

ÉLELMISZER TUDOMÁNY TECHNOLÓGIA

A MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM SZAKFOLYÓIRATA



Szakál Dorina, Fehér Orsolya, Szlovensák Luca, Gere Attila

Élelmiszer-választás előrejelzése szemmozgás adatok alapján

A szerzők elérhetősége

Szakál Dorina¹ | PhD-hallgató
szakal.dorina@gmail.com | <https://orcid.org/0000-0003-3645-1076>

Fehér Orsolya¹ | egyetemi docens
feher.orsolya@uni-mate.hu

Szlovensák Luca² | egyetemi hallgató
szlovensak.luca@stud.uni-mate.hu

Gere Attila² | egyetemi docens
gere.attila@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0003-3075-1561> | levelező szerző

A szerzők munkahelye

¹MATE, Mezőgazdasági és Élelmiszeripari Vállalati Gazdaságtan Tanszék
Munkahely címe: 1118 Budapest, Villányi út 29-43.

²MATE, Árukezelés, Kereskedelem, Ellátási Lánc és Érzékszervi Minősítés Tanszék
Munkahely címe: 1118 Budapest, Villányi út 29-43.



Összefoglalás

Napjainkban számos inger ér minket életünk minden területén, melyek mind hatással vannak döntéseinkre, beleértve az élelmiszerválaszt is. A döntéshozatal során a szemmozgás számos információt nyújt, melyek segítségével megismerhető a döntéshozatali folyamat és ennek megfelelően például a gyártók kitudják alakítani az ideális csomagolást vagy a kiskereskedelmi egységekben megfelelően tudják kialakítani a polcképet. A termékválasztás egy meghatározó lépés a vásárlás során, így ennek vizsgálata fontos és informatív.

A mérésünk során 61 résztvevő szemmozgását követtük egy statikus szemkamera segítségével. A mérés során a résztvevőknek egy 4 alternatívás kötelező választásos (4AFC) képsorozatot mutattunk be, a képek négy különböző ízű táblás Milka csokoládét tartalmaztak. A résztvevők feladat az volt, hogy kiválasszák az általuk leginkább kedvelt terméket. A termékválasztás során a következő paramétereket mértük: fixációk és látogatások száma, valamint azok hossza, illetve az első fixációig eltelt időtartamot és az első fixáció hosszát. Az eredmények értékelése során megállapítottuk, hogy a termékalternatívának szignifikáns hatása van a szemmozgás paraméterekre. A résztvevők szignifikánsan nem néztek többet a kiválasztott termékre, vagyis az egyik résztvevő nem néz többet az általa kiválasztott termékre, mint a másik résztvevő az ő általa választott termékre. A résztvevők az általuk kiválasztott termékre szignifikánsan többet néznek.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a termékminták nem befolyásolták a szemmozgási paramétereket az első fixációig eltelt időtartam kivételével. Ezt a kivételt a képek elhelyezkedésével magyarázható, ugyanis az olvasás miatt az emberek többsége a bal felső sarokból indul, majd az óramutató járásával azonos irányban halad tovább. Az eredmények alapján az is elmondható, hogy a választott termékre tényleg nagyobb vizuális figyelem érkezett, mind a látogatások és fixációk esetén, viszont az első fixációig eltelt idő és az első fixáció hossza nem befolyásolta a döntést. Vagyis a résztvevők nem minden esetben azt a terméket választották, amit először megpillantottak. A szemmozgási paraméterek és a választások közötti interakciókat megvizsgálva az állapítható meg, hogy a legnagyobb vizuális figyelmet a málna ízesítésű Milka csokoládé kapta, már a legelső látogatás alkalmával is. A legkisebb vizuális figyelmet az eper ízesítésű Milka csokoládé kapta, mind a látogatások, mind a fixációk szempontjából.

Kulcsszavak: szemmozgás, szemkamera, élelmiszer-választás, Tobii

Bevezetés

Manapság észre sem vesszük, hogy számos tényező befolyásolja az élelmiszerválasztással kapcsolatos döntéseinket. A pillantásunkat akkor ragadja meg valami, ha az nagyon kirívó és vonzza a tekintetet. Ez általában a két szélső véglet fennállásakor következik be: ha nagyon szépnek vagy nagyon taszítónak, csúnyának találunk valamit. A gyártók szeretnék elérni, hogy a vásárlók az ő terméküket válasszák és ezért mindent meg is tesznek. Sok esetben nem a termék belső tartalma miatt vesszük meg azt, hanem a csomagolás, a termék polcon való elhelyezése vagy a reklámok miatt.

A szemkamera már régóta ismert és használt eszköz az egyének vizuális figyelmének tanulmányozására. Segítségével nyomon tudjuk követni a résztvevők szemmozgását: hova és mennyi ideig néz, hova nézett először és mennyi ideig nézte az adott terméket.

Az érzékszerveink azok, amik összekötnek bennünket a környezetünkkel. S szemünk a legfontosabb érzékszervünk, hiszen a környezetünkből érkező információk mintegy 80%-a rajta keresztül jut az agyunkba. A látás fontosságát az is alátámasztja, hogy az agyunk térfogatának egynegyedét a vizuális képfeldolgozás és integráció foglalja el. Mivel nagyobb területet foglal el az agyban a vizuális feldolgozás, így többet is tudunk a látásról, mint a többi érzékszervünkről (Zurawicki, 2010).

Ahogy a kutatók egyre mélyebben megértik az emberi érzékszervek működését, a marke-tingeseknek egyre nagyobb rálátásuk lesz, hogy a fogyasztók hogyan reagálnak a különböző érzetekre (Zurawicki, 2010). Köztudott, hogy egy terméket észre kell venni a polcon ahhoz, hogy esélye legyen bekerülni a bevásárlókosárba. Következtetésképpen, egyre nagyobb a kereskedelmi érdeklődés a vizuális figyelemnek a fogyasztói választásban betöltött szerepe iránt (van der Laan et al., 2015). Mivel a vizuális figyelem számos kontextusban szükséges a kiválasztáshoz, a kiválasztás összetett folyamatának megfejtéséhez meg kell érteni, mi vonzza a vizuális figyelmet, mi tartja fenn és hogyan befolyásolják ezek a tényezők a kiválasztást. Ez a probléma kihívást jelent, mivel a folyamat számos tényezőt érint - az alacsony szintű vizuális tényezőktől, mint például a vizuális kiemeltség és az elemek pozíciója, a magas szintű szemantikai tényezőig, mint például a felhasználó érdeklődése vagy preferenciái a különböző elemekkel kapcsolatban (Navalpakam et al., 2012).

Jovancevic-Misic és Hayhoe (2009) egy természetes környezetben végzett szemmozgás-vizsgálatban kimutatták, hogy a résztvevők megtanulnak figyelni a környezet fontos eseményeire és hogy a fixálás

valószínűsége, valamint az egyes fixációk időtartama nő, míg az inger első fixálásához szükséges idő csökken a fontos események esetében, ahogy a résztvevők egyre tapasztaltabbá válnak a feladatban. A tanulás egy másik perspektívája a szakértelem figyelemre gyakorolt hatásain keresztül valósul meg. A vizualizációk megértésére gyakorolt szakértői hatásokkal kapcsolatos vizsgálatok azt mutatják, hogy a szakértők rövidebb ideig fixálnak, több fixációt végeznek a releváns területekre és kevesebbet fixálnak az irreleváns területekre (Orquin et al., 2016).

Krajbich és munkatársai (2010) kutatása szerint a fixáció befolyásolja a résztvevők végső döntését és ez a választás torzításához vezet. A kutatási modellük azt is kimutatja, hogy a kulturális normák (például a balról jobbra olvasás) hogyan léphetnek kölcsönhatásba az összehasonlító folyamatokkal, hogy kulturális döntési torzulásokat eredményezzenek. Ezek a torzítások segítenek megmagyarázni például azt, hogy miért értékesebb a polcon és a számítógép képernyőjén balra fent lévő terület, mint más pozíciók. Továbbá az ide kapcsolódó tanulmányok kimutatták, hogy a relatív fixációs időtartamok exogén manipulálásával torzítani lehet a választásokat. Az utolsó megállapítás pedig, hogy valószínűleg az lesz a preferált termék, amire az utolsó fixáció esik.

Jelen kutatás célja, hogy meghatározzuk a választás miként befolyásolja a szemmozgási paramétereket, vagyis a fixációk és látogatások hosszát és mennyiségét, illetve az első fixáció hosszát és mennyiségét, valamint, hogy ezen adatok tudatában miként lehet megjósolni az alany választását.

Anyagok és módszerek

A mérés a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem hallgatói részvételével készült. Összesen 61 fő (37 nő, 24 férfi) vett részt a kutatásban, akik többségében 20 és 23 év közöttiek voltak. A résztvevők mindegyike a csokoládé termék-kategóriába tartozó termékeket láttak a számítógép monitorján, ezen belül is a Milka márka egyes termékei közül kellett választaniuk. A méréshez a Tobii Pro X2-60 (Tobii Pro AB, Danderyd, Svédország) szemkamerát és a Tobii Pro Lab v.1.171 (Tobii Pro AB, Danderyd, Svédország) szoftvert használtuk. A szemkamerát a számítógép monitorjához rögzítettük, amely a résztvevők szemétől körülbelül 60 cm távolságra helyezkedett el. A mérés fontos aspektusa volt, hogy nyugodt, csendes körülmények között végezzük, melyhez az egyetem egyik kisebb méretű (18 m²) tantermet használtuk.

A mérés egy 9 pontos kalibrációval kezdődött, melynek során egy kört kellett a résztvevőknek a szemükkel végig követni úgy, hogy közben a fejüket

nem mozgathatták. A sikeres kalibrációt követően a monitoron az előzetesen összerakott képsort (timeline-t) prezentáltuk. A legelső dián egy tájékoztató szöveget láthattak a résztvevők, mely informálta őket a mérés menetéről. Ezt követően egy gyakorló képtriád következett: egy fixációs kereszt, egy kép 3 termékkel – melyek eltérőek voltak a mérés tárgyától –, mellyel megismerkedtek a termékekkel, végül tovább kattintva ugyan azt a 3 terméket tartalmazó képet láthatták, de ebben az esetben az egérrel kattintva választaniuk kellett a termékek közül. A gyakorló képeket követően a tényleges mérés következett, ahol a korábban említett módon képtriádok jelentek meg, ezúttal viszont a csokoládé termékek közül kellett választaniuk. A termékek az alábbiak voltak: Milka eper, Milka málna, Milkaogyoró és Milka Oreo. A mérés alatt a következő paramétereket mértük:

- TFF (Time to First Fixation, első fixációig eltelt idő),
- FFD (First Fixation Duration, első fixáció időtartama),
- FD (Fixation Duration, fixáció időtartama),
- FC (Fixation Count, fixációk száma),
- DD (Dwell Duration, látogatások időtartama) és
- DC (Dwell Count, látogatások száma).

A mérés során kapott eredményeket ismételt mérés varianciaanalízissel (Repeated Measures Analysis Of Variance, RMANOVA) elemeztük ki.

Eredmények és értékelésük

A szemkamerás mérések eredményei szinte minden esetben a várt értéket mutatták. Megállapítottuk, hogy egy résztvevő a négy termék szemlélésében van különbség, vagyis a termékalternatívának szignifikáns hatása van a szemmozgás paraméterekre. Ezen felül azt is megállapítottuk, hogy az egyes résztvevők választása között nincs szignifikáns különbség, tehát az egyik résztvevő nem néz többet az általa kiválasztott termékre, mint a másik az ő általa preferált termékre. Végül, de nem utolsó sorban azt is megállapítottuk, hogy a résztvevők nagyobb vizuális figyelmet fordítottak arra a termékre, amit végül választottak, tehát szignifikáns különbség tapasztalható a választás és a termék kölcsönhatása között.

