iskola,
Tel.: +44 (0) 118 378 8882
e-mail: karpatibela@yahoo.co.uk

9408 Brennbergbánya, Soproni u 22. Hungary
Tel: +36 99 354514

Rövidített útmutató a kéziratok elkészítéséhez

A folyóirat tárgyköre magában foglalja az állati termék előállítás teljes vertikumát, az állatok elhelyezésétől a nemesítésen, takarmányozáson, szaporításon és egészségvédelmen át az állati termékek feldolgozásáig, ill. értékesítéséig, beleértve e részterületek elméleti, alapozó vonatkozásait is, mint pl. az élettant, a mezőgazdasági kémiát, valamint vizsgálati módszereiket. Ezeken túlmenően helyet kapnak a növénytermesztés, az ökonómia, a környezetvédelem tárgykörét érintő közlemények is.

Az Acta Agraria Kaposváriensisben csak olyan írások közölhetők, melyek más kiadványban még nem jelentek meg -kivéve a kongresszusi előadásokat-, ill. amelyeknek nincs folyamatban publikálásuk. A kéziratot az alábbi címre kell eljuttatni.

Acta Agraria Kaposváriensis Szerkesztőbizottsága
Pannon Agrártudományi Egyetem, Állattenyésztési Kar
7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40.
Tel.: 36-82-314-155, Fax: 36-82-320-175
e-mail: kutszerv@atk.kaposvar.pate.hu

A cikket 3 példányban, *dupla sorközzel*, Winword 6.0 (vagy hasonló és konvertálható) szövegszerkesztő programmal, *Times New Roman CE betűvel* (12-es nagyság) sorkizárt formában, A4-es méretben, a lapnak csak az egyik oldalára gépelve kérjük benyújtani. A kézirat ne haladja meg a 8000 szót, ami kb. 20 oldalnak felel meg, mely ábrákkal, összefoglalással és irodalomjegyzékkel együtt értendő. Kivételes esetben, a szerkesztőbizottság hosszabb cikkek elfogadására is javaslatot tehet. A cikkek nyelve magyar, vagy angol.

A *cím* legyen tömör, maximum 20 szóból álljon, 20-as nagyságú félkövér betűvel írva, középre igazítottan. Felette kérjük adja meg a fejléc szövegét is. A szerző(k) nevét 15-ös normál betűvel kérjük írni, középre illesztve. Magyar nyelvű cikknél pl. Kiss J., Martin, T.G., Tóth J., angolnál, J. Kiss, T.G. Martin, J. Tóth legyen az írásmód. A szerzők neve alá 10-es normál betűvel írják a munkahelyet, címmel együtt, középre rendezetten.

Az első *összefoglaló* a kézirat nyelvével megegyező, a második - angol közlemény esetén magyar, magyar cikk esetén angol legyen. Az összefoglalás szót középre illesztve, 15-ös döntött félkövér nagybetűvel, szövegét 12-es normál döntöttel kérjük írni. Mindkét összefoglalót követően zárójelben adják meg a közlemény kulcsszavait, normál betűvel (max. 5 szó, vagy fogalom). Az összefoglalás ne haladja meg a 200-250 szót (egy oldal). A kézirat nyelvével ellentétes összefoglaló címét 12-es normál félkövér betűvel, szerzőinek nevét 12-es, munkahelyét 10-es normállal kell írni, középre igazítva.

Az egyes *fejezetek* (bevezetés stb.) címét középre illesztve 15-ös nagy, az alcímeket balra rendezetten 12-es normál félkövér betűvel kérjük írni. A bekezdések (kivéve a fejezet és alfejezet kezdőt, ill. a táblázat, ábra, kép, "francia jelzésű" (-) rész utáni első), egy tabulátor jellel kezdődjenek. A kiemelő szavak és mondatrészek jelölése dőlt betűvel történjen.

A dolgozat tartalmáért írói felelnek. A beérkezett kéziratot a szerkesztőség lektoráltatja, majd visszaküldi a szerzőnek javításra, ha szükséges. A javított kéziratot két pld.-ban kinyomtatva ill. 3.5"-es mágneslemezen kérjük a szerkesztőséghez eljuttatni.

A közlemény részei

Bevezetés

A szövegben a hivatkozást a szerző(k) családnévvel (dőlt betűvel írva) és a mű megjelenésének évszámával (zárójelbe téve) kérjük megadni. A név kiemelésekor a zárójel elmarad.