A szemmozgásra vonatkozó paraméterek esetében azt az eredményt kaptuk, hogy maguk a minták nem befolyásolták sem a látogatások számát és időtartamát, sem a fixációk számát és időtartamát, sem pedig az első fixáció hosszát, viszont az első fixációig eltelt időtartamot befolyásolták. Ezt a minta elhelyezkedésével magyarázzuk, hiszen az emberek az olvasás miatt hajlamosak a bal sarokból indulni, majd

óramutató járásával azonos irányban haladni. Továbbá megállapítottuk azt is, hogy a választott termékre több látogatás és fixáció esett, időtartamuk is hosszabb volt, viszont az első fixációig eltelt időtartam és az első fixáció hossza nem volt hatással a döntésre. Tehát a résztvevők nem feltétlenül az először megpillantott terméket választják.

Az elemzés utolsó részében megvizsgáltuk, hogy az egyes paraméterek és a választás között milyen összefüggések vannak a négy csokoládé mintára lebontva. Azt az eredményt kaptuk, hogy a legnagyobb vizuális figyelmet egyértelműen a málna ízesítésű termék kapta, melyet mind a fixációk, mind a látogatások eredményei alátámasztottak. Az első látogatások során is jobban szemrevételezték a résztvevők a málna ízesítésű Milka csokoládét. Ez azzal magyarázható, hogy az emberek nem ismerik annyira jól ezt a terméket, ezért több részletre fixáltak és több ideig időztek rajta, akár visszaugrált a pillantásuk rá. Ezzel ellentétben a legkisebb figyelmet az eper ízesítésű csokoládé kapta, jóval elmaradt a többi termék értékeitől. Valószínűleg az eper ízesítésű Milka csokoládé ismertebb a köztudatban, ezért átlagosnak tartották a résztvevők és mint jól tudjuk, az átlagos nem hívja fel a figyelmet magára, ezért gyorsan tovább ugrott a pillantásuk a következő termékre.

Következtetések, javaslatok

Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy rendkívül hasznos lehet a vásárlók szemmozgását rögzíteni olyan esetekben, amikor arra vagyunk kíváncsiak, hogy milyen terméket fog választani a vásárlás alkalmával, hiszen a mérési eredmények segítségével meg lehet jósolni mely termék lenne az, amit szívesen választanának és fogyasztanának, ugyanis az a termék, amelyik nagyobb vizuális figyelmet kap, az valószínűleg jobban tetszik nekik, így nagyobb valószínűséggel kerül bele a vásárlók kosarába. Ezek ismeretében a jövőben olyan érdekes szoftverek fejlesztésére is lehetőség nyílhat, mint a Pizza Hut 2014. évben elkészített applikációja, amely a szemmozgás követésével összeállítja a vendég számára leginkább tetsző alapanyagokból a tökéletes pizzát (Pizza Hut, 2014).

Köszönetnyilvánítás

SZD köszönetét fejezi ki a MATE Gazdasági- és Regionális Tudományok Doktori Iskolájának. GA köszönetét fejezi ki az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj Kuratóriumának. A kutatás a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal támogatásával jött létre (FK 137577 és K 134260).

Irodalomjegyzék

- Jovancevic-Misic, J., Hayhoe, M. (2009): Adaptive gaze control in natural environments. *Journal of Neuroscience*, 29(19), 6234–6238. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5570-08.2009>
- Krajbich, I., Armel, C., Rangel, A. (2010): Visual fixations and the computation and comparison of value in simple choice. *Nature Neuroscience*, 13(10):1292–1298. <https://doi.org/10.1038/nn.2635>
- Navalpakkam, V., Kumar, R., Li, L., Sivakumar, D. (2012): Attention and selection in online choice tasks. *Lecture notes in computer science (Including Subseries lecture notes in artificial intelligence and Lecture notes in bioinformatics)*, 7379 LNCS, 200–211. https://doi.org/10.1007/978-3-642-31454-4_17
- Orquin, J.L., Ashby, N.J.S., Clarke, A.D.F. (2016): Areas of interest as a signal detection problem in behavioral eye-tracking research. *Journal of Behavioral Decision Making*, 29(2–3):103–115. <https://doi.org/10.1002/bdm.1867>
- Order a pizza with your eyeballs: Pizza Hut's eye tracking menu. Elérés 2022. április 05., forrás: <https://blog.pizzahut.com/order-a-pizza-with-your-eyeballs/>
- van der Laan, L.N., Hooge, I.T.C., De Ridder, D.T.D., Viergever, M.A., Smeets, P.A.M. (2015): Do you like what you see? The role of first fixation and total fixation duration in consumer choice. *Food Quality and Preference*, 39:46–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2014.06.015>
- Zurawicki, L. (2010). *Neuromarketing. Exploring the brain of the consumer* (2010th edition). Springer.

Prediction of food choice based on eye movement data

Szakál D., Fehér O., Szlovecnsák L., Gere A.

Abstract

Nowadays, we are exposed to many stimuli in all areas of our lives, all of which affect our decisions, including food choices. During decision-making, eye movement provides a lot of information, with the help of which the decision-making process can be understood and accordingly, for example, manufacturers can design the ideal packaging or the shelf image in retail units can be properly designed. The choice of product is a decisive step during the purchase, so its examination is important and informative.

During our measurement, we followed the eye movements of 61 participants using a static eye camera. he participants were shown a series of 4 alternative forced choice (4AFC) pictures, the pictures contained four Milka chocolate bars with different flavors. The task of the participants was to choose the product they liked the most. During product selection, we measured the following parameters: number of fixations and visits, as well as their length, the time elapsed until the first fixation and the length of the first fixation. During the evaluation of the results, we established that the product alternative has a significant effect on eye movement parameters. The participants did not significantly look more at the selected product, that is, one participant did not look more at the product he selected than the other participant at the product he selected. Participants look significantly more at the product they have selected.

Based on the results, it can be concluded that the product samples did not influence the eye movement parameters except for the time elapsed until the first fixation. This exception can be explained by the location of the images, because most people start from the upper left corner when reading, and then proceed clockwise in the same direction. Based on the results, it can also be said that the chosen product really received more visual attention, both in the case of visits and fixations, but the time elapsed until the first fixation and the length of the first fixation did not influence the decision. In other words, the participants did not always choose the product they saw first. Examining the interactions between the eye movement parameters and the choices, it can be concluded that the raspberry-flavored Milka chocolate received the most visual attention, even during the very first visit. Strawberry-flavored Milka chocolate received the least visual attention, both in terms of visits and fixations.

Keywords: eye movement, eye camera, food choice, Tobii

Batáné Vidács Ildikó, Kosztik Judit, Tóth Ákos, Kukolya József

Évjárat és léptécsökkentés hatása kukoricaszilázs mikrobiomjának változására a silózás során

A szerzők elérhetősége

Batáné Vidács Ildikó¹ | tudományos főmunkatárs
batane.vidacs.ildiko@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0003-3019-8030> | levelező szerző

Kosztik Judit¹ | tudományos segédmunkatárs
kosztik.judit@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0002-5459-3249>

Tóth Ákos¹ | tudományos munkatárs
toth.akos.gergely@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0003-1204-8119>

Kukolya József² | tudományos főmunkatárs
kukolya.jozsef@uni-eszterhazy.hu | <https://orcid.org/0000-0002-0724-9541>

A szerzők munkahelye

¹MATE, Élelmiszer-biotechnológiai Kutatócsoport
Munkahely címe: 1118 Budapest, Ménesi út 43-45. ²EKE,

Élelmiszertudományi és Borászati Kutatóközpont
Munkahely címe: 3300 Eger, Leányka utca 6.



Összefoglalás

2017-ben egy bálasilót és 8 mikrosilót (200 liter), 2018-ban pedig 8 mikrosilót töltöttünk meg silókukorica szecskával, ahol 150 napon keresztül vizsgáltuk a silózásban szerepet játszó főbb mikrobacsoportok, az összes csíraszám, tejsavbaktériumok, penész- és élesztőgombák számának alakulását. Célunk annak igazolása volt, hogy a kukorica-silózási kísérletekhez létrehozott 200 literes mikrosilók alkalmasak a nagyméretű silókban, mint például egy bálasilóban (800 kg) a silózási folyamat alatt lejátszódó mikrobiológiai folyamatok modellezésére. Eredményeinkkel igazoltuk, hogy a kialakított kísérleti mikrosilók esetében a kisebb méret nem befolyásolta a silózás folyamán a silókukoricában lejátszódó mikrobiológiai folyamatokat, a mikrobiom összetételének változását, megfelelően modellezi az eredeti, jóval nagyobb silókat, használatuk a további oltóanyag-kutatásokra megfelelő.

Kulcsszavak: bálasiló, mikrosiló, mikrobiom, évjárat, léptécsökkentés

Bevezetés

A silózás folyamatát sokféleképpen lehet definiálni, a legáltalánosabban elfogadott, hogy a siló-takarmány, amely zöld vagy nedves termények anaerob körülmények között történő tárolásából és fermentációjából származik (Cullison & Lowry, 1987).

A kukoricaszilázs (*Zea mays* L.) egész kukoricánövényekből készül. Ez az egyik legértékesebb takarmány a kérődző állatok számára, és mindenhol használják, ahol a kukorica növekedhet, a mérsékelt égövtől a trópusokig. A kukoricaszilázs népszerűsége

több tényezőnek köszönhető. Ízletes és nagy energiájú takarmány a kérődzők minden osztálya számára, beleértve a tejelő szarvasmarhákat, húsmarhákat, juhokat és kecskéket. Ez az egyik legjobb hozamú takarmánynövény, kevesebb munkaerőt igényel (mivel egy műveletben takarítják be), és általában olcsóbb az előállítás, mint más takarmánynövények esetében, akár a fagy, eső vagy aszály által károsított kukoricatermést is lehet kukoricaszilázzá alakítani (Arvalis, 2011). Bár viszonylag könnyen előállítható, a kukoricaszilázshoz jó termés- és betakarítás-gazdálkodás, valamint gondos silózási gyakorlat szükséges (Arvalis, 2011).

Hazánk éghajlati adottságaiból kifolyólag, a haszonállatok éves takarmányszükségletét az április és november közötti időszakban kell megtermelni, a felhasználásig tartósítani szükséges, hogy a többségében szilasztakarmányt megóvjuk a növényi légzés tápanyag-veszteségétől és a mikrobák okozta romlástól. A leghatékonyabb módja a takarmány megőrzésének a silózás, amely nem olyan érzékeny a rossz időre, mint a szénázás, és az ősi idők óta ismert és ma is a legelterjedtebb módja a takarmány tartósításának. A silózás további előnyei közé tartozik, hogy sokkal kisebb tápanyagvesztéssel jár mint a szénázás és egyszerűen gépesíthető a folyamat. Különböző silótípusok léteznek: kazalsiló, szalmasiló, földbe ástott verem, szilárdfalú falközi siló (tégla vagy beton), bálasiló, toronysiló és fóliahengerbe történő silózás.

A tárolt gabona romlásának fő okozói a penészgombák. Az Élelmiszer- és Mezőgazdasági Szövetség (Food and Agriculture Association) becslései szerint a világ élelmiszernövényeinek 25%-a szennyeződik mikotoxinokkal a növekedés és a tárolás során. A penészgombák kártétele a második helyen áll a tárolt gabonatermékekben a rovarok által okozott károk mögött.

Kutatócsoportunk egy konzorcium tagjaként olyan kutatásfejlesztési programban vett részt, amely a kukoricasilók aflatoxin kontaminációjának minimalizálását tűzte ki célul. A program első felében feladatunk volt a silókban zajló mikrobiológiai folyamatok monitorozása, valamint a siló aflatoxin kontaminálódásának lehetséges mechanizmusának feltárása. A költségek csökkentése, valamint annak érdekében, hogy több oltóanyag és silózási paraméter hatását is tesztelhesük, kísérleti mikrosilókat hoztunk létre. A kísérleti mikrosilók használatának első lépése az volt, hogy meghatározzuk, milyen mértékben befolyásolja a kisebb méret a silózás folyamán a silókukoricában lejátszódó mikrobiológiai folyamatokat, a mikrobiom összetételének változását, mennyire modellezi a kísérleti mikrosiló az eredeti, jóval nagyobb silókat.

Anyagok és módszerek

Szilázs előállítására silókukoricából (**1. ábra**) 2017-ben bálasilót (**2. ábra**) állítottunk össze. Egy bálasiló tömege körülbelül 800 kg.

Ugyanebből a silókukoricából kukorica-szeccskával megtöltöttünk 8 db egyenként 200 literes kísérleti mikrosilót (**3. ábra**).

A harmadik vizsgált siló egy évvel később, 2018-ban került összeállításra, silókukoricából, itt szintén a 8 db kísérleti mikrosilót használtuk.



1. ábra: Silókukorica szeccska



2. ábra: Bálasilók



3. ábra: Mikrosilók

A bálasilóból a mintavételezés a 0., 1., 3., 7., 14., 28. és 60. napon, a mikrosilókból a mintavételezés mindkét évben a 0., 1., 3., 7., 14., 28., 60., 110. és 150. napon történt. Minden mintavétel a siló belsejéből történt, egy-egy minta körülbelül fél kiló mennyiségű volt.

A minták feldolgozása során 10 gramm mintából kiindulva tízes alapú hígítási sort készítettünk steril peptonvízben (9 g NaCl és 1 g pepton 1000 mL deszillált vízben). A összes élőcsíraszám meghatározását általános mikrobiológiai táptalajban (Plate Count Agar, VWR) végeztük, a lemezeket 3-5 napig 30 °C-on

inkubáltak. A tejsavbaktériumok számának meghatározása MRS (De Man, Rogosa, Sharpe Agar, VWR) táptalajra szélesztéssel történt, a lemezeket 37 °C-on két napig inkubáltuk. A penész- és élesztőgombák számát RB (Rose Bengal Chloramphenicol Agar, VWR) lemezen szélesztéssel határoztuk meg, a lemezeket szobahőmérsékleten 5-7 napig inkubáltuk. A szilázsok pH-ját desztillált víz hozzáadásával pH-mérő készülék (Hanna instruments, HI 2210) segítségével mértük.

A vizsgált minták száma minden mintavételi időpontban a bála esetében 3, a mikrosilók esetében 8-8 volt.

Eredmények és értékelésük

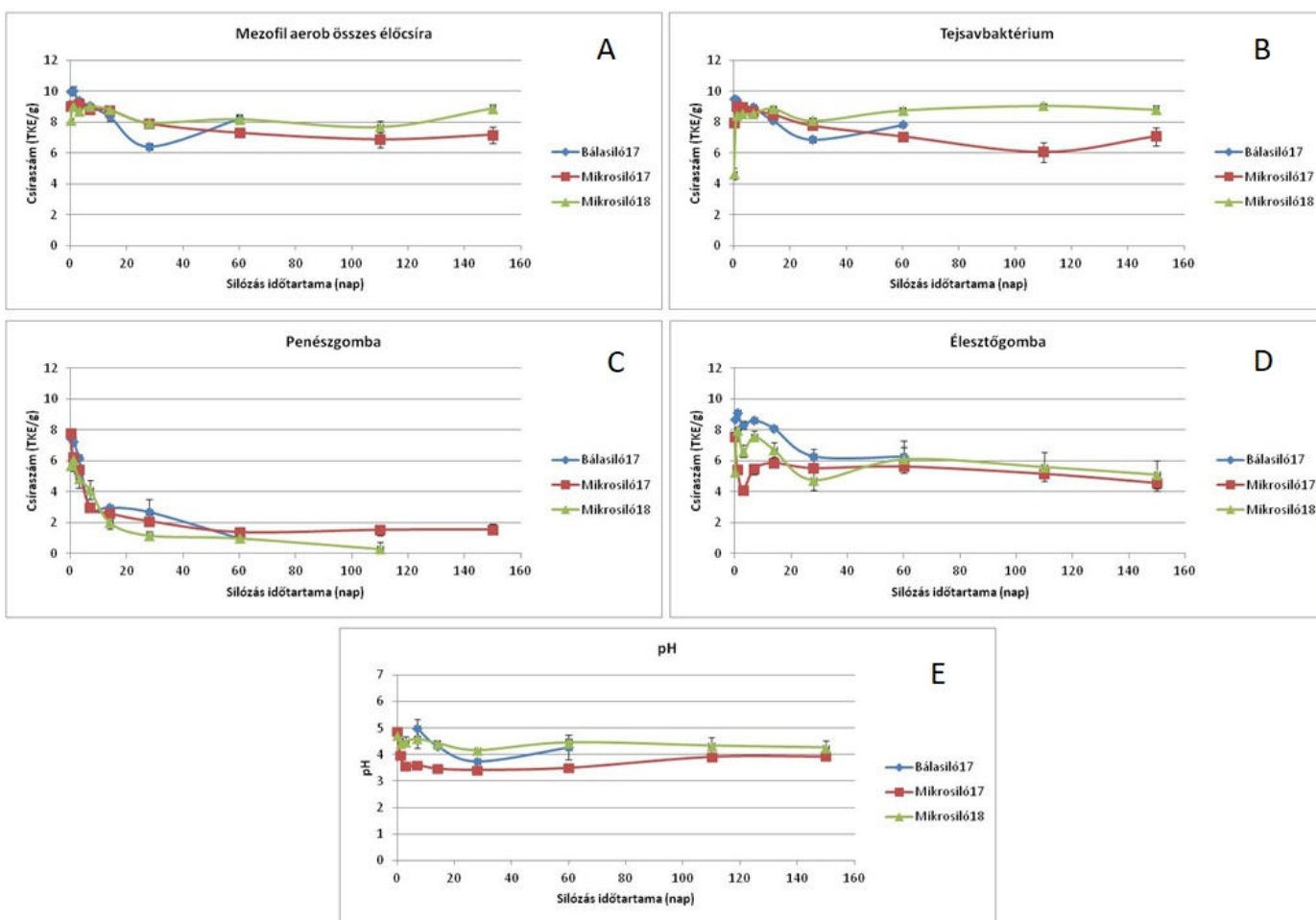
Összes élőcsíra

A silókukorica összes élőcsíraszám a betakarításakor mindkét évben 10^8 és 10^{10} TKE/g (telepképző egységek száma/g) között volt. Mivel a 2017-ben készült bálásiló

és mikrosilók ugyanabból a silókukoricából kerültek összeállításra, a mért csíraszámok közötti különbségek a mikrobák egyenetlen eloszlásával magyarázhatók. Két hét és egy hónap közötti időtartam kellett ahhoz, hogy mindhárom siló összes élőcsíraszám beálljon egy 10^7 - 10^8 TKE/g értékre, ezek az értékek a silózás végéig, változatlanok maradtak. Sem az évjárat, sem a silók mérete nem okozott számottevő különbséget a stabilizálódott kukoricaszilázs összes élőcsíraszámában az 5 hónapos silózási folyamat alatt (4. ábra A).

Tejsavbaktériumok

A tejsavbaktériumok jelenléte meghatározó a silózás folyamata során. A homofermentatív tejsavbaktériumok feladata a silókészítésben a gyors savanyítás, hiszen a baktériumok általában 4,5-es pH alatt nem képesek szaporodni, a heterofermentatív baktériumok pedig képesek penészgombagátló- és egyéb anyagcsere-termékeikkel a szilázsok aerob (silónyitás utáni) stabilitását alapvetően befolyásolni (Muck et al., 2013). A kísérlethez felhasznált silókukorica



4. ábra: Mikrobaszámok és a pH alakulása a 2017-es bálásilóban (Bálásiló17, n=3), a 2017-es mikrosilókban (Mikrosiló17, n=8) és a 2018-as mikrosilókban (Mikrosiló18, n=8). A – összes élőcsíraszám, B – tejsavbaktériumok, C – penészgombák, D – élesztőgombák, E – pH

kezdeti tejsavbaktérium száma mindkét évben 10^8 - 10^9 TKE/g volt. Egy hónap alatt beállt a silók tejsavbaktérium száma arra az értékre, amely utána a silózás végéig megmaradt, ez a 2017-es silók esetében, függetlenül a silók méretétől, 10^7 TKE/g, a 2018-as évben pedig 10^9 TKE/g volt. A két évjárat közötti eltérés oka a kukorica esetlegesen eltérő érési állapota, tápanyagösszetétele lehetett (**4. ábra B**).

Penészgombák

A penészgombák jelenléte nem kívánatos a silóban, hiszen egy sor takarmány-minőségi, illetve egészségügyi probléma forrása ez a mikrobacsoport. A penészgombákkal átszőtt takarmány a haszonállatoknál légzési problémákat, a bendőben folyó emésztés zavarát, szaporodásbiológiai problémákat, vesekárosodást, bőr- és szemgyulladást okozhat. A takarmánybiztonsági előírások szerint a szilázs 10^5 TKE/g feletti penészgomba száma már a kifogásolt kategóriába esik. A silóból izolált leggyakoribb penészgombák az *Aspergillus*, *Penicillium* és a *Fusarium* nemzetségbe tartoznak (Samson et al., 2010). A mikotoxinok különböző penészgombák által termelt másodlagos anyagcseretermékek, melyek elfogyasztva, azok mennyiségétől és a fogyasztás időtartamától függően, az állati és emberi szervezetre egyaránt toxikus/mérgező hatást fejtenek ki. Közülük talán a legsúlyosabb problémát okozó mikotoxinok az *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* és *Aspergillus niger* gombák által termelt aflatoxinok. Az aspergillusok hagyományosan megtalálhatóak a szántóföldeken, azonban Magyarország klimatikus viszonyai mellett ez idáig nem okoztak gondot. A klímaváltozás hatására azonban hazánkban is megemelkedett a kiemelkedően magas hőmérsékletű napok száma, ez pedig jelentősebb csapadékmennyiséggel párosulva a nyári hónapokban már kedvező feltételeket biztosíthat a penészgomba toxintermeléséhez, illetve az emelt toxintermelésre képes *Aspergillus flavus* penészgomba törzsek elszaporodásához (Dobolyi et al., 2014).

A penészgombák száma a szántóföldről frissen betakarított terményben nagymértékben függ az adott év időjárási körülményeitől (Temba et al., 2021). A KSH adatai szerint 2017-ben Magyarországon a hőségnapok száma duplája volt a 2018 évének, a magasabb nyári hőmérséklet kedvezett a szántóföldi penészgombák szaporodásának. A 2017-es kiindulási penészgomba szám a bálasilóban és a mikrosilóban 10^8 TKE/g volt, míg a hűvösebb, csapadékosabb 2018-as évben 10^6 TKE/g. A silókban nagyon hamar kialakuló anaerob körülmények következtében a penészgombák száma drasztikusan csökkent, egy hét alatt körülbelül 10^3 TKE/g-ra, majd a 40. naptól már mindhárom silóban mérettől és évjáratától függetlenül a kimutathatósági határ

közelébe, 10^2 TKE/g alá, amely utána a silózási folyamat végéig ezen a szinten is maradt (**4. ábra C**). Eredményeink alapján azt a következtetést lehet levonni, hogy a penészgombák számára a silóban uralkodó körülmények nem megfelelőek az élettevékenységük folytatásához, pár nap alatt elpusztulnak, tehát ennek következtében toxint sem képesek termelni. Amennyi mikotoxint a silóban kimutatunk, az a silózás előtt, illetve a siló megbontása után, újra aerob környezet kialakulása mellett termelődhet csak meg.