Anyag és módszer

Eredmény és értékelés

A megjelenő cikkben, ebben a fejezetben nyernek majd elhelyezést a táblázatok, ábrák stb. A kéziratban, azonban csak azok tervezett helyét kérjük megjelölni. A jobb szerkeszthetőség érdekében a táblázatok és ábrák a cikk végén, külön-külön oldalon szerepeljenek. A szövegben hivatkozzon rájuk (a sorszám után a táblázat szót dőlt betűvel írva).

Következtetések

Köszönetnyilvánítás (ha szükséges)

Irodalom

Csak a közleményben idézett műveket tartalmazhatja. Ezeket sorszám nélkül, az első szerző családi neve szerint ABC sorrendben kell felsorolni. Hivatkozásként, az összes szerzőt tüntesse fel, vesszővel elválasztva. Ezt, a megjelenés évszáma kövesse, zárójelbe téve, majd a mű címe, a folyóirat megnevezése (ha van, nemzetközileg elfogadott rövidítéssel), az évfolyam- és kötetszám, a szám, ill. a közlemény kezdő és befejező oldalszáma (kötőjellel) írandó. Könyv esetén a szerző(k) neve és az évszám után a könyv címe eredeti nyelven, a kiadó neve, székhelye és az oldalszám következzen. A publikáció második, ill. további sora egy tabulátor jellel kezdődjön, az első szerző kiemelése érdekében.

Levelezési cím (az első szerző posta, ill. e-mail címe, telefon- és faxszáma)

Táblázat, ábra, kép stb.

Elhelyezésüket a cikk végére kérjük, külön-külön oldalra. Fejezetben belül, csak azok tervezett helyét jelöljék. A táblázat, ábra... sorszámát balra rendezetten, címét középre illesztve, 12-es félkövér betűvel kell írni. A diagramokat Excelben javasoljuk megrajzolni. A táblázatokat a Winword táblázat szerkesztőjével készítsék, az ábrákat azonban - a konvertálhatóság miatt - ne a beépített rajzolójával alkossák meg, hanem használjanak helyette pl. Corel Draw, AutoCAD... programot. A táblázatok stb. alatt közöljék először a cím, majd a szöveges rész (zárójelben számozva) fordítását. A diagramok, rajzok... forrás fájljait is kérjük mellékelni. A fekete-fehér fotók hátoldalán a szerző(k) nevét és az ábra számát tüntessék fel. Az utóbbit, a hozzá tartozó címmel együtt listán szíveskedjék csatolni. *(Részletes útmutatót a szerkesztőbizottság kérésre postán küld!)*

Rövidített útmutató az áttekintő (review) cikk készítéséhez

Korlátozott számban a szerkesztőség elfogad un. áttekintő (review) közleményt is, amennyiben a feldolgozott téma szakmai aktualitásához nem fér kétség és az elmúlt 3 évben az adott témakörben nem jelent meg sem hazai, sem külföldi szakfolyóiratban hasonló témájú dolgozat. Az áttekintő cikk elkészítésének technikai követelményei (sortávolság, betűnagyság, szövegszerkesztő program stb.) és általános előírásai (terjedelem, a kézirat nyelve...) megegyeznek a korábban leírtakkal.

Az áttekintő cikknek az alábbi fontosabb fejezeteket kell tartalmaznia:

- összefoglalás
- bevezetés (célkitűzés)
- következtetések
- irodalom

Guidelines in brief for the preparation of manuscripts

The subject sphere encompassed by the journal covers the entire spectrum of the production of animal products, ranging from livestock accommodation, via breed improvement, nutrition, reproduction and the maintenance of health to the processing and marketing of animal products, including the respective theoretical, fundamental aspects of these subfields, such as physiology and agricultural chemistry, and also pertinent examination methods. In addition to these topics space in the journal is also devoted to publications relating to the fields of plant production, economics and environmental protection.

The Acta Agraria Kaposváriensis accepts only papers which have not appeared in other publications, the exception being congress presentation; nor should they be in the process of publication. Scripts should be submitted to following address:

Acta Agraria Kaposváriensis Editorial Board
Pannon University of Agriculture, Faculty of Animal Science
H-7400 Kaposvár, Guba S. u. 40.
Tel.: 36-82-314-155. Fax: 36-82-320-175
e-mail: kutszerv@atk.kaposvar.pate.hu

Three copies of the paper should be submitted; these should be typed *double* spaced using Winword 6.0 (or a similar, convertible programme) in *Times New Roman CE* font, with 12 pt character size and in justified paragraph form. Copies should be printed on A4 paper, only one side to be used. Manuscript length should not exceed 8000 words, which corresponds approximately to 20 pages. This length of 20 pages is to include any tables and illustrations used, in addition to the abstract and references. In exceptional cases the editorial committee may recommend that longer articles be accepted. The language of articles should be Hungarian or English.

Titles should be concise, consisting of a maximum of 20 words, and should be typed in bold 20 pt size characters. Authors are requested to include the text for the running head above the title. Authors' names should be typed, centred, using normal 15 pt size characters. For articles written in Hungarian the form Kiss J., Martin, T.G., Tóth J. should be used; for articles written in English, J. Kiss, T.G. Martin, J. Tóth. The place of employment of each author and the address of the institution/company should be entered, centred, beneath the authors' names, using normal 10 pt size characters.

The first *abstract* is to be in the language of the paper; the second should be in Hungarian for articles written in English and vice versa. Authors are requested to ensure that the title of each abstract is written centred and in bold italic 15 pt upper case characters, while its text should be written in 12 pt size normal italics. At the end of each abstract the relevant keywords should be given in brackets, typed in normal characters (max. 5 words or concepts). The abstract should not exceed 200-250 words (one page) in length. The title of the abstract written in the language not used in the paper should be written, centred, in 12 pt normal bold characters, followed by the names of the authors in normal 12 pt characters, and subsequently the place of employment of each author in normal 10 pt characters.

Titles of the respective *sections* (introduction, etc.) should be written centred and in 15 pt size bold upper case characters. Subtitles are to appear aligned to the left in 12 pt size bold lower case. Paragraphs (with the exception of those beginning sections or subsections, and the first paragraph after table, diagram, illustration or text in French style layout (i.e., points beginning with dashes or bullets)) should begin with one tabulator space indentation. Authors are requested to mark in italics any words or phrases to be emphasised.

Constituent sections of the publication

Introduction

Authors are requested to bracket after each reference the surname of the author(s) (in italics) and the year of publication of the work to which reference is made. If the name is stressed as a component part of the text it should not be bracketed.

Material and method

Results and discussion

This section of any paper to be published should include table, diagrams, etc.. Authors are however requested simply to mark in the text positions allocated to such graphic items. In the interest of achieving better editability tables, diagrams, etc. should appear at the end of the paper, on separate pages, in the script submitted. Reference should be made in the text to such inclusions (in italics, the word *table* followed by its number).

Conclusions

Acknowledgements (if applicable).

References

These should include only works referred to in the publication. References should be listed without numbers, in alphabetical order of main author's surname. For each citation made the names of all authors contributing to article should be quoted, separated by commas. The year of publication should follow in brackets, and subsequently the title of the work, the title of the journal in which it appeared (where appropriate using internationally recognised abbreviations), the year of publication or volume number and the first and last page numbers (separated by a hyphen) in the publication of the relevant paper. Where books are cited, the name(s) of the author(s) and the year of publication should be followed by the original title of the book in its language of publication, the name of the publishing company and the town/city in which it is based, and the numbers of the pages cited. Authors are requested to ensure that the second and subsequent lines of each reference begin with one tabulator space indentation, to give prominence to the name of the main author.

Correspondence address

The postal and e-mail address of the main author, and telephone and fax numbers on which he/she may be contacted, should be included.

Tables, diagrams, illustrations, etc.

Authors are requested to position such inclusions at the end of the paper, on separate pages. The positions allocated to these should be marked within the appropriate section of the text. Numbers of tables, diagrams, etc. should be aligned to the left and their titles centred, both in 12 pt size bold characters. It is requested that Microsoft Excel be used for the composition of diagrams. Tables may be compiled with the Winword table facility; however, in the case of other figures, due to the need for convertibility, the drawing facility installed with Winword should not be used, but a separate programme such as Corel Draw or AutoCAD. Beneath each table etc. authors should include a translation into the language (English or Hungarian) not used in the paper of the title and the text components (with referring numbers in brackets). It is requested that source files for diagrams, illustrations etc. be enclosed with the submitted paper. Black and white photographs should be marked on the reverse side with the name(s) of the author(s) submitting them and their illustration number. Authors should include a list of illustration titles with their respective numbers.

(Detailed guidelines will be posted on request by the editorial board.)

Guidelines for the composition of review articles

The editorial board will also accept a limited number of review articles, should there be no doubt as to the professional topicality of the subject dealt with and providing that no paper on a similar topic within the given subject sphere has been published in the previous three years in any Hungarian or international journal. The technical stipulations for the composition of review articles (length, language used, etc.) correspond to those outlined above for the preparation of manuscripts.

Review articles should consist of the following:

- abstract
- introduction (objective)
- conclusions
- list of literature cited.