Élesztőgombák

Számos élesztőgomba faj – a valódi gombák között egyedülállóan – néhány cukrot anaerob úton, erjesztéssel is képes felhasználni. A szerves anyagok mennyiségének csökkentésével, a siló hőmérsékletének emelésével és kellemetlen íz- és illatanyagok termelésével aktivitásuk nemkívánatos a silóban. A silóban bekövetkező bármely változás hatására közülük egyesek felszaporodhatnak, metabolizmusukkal a tejsavat bonthatják, anyagcseretermékeikkel ronthatják a szilázs minőségét, a siló káros felmelegedését is okozhatják, emiatt megjelenésük nemkívánatos. Ugyanakkor, jelenlétük gátolhatja is egyes toxinogén gombák tevékenységét (Deák, 1998). A tejsavbaktériumok jelenléte a silóban gátat szabhat az élesztőgombák térnyerésének. Az általunk vizsgált silók élesztőgomba száma a kiindulási időpontban 10^7 - 10^8 TKE/g között volt. A silózás első hetében nagyon érdekes folyamatok voltak megfigyelhetők. Az első pár napban a silókukoricán jelenlévő, az aerob körülmények között jól szaporodó élesztőgombák számában jelentős csökkenés figyelhető meg, ahogy a körülményeik anaerobbá változnak, majd anyagcseréjük átállításával, illetve olyan fajok térhódításával, amelyek kedvelik az anaerob körülményeket, számuk ismét növekedésnek indul. A silózás során aztán az élesztőgombák mennyisége lassan csökkenni kezd, majd a silózás végére silómérettől és évjáratától függetlenül 10^4 TKE/g értékre csökken (**4. ábra D**).

pH

A silókukorica pH-ja a besilózás időpontjában 5 körüli érték volt mindkét évben, amely megegyezik a szakirodalomban található adatokkal (Haigh & Parker, 1985). Főként a tejsavbaktériumok anyagcsere tevékenységének köszönhetően az első pár hétben ez a pH, különösen a 2017-es évben készített silóknál, kicsit tovább is csökkent, azonban a 60. napra mindhárom siló pH-ja 4-es értékre állt be és ez az érték nem is változott a silózási folyamat végéig (**4. ábra E**). A szilázs beltartalmi értékeinek megőrzésére, mikrobiológiai biztonságosságára és eltarthatóságára ez a pH érték ideális (Kaewpila et al., 2021).

Következtetések, javaslatok

Célunk annak igazolása volt, hogy a kukorica-silózási kísérletekhez létrehozott 200 literes mikrosilók alkalmasak a nagyméretű silókban, mint például egy bálasilóban (800 kg) a silózási folyamat alatt lejátszódó mikrobiológiai folyamatok modellezésére. Ehhez 2017-ben egy bálasilót és 8 mikrosilót (200 liter), 2018-ban pedig 8 mikrosilót töltöttünk meg silókukorica szecskával, ahol 150 napon keresztül vizsgáltuk a silózásban szerepet játszó főbb mikrobacsoportok, az összes csíraszám, tejsavbaktériumok, penész- és élesztőgombák számának alakulását. Eredményeinkkel igazoltuk, hogy a kialakított kísérleti mikrosilók esetében a kisebb méret nem befolyásolta a silózás folyamán a silókukoricában lejátszódó mikrobiológiai folyamatokat, a mikrobiom összetételének változását, megfelelően modellezi az eredeti, jóval nagyobb silókat, használatuk a további oltóanyag-kutatásokra megfelelő.

Köszönetnyilvánítás

A kutatást az NVKP_16-1-2016-0009 „A takarmány és élelmiszerbiztonság erősítése a takarmányok mikotoxinmentesítésére alkalmas innovatív technológiák kifejlesztésével” című pályázat támogatta.

Irodalomjegyzék

Arvalis (2011): Les territoires du maïs fourrage en France. Arvalis, FNPSMS, UFS
Cullison, A.E., Lowrey, R.S. (1987): Feeds and Feeding.

Published by Reston Pub Co, Cronus Books, Carson City, NV, U.S.A. ISBN 10: 0835919072; ISBN 13: 9780835919074

- Deák, T. (1998): Élesztőgombák a természetben és az iparban. Budapest: Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó.
- Dobolyi, Cs., Sebők, F., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Baranyi, N., Szécsi, Á., Tóth, B., Varga, M., Kriszt, B., Szoboszlay, S., Krifaton, Cs., Kukolya, J. (2013): Occurrence of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* isolates in maize kernel in Hungary. *Acta Alimentaria*, 42:451-459. <https://doi.org/10.1556/aalim.42.2013.3.18>
- Haigh, P.M., Parker, J.W.G. (1985): Effect of silage additives and wilting on silage fermentation, digestibility and intake, and on liveweight change of young cattle. *Grass Forage Sci.*, 40:429-436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1985.tb01774.x>
- Kaewpila, C., Gunun, P., Kesorn, P., et al. (2021): Improving ensiling characteristics by adding lactic acid bacteria modifies in vitro digestibility and methane production of forage-sorghum mixture silage. *Sci Rep.*, 11, 1968. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81505-z>
- Muck, R.E., Weinberg, Z.G., Contreras-Govea, F.E. (2013): Silage extracts used to study the mode of action of silage inoculants in ruminants. *Agric. Food Sci.*, 22:108-114. <https://doi.org/10.23986/afsci.6717>
- Samson, R., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J. & Andersen, B. (2010): Food and indoor fungi. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- Temba, B.A., Darnell, R.E., Gichangi, A., et al. (2021): The influence of weather on the occurrence of aflatoxin B1 in harvested maize from Kenya and Tanzania. *Foods*, 10(2):216. <https://doi.org/10.3390/foods10020216>

Effects of harvest year and scaling-down on changes in maize silage microbiome during ensiling

Bata-Vidács I., Kosztik J., Tóth Á., Kukolya J.

Abstract

In 2017, a bale silo (800 kg) and 8 microsilos (200 litres), and in 2018, 8 silos were filled with chopped full corn, and the changes in the numbers of total bacteria, lactic acid bacteria, moulds and yeasts, the major microbial groups involved in ensiling, were determined from 0 to 150 days. Our aim was to demonstrate that the 200-litre microsilos created for maize silage experiments are suitable for modelling the microbiological processes that take place during the silage process in large silos such as a bale silo. With our results we proved that in the case of the experimental microsilos the smaller size did not affect the microbiological processes taking place during silage period, changes in the microbiome composition properly models the original, much larger silos, their use is suitable for further starter culture research.

Keywords: bale silo, microsilos, microbiome, vintage, downscaling

Hegyi Ferenc, Perjéssy Judit, Zalán Zsolt

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólium-bromid) kolorimetriás módszer adaptálása *Lactobacillus* törzsek vizsgálatához

A szerzők elérhetősége

Hegyi Ferenc | tudományos munkatárs
hegyi.ferenc@uni-mate.hu | levelező szerző

Perjéssy Judit | tudományos segédmunkatárs
perjessy.judit@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0002-4872-9402>

Zalán Zsolt | tudományos főmunkatárs
zalan.zsolt@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0001-8976-3263>

A szerzők munkahelye

MATE ÉTTI Élelmiszertudományi Kutatócsoport
Munkahely címe: 1118 Budapest, Villányi út 29-43.



Összefoglalás

A tejsavbaktériumok és azon belül a *Lactobacillus* törzsek széles körben megtalálhatóak a természetben és az emberi béltraktus mikroflórájának is fontos tagjai. Számos kutatás foglalkozik ezen mikroorganizmusok számunkra előnyös tulajdonságaival, amelyek egyre világosabbá teszik, hogy nélkülük elképzelhetetlen lenne az életünk. Ezért is fontos, hogy minél több információval rendelkezünk ezen nélkülözhetetlen mikroorganizmusokról. Munkánk során egy eredetileg humán sejtek vizsgálatához alkalmas kolorimetriás módszert adaptáltunk és optimalizáltunk az általunk vizsgált tesztmikroorganizmusok enzimaktivitásának méréséhez. Az irodalomban közölt módszer módosításával, paramétereinek beállításával egy gyors eljárást kaptunk, amelynek segítségével kevesebb mint négy óra alatt közvetlenül kimutatható a baktérium sejtek enzimaktivitása és közvetve azok sejt száma is. Az adaptáció során megállapítottuk az optimális paramétereket (baktériumsejt koncentrációt, MTT koncentrációt, inkubációs időt, pH hatást), amelyek esetén szoros korreláció áll fenn a sejt szám és a keletkezett formazán koncentráció között. Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a *Lactobacillus* törzsek enzimaktivitását nagymértékben befolyásolja azok pillanatnyi szaporodási fázisa, a táptalaj minősége, továbbá a törzsek között is jelentős különbség figyelhető meg.

Kulcsszavak: MTT, *Lactobacillus*, enzimaktivitás, kolorimetria

Bevezetés

A tejsavbaktériumok és köztük a *Lactobacillus*-ok évezredek óta közeli kapcsolatban állnak az emberrel, amely nem annyira meglepő, mivel ezek a mikroorganizmusok a környezetünkben számos helyen megtalálhatóak, mint például a növények felszínén, a

talajban és még az emberi béltraktusnak is szerves részét képezik, amelyek így nagymértékben hozzájárulnak az egészséges immunrendszer fenntartásához és az emésztési folyamatokat is segítik. A *Lactobacillus*-ok jótékony hatásukat az anyagcseréjük során termelt elsődleges és másodlagos anyagcseretermékeik segítségével fejtik ki. Már időszámításunk előtti korszakokban kihasználta az

ember ezeket az előnyös tulajdonságokat, zöldség, hús és tej fermentációjára is, így hosszabbítva meg az élelmiszereik eltarthatóságát. Az élelmiszerek tartósításán túl élvezeti értéküket és emészthetőségüket is nagymértékben növelik e mikroorganizmusok. Mindezen áldásos tevékenységükön felül, a napi rendszerességgel megfelelő mennyiségben fogyasztott, laktobacillust tartalmazó, úgynevezett probiotikus élelmiszerek bizonyítottan javítják az immunrendszerünk működését, illetve számos betegség kialakulásának kockázatát csökkentik.

„Nincs a baktériumoknak még egy olyan csoportja, amely az emberrel olyan sokoldalú viszonyban állna, mint a tejsavbaktériumok. Ezért fontos és szükséges őket jobban megismerni” (Deák, 2005).

Számos ma is használt mikrobiológiai vizsgálati módszer több mint száz éve alakult ki. Világszerte a vizsgálatok millióit végzik évente ezekkel a hagyományos tenyésztési módszerekkel annak ellenére, hogy idő- munka- és anyagigényesek, az eredmény gyakran csak több napos vizsgálatssorozat után értékelhető (Deák, 2006a; Deák, 2006b). A mikrobiológiai vizsgálati módszerek továbbfejlesztéseinek céljai, hogy gyorsabban, több mintából, kevesebb élő munkával, olcsóbban és mégis informatívabban jussunk eredményekhez.

MTT kolorimetriás módszer

A 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromidot (MTT) 1957-után szintetizálták és kezdték el tanulmányozni (Altman, 1976). A mérőoldékot a Mosmann (1983) által leírt módszer jelentette az MTT alapú eljárások tekintetében. Mosmann eredetileg emlős sejtek aktivitásának, növekedésének és túlélésének tanulmányozására fejlesztette ki az MTT kolorimetriás módszert (Mosmann, 1983), a későbbiekben számos publikáció jelent meg, amely Mosmann modelljét alapul véve kisebb-nagyobb módosításokkal átalakítva kiterjesztette alkalmazhatóságát (Gerlier & Thomasset, 1986; Scudiere et al., 1988). A továbbfejlesztett módszereket sikeresen alkalmazzák az immunológiában, toxikológiában, a sejtszociológiában különböző emlőssejtek, köztük daganatos sejtek, életképességének, növekedésének és vegyszerérzékenységének (Carmichael et al., 1987; Twentyman & Luscombe, 1987; Alley et al., 1988; Campling et al., 1991; Berridge & Tan, 1993; Liu et al., 1997; Takahashi et al., 2001), valamint a mikrobiológiában számos mikroorganizmus, baktérium, élesztő- és penészgomba szaporodásának, életképességének, antibiotikum rezisztenciájának vizsgálatára is (Peck, 1985; Stowe et al., 1995; Abate et al., 1998; Freimoser et al., 1999; Dias et al., 1999; Stentelaire et al., 2001; Gabrielson et al., 2002; Saravanan et al., 2003; Wang et

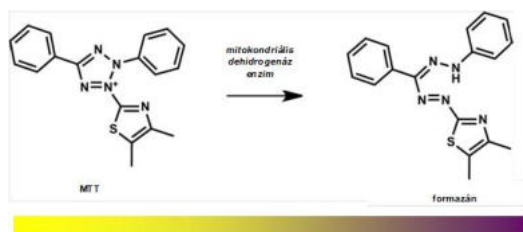
al., 2007; Wang et al., 2010; Wadhawan et al., 2010).

Az MTT és általában a tetrazólium sók redukcióján alapuló kolorimetriás módszerek legnagyobb előnye az egyszerűségükben és a gyorsaságukban rejlik. Azonban ahhoz, hogy a lényegesen több munkát, időt és vegyszert igénylő hagyományos módszerek alternatívájaként szolgáljanak, számos paraméter pontos meghatározása és beállítása szükséges. A módszer az élő sejtek azon tulajdonságán alapszik, miszerint képesek a vízoldható tetrazólium sötét vízoldhatatlan formazánná alakítani (Twentyman & Luscombe, 1987) és az így keletkezett formazán mennyisége spektrofotometriás úton meghatározható, amiből az élő sejtek számára következtethetünk (Mosmann, 1983; Peck, 1985; Denizot & Lang, 1986). Ezek a megállapítások emlős és bakteriális eredetű sejtekre egyaránt igazak (Abate et al., 1998). Az MTT esetében a sárga színű, vízben jól oldódó tetrazólium sötét redukálják a sejtek vízben oldhatatlan lila formazán kristályokká (Plumb et al., 1989).

Az MTT próbát annak ellenére, hogy széles körben alkalmazzák sejtéletképesség és sejt szaporodás mérésére, a redukció mechanizmusa és a felelős enzimek pontos elhelyezkedése nem teljesen ismert (Collier & Pritsos, 2003). Egy korai tanulmányban Slater és munkatársai 1963-ban megállapították, hogy a szukcinát függő MTT redukciója a patkány máj sejtek mitokondriumában megy végbe. Későbbi tanulmányok bebizonyították, hogy a szukcinát dehidrogenáz függő MTT redukció mellett NADH és NADPH függő formazán termelés is történik, amely a mitokondriumon kívül a belső membránban megy végbe (Berridge & Tan, 1993). További tanulmányok eredményei is megkérdőjelezték a mitokondrium kizárólagos szerepét az MTT redukciójában (Liu et al., 1997), illetve bebizonyították azt is, hogy sok más, nem mitokondriális dehidrogenáz enzim és flavin oxidáz is képes redukálni az MTT-t. Számos eredmény található az irodalomban arra is, hogy az MTT redukciója élő sejtek jelenléte nélkül, különböző flavonoidok, magnézium oxid vagy akár porózus szilícium (PSi) mikrorészecskék hatására is spontán végbemehet, amely így hamis pozitív jelet eredményezhet (Peng et al., 2005; Laaksonen et al., 2007; Talorete et al., 2007; Fischer et al., 2010).

Az MTT vizsgálati módszer két fő részre, a redukciós és az oldódási folyamatra osztható fel. A redukciós folyamat pontos megértése és az esetleges hamis pozitív vagy negatív jelet produkáló tényezők kiküszöbölése mellett a keletkezett formazán kristályok hatékony feloldása is elengedhetetlen a pontos eredmény elérése érdekében. Oldódás szempontjából a tetrazólium sókból keletkezett formazán kristályok lehetnek vízben, illetve vízben nem, csak valamilyen szerves oldószerben oldhatóak. A vízoldható formazánok esetében az oldási folyamat nem igényel

külön lépést, mivel a kristályok a sejtek szaporodását biztosító táptalajban intenzív színreakció mellett feloldódnak. A vízben oldhatatlan formazán kristályt képző tetrazólium sók esetében, amilyen az MTT is, azonban az oldószer kiválasztása is fontos lépés. Az MTT redukálódásának folyamatát az **1. ábra** szemlélteti.



1. ábra: Az MTT redukálódása formazánná

Munkánk során célul tűztük ki, hogy az MTT kolorimetriás módszert – amely azon alapul hogy az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáz enzimje az MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil terazólium-bromid) tetrazólium gyűrűjét vízben oldhatatlan színes formazánná alakítja, így annak mennyisége jól korrelálva az élő sejtek számával, kolorimetriásan meghatározható – alkalmassá tesszük ezen mikroorganizmusok gyors és egyszerű vizsgálatához.

Anyagok és módszerek

Tesztmikroorganizmusok

A vizsgálatainkhoz a következő *Lactobacillus* törzseket alkalmaztuk: *Lactobacillus plantarum* 2142 (Perugia-i Egyetem Mezőgazdasági Tanszék, Tejipari Intézet, Olaszország), *Lactobacillus rhamnosus* VTI (Kémiai Technológiai Intézet, Tej és Zsíritechnológiai Tanszék Prága, Csehország), *Lactobacillus casei* Shirota (Utrecht-i Egyetem, Állatorvosi Kar, Hollandia), *Lactobacillus sakei* (Perugia-i Egyetem Mezőgazdasági Tanszék, Tejipari Intézet, Olaszország).

Táptalajok

A tesztmikroorganizmusok felszaporítására MRS (de Man, Ragosa, Sharpe) táplevest (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) és MRS (de Man, Ragosa, Sharpe) agart (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) alkalmaztunk. Természetes tápközegként csicsóka táplevet alkalmaztunk (Csicsókapor (Dr. Fitokup Kft, Budapest) 100 g + desztillált víz 900 ml).

MTT kolorimetriás módszer

A felszaporított tejsavbaktérium lecentrifugálását követően eltávolítottuk az MRS táplevest a sejtekről, majd 10^8 - 10^9 sejt/ml-re állítottuk be a sejtkoncentrációt fiziológiás sóoldat segítségével. A beállított sejtszámot

mikrotiterlemez-leolvasó segítségével 630 nm-en ellenőriztük. A megfelelő sejtszám esetén 1 ml-t pipettáztunk a mintából egy 2 ml-es Eppendorf csöbe, majd hozzáadtunk a vizsgálni kívánt gátlóanyagból 100 μ l-t, illetve 100 μ l előzőleg elkészített 8 - 9 mg/ml koncentrációjú MTT-t. A tetrazólium-bromidot foszfát puffereelt sóoldatban (pH 7,2) oldottuk fel majd 0,2 μ m-es fecskendőszűrőn átszűrtük. Az összemért mintákból minden esetben 3 párhuzamost készítettünk, amelyeket 37 °C-os inkubátorba helyeztünk 2 órára. Az inkubációs idő elteltét követően a csöveket 9000 g-n lecentrifugáltuk, majd a felülúszót elöntöttük. A visszamaradt formazán kristályokat 1 ml DMSO hozzáadásával és 400 fordulat/perces rázatással szobahőmérsékleten 10 perc alatt oldottuk fel. Az így kapott oldat színintenzitását spektrofotométer segítségével mértük 595 nm-en. Egyes méréseknél az MTT kolorimetriás módszer miniatürizált, mikrotiterlemezre kidolgozott változatát (mMCA) alkalmaztuk, amely idő, energia és vegyszer megtakarítást tett lehetővé. E módszer annyiban különbözik az előzőekben leírt eljárástól, hogy a mintákat steril 96 lyukú mikrotiterlemezre mértük össze, így a *Lactobacillus* sejteket tartalmazó fiziológiás sóoldatból 200 μ l-re, a gátlóanyagból 20 μ l-re és a feloldott MTT-ből is (8 mg/ml) csak 20 μ l-re, illetve a 2-órás inkubáció elteltével és a felülúszó eltávolítását követően a DMSO-ból is mindössze 200 μ l-re volt szükség, amely a fent leírt módszerhez képest ötöd annyi mennyiségeket jelent.

Eredmények és értékelésük

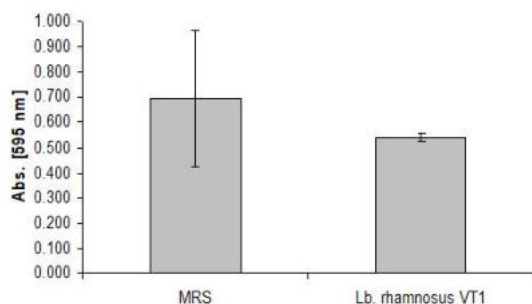
MTT kolorimetriás módszer adaptálása és alkalmazása

Az elsőként Mosmann (1983) által leírt MTT kolorimetriás módszert, amelyet eredetileg emlős sejtek vizsgálatára dolgozott ki, sokan alkalmazták saját kutatásaikhoz különböző módosításokkal. A számos módosítás közül az egyik ilyen a Wang Fang és munkatársai (2007) által leírt MTT módszer, amelyet a *Micrococcus luteus* Gram-pozitív baktérium vizsgálatához fejlesztettek ki. Ezt az eljárást alapul véve kívántuk átalakítani a módszert úgy, hogy a *Lactobacillus* törzseink vizsgálatához alkalmas legyen. A módszer két fontos részre osztható fel, az egyik az élő sejtek dehidrogenáz enzimeit által a tetrazólium-bromidból képzett formazán képződése, a másik pedig a keletkezett, vízben oldhatatlan kristályok feloldása szerves oldószerrel. A keletkezett formazán kristályok mennyisége függ a sejtek számától, illetve azok dehidrogenáz enzimeinek aktivitásától, valamint nagymértékben függ a hozzáadott kezdeti tetrazólium só koncentrációjától. A vízoldhatatlan formazán kristályok maradéktalan feloldása is elengedhetetlen

ahhoz, hogy pontos eredményeket kapjunk. Az MTT-ből keletkezett formazán kristályok oldásához alkalmazott megfelelő oldószerekkel kapcsolatban eltérő eredmények találhatóak az irodalomban. Huamin és munkatársai (2002) szerint az izopropanol a legmegfelelőbb oldószere az MTT-ből keletkezett formazán kristályoknak, azonban az irodalmi adatok nagyobb számban utalnak arra, hogy a legalkalmasabb erre a célra a dimetil-szulfoxid (DMSO), amely maradéktalanul képes feloldani a formazán kristályokat, illetve kellőképpen stabil, színes oldatot eredményez (Carmichael et al., 1987; Twentymán & Luscombe, 1987; Alley et al., 1988; Campling et al., 1991). Vizsgálataink során is azt tapasztaltuk, hogy a törzsek által termelt formazán kristályokat maradéktalanul feloldja a dimetil-szulfoxid, amely 24 óra elteltével is változatlan abszorbanciával rendelkezett. A módszer adaptálásakor tehát fontos a különböző paraméterek, MTT koncentráció, inkubációs idő, sejtkoncentráció pontos meghatározása, valamint a megfelelő oldószer kiválasztása is.

A táptalaj redukáló hatása

Amint azt sokan mások is tapasztalták a tetrazólium sók alkalmazása során igen sok tényező okozhatja azok redukálódását a vizsgálni kívánt élő sejtek dehidrogenáz enzimein kívül (Peng et al., 2005; Laaksonen et al., 2007; Talorete et al., 2007; Fischer et al., 2010). A vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a tejsavbaktériumok szaporítására alkalmazott MRS táptalaj igen nagy mértékben képes redukálni a hozzáadott tetrazólium-bromidot mikroorganizmusok jelenléte nélkül, fals pozitív jelet eredményezve. Az MRS táptalaj MTT-t redukáló hatását a **2. ábra** szemlélteti. A hiba kiküszöbölésére a vizsgálatok során minden esetben szükséges az MRS táptalaj maradéktalan eltávolítása a sejtekről az MTT hozzáadása előtt. A **2. ábra** jól szemlélteti, hogy az MRS tápleves élő mikroorganizmusok jelenléte nélkül is képes redukálni az MTT-t. A sejtek szaporítására alkalmazott különféle táptalajok MTT-t redukáló hatásairól korábban számos esetben beszámoltak már (Denizot & Lang, 1986; Dias et al., 1999; Wang H. et al., 2010), ezzel szemben Wang F. és

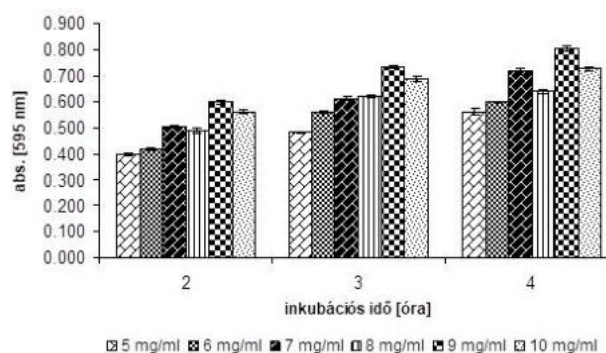


2. ábra: Az MRS-táptalaj redukáló hatása

munkatársai (2007) nem tettek említést a szaporító tápközeg redukáló hatása által okozott problémáról.

Az inkubációs idő és az MTT koncentráció kiválasztása *Lactobacillus* törzsek dehidrogenáz enzimaktivitásának méréséhez

A vizsgálni kívánt sejtektől és mikroorganizmusoktól függően az alkalmazott MTT koncentráció igen tág határok között mozoghat, az irodalmi adatok szerint 1 mg/ml és 10 mg/ml koncentrációk között alkalmazzák (Stowe et al., 1995; Abate et al., 1998; Dias et al., 1999). Leggyakrabban az eredeti módszert alapul véve (Mosmann, 1983), 5 mg/ml koncentrációban alkalmazzák az MTT-t (Wang et al., 2010; Saravanan et al., 2003). Az ideális inkubációs idő megválasztása is fontos, e paraméter is tág határok között mozoghat, pár órától akár 24 óráig is (Abate et al., 1998; Dias et al., 1999; Saravanan et al., 2003; Wang et al., 2007). Az optimális MTT koncentráció és az inkubációs idő meghatározásához *Lactobacillus plantarum* 2142 törzset alkalmaztunk, amelynek sejtszámát $6-7 \cdot 10^8$ sejt/ml koncentrációra állítottunk be. A beállított sejtszámú mintából 1-1 ml-t pipettáztunk 2 ml-es Eppendorf csövekbe, amelyekhez hozzáadtunk 100 μ l ismert koncentrációjú (5, 6, 7, 8, 9, 10 mg/ml) MTT oldatot. Az összemért oldatokat 37 °C-os inkubátorba helyeztük, majd 2, 3 és 4 óra elteltével mértük az abszorbanciát 595 nm-en spektrofotométer segítségével. Az eredményeket az **3. ábra** mutatja be. A 9 mg/ml koncentrációjú MTT esetében kaptuk a legnagyobb jelet mindegyik inkubációs idő esetében. A 10 mg/ml koncentrációjú MTT esetében megfigyelhető jel csökkenés oka az lehet, hogy ebben a koncentrációban az MTT már gátló hatást fejthet ki a tesztmikroorganizmusra (Tengerdy et al., 1967; Stowe et al., 1995). Az inkubációs idő növelésével a keletkezett

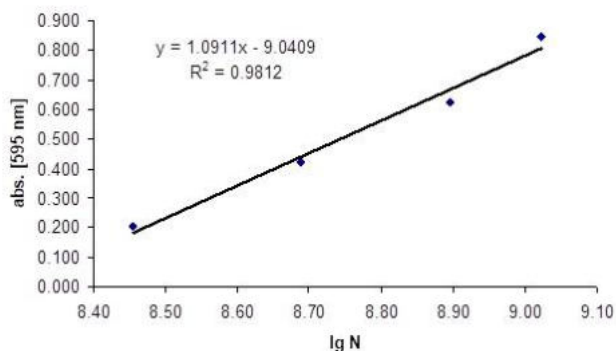


3. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142 formazán képzése különböző MTT koncentráció és eltérő inkubációs idő esetén

formazán mennyisége is növekszik. Mivel egy gyorsmódszert létrehozása volt a célunk, a 2 órás inkubációs időt választottuk a további vizsgálatainkhoz.

A legkedvezőbb sejtkoncentráció meghatározása

Az optimális mérési tartomány meghatározásához hígítási sort készítettünk a *Lactobacillus plantarum* 2142 törzsből 10^9 és 10^6 sejt/ml koncentráció között. Ebben az esetben is 1 ml mintához adtunk 100 μ l 9 mg/ml MTT oldatot és 37 °C-os 2 órás inkubációt követően mértük a keletkezett formazán mennyiségét. Az eredményeket a **4. ábra** mutatja, ahol látható, hogy *Lactobacillus plantarum* 2142 esetében, 10^8 – 10^9 sejt/ml koncentráció tartományban lineáris összefüggés tapasztalható a sejtszám és a keletkezett formazán kristályok



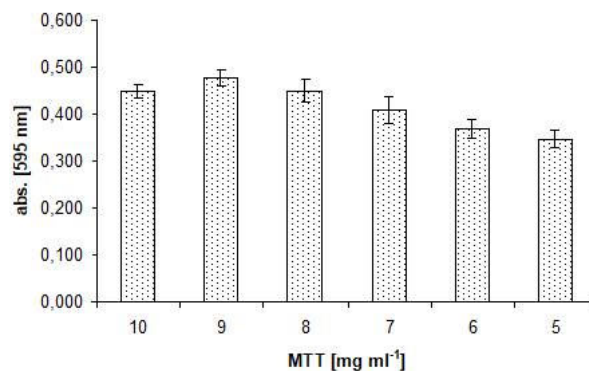
4. ábra: Optimális méréstartomány meghatározása *Lactobacillus plantarum* 2142 esetén

mennyisége között. *Lactobacillus plantarum* 2142 esetén 10^8 sejt/ml sejtkoncentráció alatt nem kaptunk értékelhető jelet.

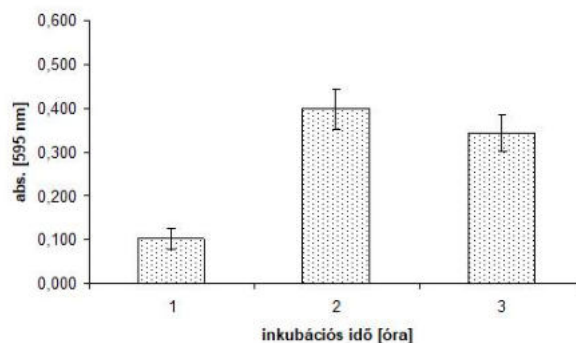
MTT módszer alkalmazása mikrotiter lemezen

Az MTT kolorimetriás módszer mikrotiter lemezen történő alkalmazása számos törzs és paraméter egyidejű vizsgálatát teszi lehetővé, illetve igen lényeges szempont, hogy a kísérletek során kevesebb mennyiségű vegyszer és táptalaj felhasználása szükséges. Azonban ahhoz, hogy a módszer ilyen módon is alkalmazható legyen, ebben az esetben is elengedhetetlen a paraméterek előzetes optimalizálása. Az inkubációs idő és az ideális MTT koncentráció meghatározásához mikrotiter lemezen *Lactobacillus plantarum* 2142 törzset alkalmaztunk $7 \cdot 10^7$ sejt/ml sejtkoncentrációban. A megfelelő MTT koncentráció meghatározásához, foszfát pufferelt sóoldatban feloldva 5, 6, 7, 8, 9 és 10 mg/ml koncentrációjú oldatokat készítettünk. Az abszorbanciát 2 órás 37 °C-os inkubációt követően mértük. A kapott eredményeket a **5. ábra** szemlélteti. A keletkezett formazán mennyisége függ az alkalmazott MTT koncentrációjától. Mivel a 8 és 9 mg/ml koncentráció között nincs szignifikáns különbség 95%-os biztonsági szinten (Minitab 13.1), ezért a további vizsgálatokhoz a 8 mg/ml MTT koncentrációt alkalmaztunk. Az ideális inkubációs idő megállapításához előzőleg optimálisnak talált 8 mg/ml koncentrációjú MTT oldatot alkalmaztunk $7 \cdot 10^7$ sejt/ml

koncentrációjú *Lactobacillus plantarum* 2142 törzs esetében. A lemezeket 37 °C-os inkubátorba helyeztük 1, 2, illetve 3 órára. A kapott eredményeket a **6. ábra** szemlélteti. A keletkezett formazán mennyisége négyszer nagyobb volt a 2 órás inkubációs idő esetében, mint az 1 órás inkubációt követően, azonban az inkubációs idő tovább növelésével, az Eppendorf csőre kidolgozott módszerrel ellentétben, itt már nem volt elérhető nagyobb formazán mennyiség. Ez az eltérés azzal magyarázható, hogy a mikrotiterlemez módszer esetében lényegesen kisebb a reakcióelegy térfogata, amely így rövidebb idő alatt elérte a



5. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142 formazán képzése különböző MTT koncentrációk esetén

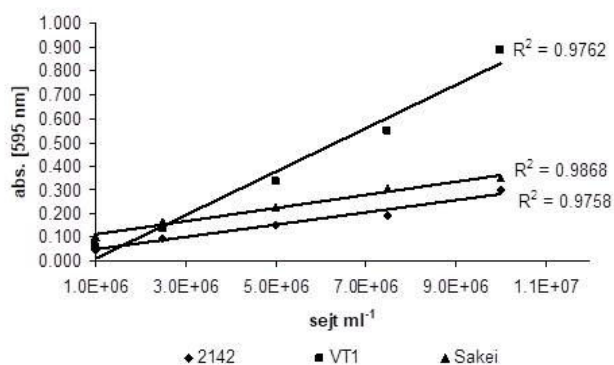


6. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142 formazán képzése 8 mg/ml MTT koncentráció és különböző inkubációs idők esetén

reakcióhoz szükséges ideális hőmérsékletet. A további kísérletekhez a 2 órás inkubációs időt és 8 mg/ml koncentrációjú MTT oldatot alkalmaztunk.

MTT redukáló képesség vizsgálata különböző törzsek esetében

Az előzőekben megállapított optimális paramétereket alkalmazva mikrotiter lemezen vizsgáltuk a különböző tejsavbaktérium törzsek enzimaktivitását. Ahogyan azt a **7. ábra** is jól szemlélteti, a különböző *Lactobacillus* törzsek eltérő dehidrogenáz enzim aktivitással rendelkeznek ugyanakkora sejtszám mellett. A legnagyobb mennyiségű formazánt a *Lactobacillus*

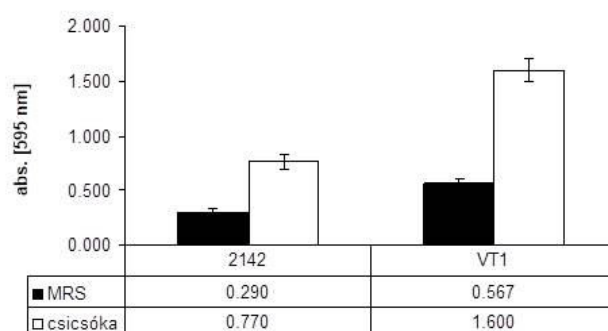


Lactobacillus rhamnosus VT1 képezte a vizsgált törzsek közül, míg a **7. ábra**: Formazán képződés és a sejtszám összefüggése

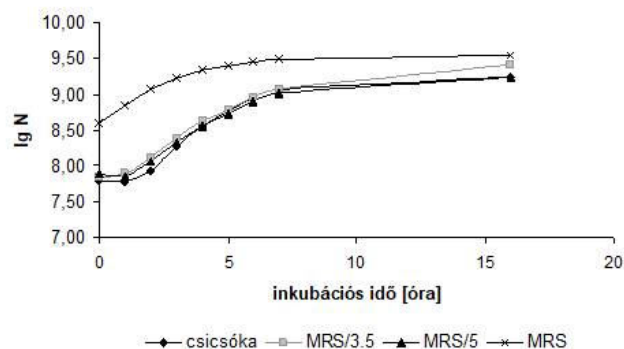
Lactobacillus plantarum 2142 és *Lactobacillus sakei* DSM 20017 közel azonos mennyiséget képeztek.

A táptalaj hatása az enzimaktivitásra

Az előző kísérletekből világossá vált, hogy a különböző tejsavbaktérium törzsek azonos sejtszám mellett eltérő enzimaktivitással rendelkeznek, vagyis adott mennyiségű MTT-ből eltérő mennyiségű formazánt képesek redukálni. A további kísérletekben megvizsgáltuk, hogy miként változik a törzsek enzimaktivitása, ha mesterséges táptalaj helyett természetes csicsóka táptalajon szaporítjuk azokat. A természetes és mesterséges táptalajokat egyaránt 10^5 sejt/ml induló sejtszámmal oltottuk be, amelyeket 30 °C-os inkubátorba helyeztünk. Tizenhét órás inkubációt követően a mintákat lecentrifugáltuk, a felülúszókat eltávolítottuk és a sejtszámokat azonosra állítottuk be fiziológiás sóoldat segítségével. Ezt követően mértük a sejtek dehidrogenáz enzimaktivitását, amelyek eredményét a **8. ábra** mutatja. Az eredmények azt mutatták, hogy ugyanakkora sejtszám mellett különböző táptalajon szaporítva az azonos törzsek esetében is eltérő enzimaktivitás figyelhető meg. A csicsóka táptalajon szaporított baktériumok enzimaktivitása mind a két törzs esetében lényegesen nagyobb volt, mint az MRS-en szaporított mikroorganizmusoké. Azt feltételeztük, hogy az azonos törzsek különböző táptalajon mutatott dehidrogenáz enzimaktivitásbeli különbsége az egyes táptalajok eltérő szubsztrátumából eredő különböző szaporodási sebességekből is következhet. Ennek a hipotézisnek az igazolására a következő kísérleteket végeztük el. Mesterséges MRS táptalaj hígításával értük el, hogy a teszt mikroorganizmus azonos szaporodási görbét mutasson mindkét táptalajon, melynek eredményét a **9. ábra** mutatja. A szaporodási görbékből arra következtethetünk, hogy az ötszörösére hígított MRS táptalajon és a csicsóka táptalajon a *Lb. rhamnosus* VT1 törzs azonos sebességgel szaporodott.

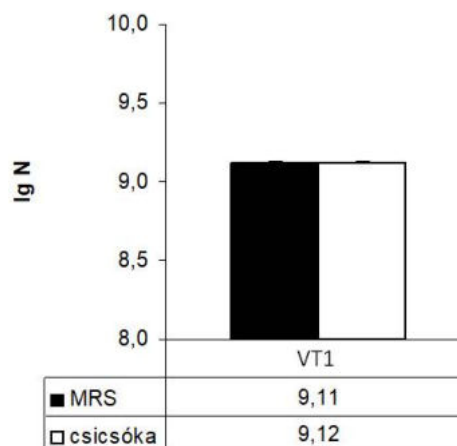


8. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142 és *Lactobacillus rhamnosus* VT1 formazán képzése azonos sejtszám és eltérő táptalaj esetén

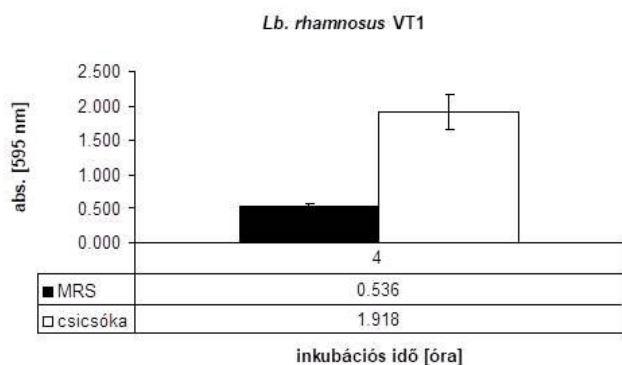


9. ábra: *Lactobacillus rhamnosus* VT1 szaporodási sebességének beállítása

A szaporodási sebességi együtthatókat kiszámolva is közel azonos eredményeket kaptunk (csicsóka: 0.01 1/min MRS/5: 0.009 1/min). A további kísérletben ötszörösösen hígított MRS táptalajt és a csicsóka táptalajt



10. ábra: *Lactobacillus rhamnosus* VT1 sejtszáma 4 órás inkubációt követően csicsóka- és ötszörösére hígított MRS táptalajon szaporítva



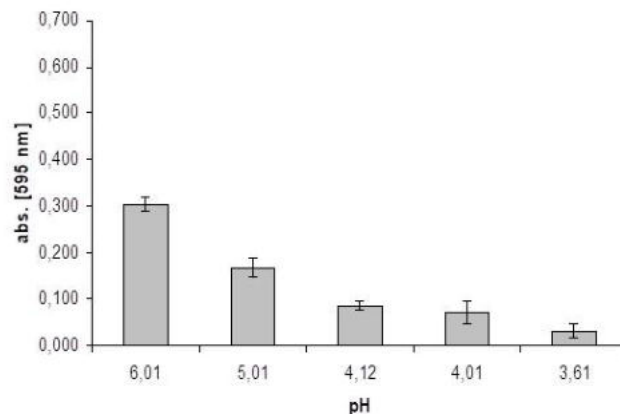
11. ábra: *Lactobacillus rhamnosus* VT1 formazán képzése (8 mg/ml MTT) azonos sejtszám és eltérő táptalajon történő 4 órás szaporítást követően

azonos induló sejtszámmal beoltva ($5 \cdot 10^8$ sejt/ml) 4 órás inkubációt követően mintát vettünk, majd meghatároztuk a sejtszámukat és az enzimaktivitásukat spektrofotométer segítségével. A **10. ábra** jól mutatja, hogy azonos induló sejtszámmal beoltva a táptalajokat, 4 óra elteltével mind a hígított MRS, mind a csicsóka táptalajon azonos sejtszámot ért el a *Lactobacillus rhamnosus* VT1 törzs. Mint azt a **11. ábra** mutatja, az azonos sejtszám és szaporodási sebesség ellenére a csicsóka táptalajon közel négyszer nagyobb enzimaktivitást mutatott a teszt mikroorganizmus az MRS táptalajon mérthez képest. Megállapíthatjuk, hogy a baktériumok enzimaktivitását a sejtszám, illetve szaporodási sebességen kívül a szaporításukhoz alkalmazott táptalaj minősége is nagymértékben befolyásolja. Ennek oka a különböző táptalajokban lévő eltérő szénhidrát forrás lehet, amelyeknek eltérő metabolizációja során a sejtek különböző mértékű dehidrogenáz enzimaktivitással rendelkeznek (Berridge et al., 1996).

A pH hatásának vizsgálata

A pH okozta változást a sejtek MTT redukálási képességében a *Lactobacillus casei* Shirota törzs példáján keresztül mutatjuk be. A teszt mikroorganizmus sejtszámát $2.36 \cdot 10^9$ sejt/ml-re beállítottuk fiziológiás sóoldatban. A törzsoldatból 3 millilitereket kivettük és beállítottuk külön-külön a pH-kat (6,01, 5,01, 4,01, 3,61). A pH beállítására 0,01 M-os HCl és NaOH oldatot alkalmaztunk. A törzsoldat eredeti pH-ja 4,12. A különböző pH-jú sejtuszpenziókat 37 °C-os inkubátorba helyeztünk 1 órára. Az inkubációt követően mikrotiter MTT módszert alkalmazva mértük az enzimaktivitást.

A **12. ábrán** bemutatott eredményekből jól látható, hogy a sejtek tetrazólium-bromid redukáló képessége a pH esésével csökkenő tendenciát mutat. A pH-



12. ábra: *Lactobacillus casei* Shirota formazán képzése különböző pH-értékeken

beállítás nélküli sejtuszpenzió a 4,01-re beállított pH-jú mintáéhoz hasonló enzimaktivitást mutatott. Az eredményeink jól egyeznek azokkal a megállapításokkal miszerint a tetrazólium sók redukálódásának a pH optimuma a semlegeshez közeli (Jámbor et al., 1956; Cesari et al., 1969). Az eredményekből az is megfigyelhető, hogy a kapott jelek nagysága elmarad a korábbi mérések során kapott hasonló sejtszám mellett mért eredményektől. Az eltérés azzal magyarázható, hogy a fiziológiás sóoldatban beállított pH-jú sejtuszpenziók enzimaktivitásának mérését 1 órás inkubáció előzte meg, amely során a sejtek élettevékenysége és így az enzimaktivitása is a tápanyagok hiányában lecsökkent.

Következtetések, javaslatok

Sikeresen adaptáltuk Wang és munkatársai (2007), eredetileg Mosman (1983) által humán sejtekre kidolgozott MTT módszerét *Lactobacillus* törzsek élősejtszám meghatározására. Megállapítottuk az optimális paramétereket: baktériumsejt koncentrációt, MTT koncentrációt, inkubációs időt, pH hatást, amelyek esetén szoros korreláció áll fenn a sejtszám és a keletkezett formazán koncentráció között. Az adaptált módszer segítségével kevesebb mint négy óra alatt meghatározható a tesztmikroorganizmusok élő sejtszáma.

A módszer laboratóriumi kutatásokban megkérdőjelezhetetlen létjogosultsága mellett a gyakorlatban is hasznosítható számos élelmiszeripari termék, legfőképpen olyan funkcionális termékek gyors vizsgálatához, amelyeknek a fogyasztás pillanatáig meghatározott számú élő sejtet kell tartalmaznia a hozzáfűzött jótékony hatás kifejtése érdekében (probiotikumok), illetve ami még lényegesebb lehet, az

élelmiszerekben előforduló romlást okozó és patogén mikroorganizmusok gyors kimutatására, ami a módszer paramétereinek további módosításaival megvalósítható.

Irodalomjegyzék

- Altman, F.P. (1976): Tetrazolium salts and Formazans. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 9(3):1-51.
[https://doi.org/10.1016/s0079-6336\(76\)80015-0](https://doi.org/10.1016/s0079-6336(76)80015-0)
- Deák, T. (2005): A mikrobavilág molekuláris szemlélete. *Élelmezési Ipar*, 59(4):105-111.
- Deák, T. (2006a): *Élelmiszer-mikrobiológia*. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
- Deák, T. (2006b): *Mikrobiológiai vizsgáló módszerek*. Budapesti Corvinus Egyetem, Mezőgazda Kiadó, Budapest.
- Denizot, F., Lang, R. (1986): Rapid colorimetric assay for cell growth and survival Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89:271-277.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6)
- Mosmann, T. (1983): Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65:55-63.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Peng, L., Wang, B., Ren, P. (2005): Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45:108-111.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.07.014>
- Twentyman, P.R., Luscombe, M. (1987): A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British Journal of Cancer*, 56:279-285.
<https://doi.org/10.1038/bjc.1987.190>
- Wang, F., Cao, L., Hu, S. (2007): A rapid and accurate 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide colorimetric assay for quantification of bacteriocins with nisin as an example. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 8(8):549-554.
<https://doi.org/10.1631/jzus.2007.b0549>
- Wang, H., Cheng, H., Wang, F., Wei, D., Wang X. (2010): An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells. *Journal of Microbiological Methods*, 82:330-333.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.06.014>

Adaptation of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay for the analysis of *Lactobacillus* strains

Hegyi F., Perjéssy J., Zalán, Zs.

Abstract

Lactic acid bacteria, including Lactobacillus strains, are widely found in nature and are important members of the human intestinal microflora. There has been a lot of research into the beneficial properties of these microorganisms for us, and it is becoming increasingly clear that without them, life would be unimaginable. This is why it is important to have as much information as possible about these essential micro-organisms. In our work, we have adapted and optimized a colorimetric method, originally suitable for human cells, to measure the enzyme activity of the test microorganisms we are investigating and to provide information on the importance of these microorganisms. By modifying and adjusting the parameters of the method reported in the literature, we obtained a rapid method for the direct detection of the enzyme activity of bacterial cells and, indirectly, their cell number in less than four hours. During the adaptation, the optimal parameters (bacterial cell concentration, MTT concentration, incubation time, effect of pH) were established, for which there is a close correlation between cell number and the formazan concentration produced. Our measurements have shown that the enzyme activity of Lactobacillus strains is strongly influenced by their instantaneous growth phase, the quality of the medium and that there is a significant difference between strains.

Keywords: MTT, Lactobacillus, enzyme activity, colorimetry

Kreszadló Luca, Soós Anita, Szedljk Ildikó Judit

Édesburgonya liszttel dúsított quinoaliszt-alapú száraztészta vizsgálata

A szerzők elérhetősége

Kreszadló Luca¹ | belső minőségellenőr
luca.kreszadlo13@gmail.com

Soós Anita¹ | egyetemi adjunktus
soos.anita@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0001-5116-7132>

Szedljk Ildikó Judit² | egyetemi adjunktus
szedljk.ildiko.judit@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0003-4095-0425> | levelező szerző

A szerzők munkahelye

¹Eisberg Hungary Kft.
Munkahely címe: 2360. Gyál, Kisfaludy Sándor utca 63.

²MATE ÉTTI Gabona és Iparinövény Technológia Tanszék
Munkahely címe: 1118 Budapest, Vállányi út 29-43.



Összefoglalás

A dolgozat célja egy alternatív őrleményből készült zöldségliszttel dúsított száraztészta fejlesztése, majd a tészta vízben oldható antioxidáns tartalmának növelése volt. A fejlesztés során három, különböző arányú összetételű száraztészta készült. Az alapanyagok a quinoa liszt, az édesburgonya liszt, a konjakliszt, valamint az ívóvíz volt. Vizsgáltuk a liszteket, lisztkeverékeket, száraztésztákat, valamint főtt tésztákat is. A minták vízben oldható antioxidáns kapacitását FRAP (Ferric reducing ability of plasma) módszerrel határoztuk meg, mely a minták vasredukáló képességén alapszik. Az érzékszervi bírálat során elvégeztük az MSZ 20050/3-83 szabvány alapján az ízesített és dúsított száraztésztákra vonatkozó érzékszervi minősítést, valamint egy JAR (Just About Right) optimum skálás minősítést is, melyet Penalty Analysis bővítménnyel értékeltünk ki. Eredményként megfigyelhető, hogy a vízben oldható antioxidáns kapacitás növelés a legtöbb édesburgonya lisztet tartalmazó mintáknál volt sikeres, valamint a főtt tészták nagyobb értéket mutattak, mint a száraztészták. Az érzékszervi minősítés során a 30% édesburgonya lisztet tartalmazó tészta kapta a legjobb értékelést.

Kulcsszavak: édesburgonya, quinoa, száraztészta

Bevezetés

A kutatómunkánk célja egy alternatív, valamint a természetéből adódóan gluténmentes őrleményből zöldségliszttel dúsított, továbbá vegán étrendbe is beilleszthető, vagyis tojásmentes száraztészta fejlesztése volt, amely tésztaként helyet kaphat az egészségtudatos táplálkozásban. Az alapanyagok

kiválasztásánál célunk volt a minél kedvezőbb beltartalmi jellemzők elérése, ezért esett a magas fehérje tartalmú quinoára, mint alternatív őrleményre a választás, zöldséglisztnak pedig az édesburgonya liszt, hiszen az édesburgonya magas antioxidáns tartalommal bír. Számos mérést végeztünk, hogy a fogyasztók számára a felsorolt jellemzők a legjobban megfeleljenek. Ezen mérések eredményeit szeretnénk bemutatni.

Botanikai értelemben a quinoa nem igazi gabonaféle, hanem egy kétszikű növény, szemben a legtöbb gabonafélével, például búzával, árpával, rizzsel, melyek egyszikűek. A quinoa a pszeudocereáliák közé tartozik. A pszeudocereáliák magjai összetételükben és funkciójukban hasonlítanak a valódi gabonafélékhez. A közös gabonafélékhez képest a pszeudocereáliák fehérjéinek aminosav összetétele kiegyensúlyozottabb, valamint magasabb az esszenciális aminosav tartalmuk. Az amarántnak magasabb a fehérjetartalma a quinoánál, azonban a hajdinának alacsonyabb, valamint a búzának is (Alvarez-Jubete és társai, 2010). Gabonafélék, például búza és kukorica fogyasztása esetén a lizin, mint esszenciális aminosav erősen hiányban van a táplálkozásban. Azonban a legtöbb növénytől eltérően a quinoa aminosav spektruma szélesebb, mint a többi gabonaféléké, hüvelyeseké. Lizin és metionin tartalma a fehérjéinek jóval magasabb, mint más gabonaféléknek (Arendt és Zannini, 2013). B-vitaminok tekintetében a quinoa jó riboflavin, tiamin és folsav forrás, ezenkívül kiváló E-vitamin forrás is (Alvarez-Jubete és társai, 2010). Arendt és társa szerint az E-vitamin jelenléte védi az összes zsírsavat, mivel természetes antioxidáns vegyületként működik.

Az édesburgonya gyökerei is fajtájától függően gazdagok keményítőben, fehérjében, élelmi rostban, lipidekben, polifenolokban, karotinoidekban, vitaminokban és ásványi anyagokban, például kalciumban és káliumban. Az édesburgonya fehérjetartalmát főleg sporaminok adják, mely molekulák esszenciális aminosavakban igencsak gazdagok, így az édesburgonya fehérjetartalma versenyképes más kiváló minőségi fehérjéket tartalmazó zöldségekkel. Az édesburgonya proteinjének hidrolizátumai jelentős antioxidáns aktivitást mutatnak. Az édesburgonya élelmi rostja jó fizikai-kémiai jellemzőkkel és funkcionális tulajdonságokkal rendelkezik (Mu és Singh, 2019). Az édesburgonya antioxidánsokban, például polifenolokban gazdag. Az édesburgonya gazdag β -karotinban, főleg a narancssárga húsú fajta. A különböző édesburgonya fajták esetében a húsuk színének változásából adódóan az antioxidáns kapacitásuk is erősen változó (Lu és Gao, 2011).

A Magyar Élelmiszerkönyv 2-321 számú irányelve szerint az egyéb száraztészták olyan tojással vagy tojás nélkül készített száraztészták, amelyekben a búzaörlemény mellett, vagy helyett más gabonaörleményt, gabonakészítményt, gabonahelyettesítő készítményt, egyéb ízesítő- vagy dúsítóanyagot tartalmaz. A Magyar Élelmiszerkönyv 2-321 számú irányelve alapján a gabonahelyettesítő készítmények olyan álgabonákból (pszeudogabonákból) (amaránt, hajdina, quinoa) előállított készítmények, örlmények, amelyek száraztészták gyártására is alkalmasak, valamint azt is

meghatározza, hogy az ízesítő- és dúsítóanyagok olyan anyagok, amelyek a termék jellegét, élvezeti értékét javítják.

Munkánk során háromfajta száraztésztát készítettünk, melyek az édesburgonya liszt és a quinoa liszt arányaiban tértek el egymástól. Az édesburgonya lisztrel való dúsítás növelésével a cél a termék antioxidánstartalmának növelése volt. További célunk volt, hogy az elkészített termékek a fogyasztók számára megfelelő élvezeti értékkel bírjanak.

Anyagok és módszerek

A célkitűzések megvalósításához kereskedelmi forgalomban kapható quinoa lisztet (Éden Prémium), édesburgonya lisztet (SzafiReform) és konjaklisztet (Naturmind) használtunk fel. A fejlesztés során készült egy 90% quinoa lisztet és 10% édesburgonya lisztet tartalmazó, egy 80% quinoa lisztet és 20% édesburgonya lisztet, valamint egy 70% quinoa lisztet és 30% édesburgonya lisztet tartalmazó száraztészták. A száraztészták minták egyenlő mennyiségű konjaklisztrel és vízzel készültek. A vizsgálatokhoz minták készültek a lisztkeverékekből, valamint a fejlesztett száraztésztákból és azok főtt verziójából is. A kísérletek során meghatároztuk a minták vízben oldható antioxidáns kapacitását, főzési idejét, nedvességtartalmát, vízfelvevő képességét és vízkiválasztását. A kémiai vizsgálatok mellett érzékszervi minősítést is végeztünk.

Az alapanyagok és az elkészített száraztészták, valamint főtt tészták nedvességtartalmát Sartorius MA 50 gyors nedvességmérő készülékkel határoztuk meg. Novasina MS1 típusú berendezéssel végeztük a vízkiválasztás értékek meghatározását.

A vízfelvétel meghatározásához az MSZ 20500/1-85 szabványt használtuk. A főzési idő megállapításához szintén az MSZ 20500/1-85 szabványt használtuk fel.

Az alapanyagokból kivonatokat készítettünk, kvarchomok felhasználásával, mechanikai feltárással. Az extrahálószer desztillált víz volt. A kapott masszát centrifugacsőbe töltjük ($0,1 \text{ g/cm}^3$) és 15 percig centrifugáljuk $4 \text{ }^\circ\text{C}$ -on 4000 percenkénti fordulatszámmal. A centrifugálás után a csőben lévő felülúszót egy Eppendorf csőbe pipettázzuk és felhasználjuk a célul kitűzött méréshez.

A vízben oldható antioxidáns kapacitását a mintáknak FRAP módszerrel határoztuk meg. A módszert, amely a minták vasredukáló képességén alapul, Benzie és Strain (1996) dolgozta ki.

Az érzékszervi minősítéshez elvégeztük az MSZ 20500/3-85 számú magyar szabvány szerinti száraztésztákra vonatkozó érzékszervi vizsgálati módszert, valamint elvégeztünk egy JAR, vagyis optimum skálás érzékszervi

vizsgálatot is, melyet a Microsoft Excel XLSTAT bővítményének Penalty Analysis programjával értékeltünk ki.

Eredmények és értékelésük

A nedvességtartalom mérések eredménye alapján megállapítható, hogy a Magyar Élelmiszerkönyv alapján meghatározott lisztekre vonatkozó legfeljebb 15% nedvességtartalom értéket nem haladja meg egyik liszt nedvességtartalma sem, valamint a száraztészták nedvességtartalma is a száraztésztákra vonatkozó maximum 13% alatt van.

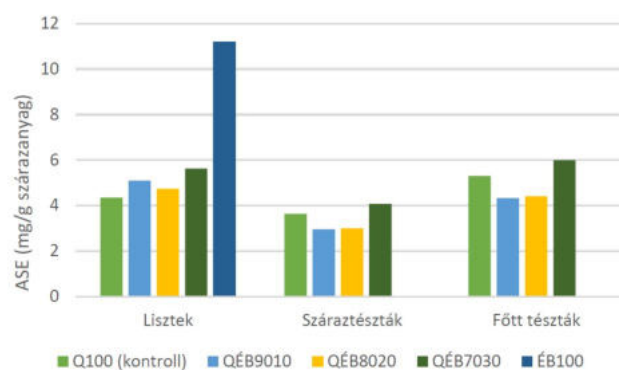
A vízakaktivitás eredmények alapján megállapítható, hogy minden mért lisztkeverék az alacsony vízakaktivitású élelmiszerek közé sorolható, így a lisztkeverékek mikrobiológiailag stabilnak tekinthetők, hiszen 0,6 vízakaktivitás érték alatt a mikroorganizmusok nem képesek szaporodni.

Mindhárom mintának szinte azonos a duzzadóképesége, így megállapítható, hogy az édesburgonya liszttel való dúsítás nincsen jelentős hatással a tészták vízfelvevőképességére.

A 10%, valamint a 20% édesburgonya lisztet tartalmazó minták esetében szinte azonos a főzési idő, azonban a 30% édesburgonya lisztet tartalmazó tészta esetében tapasztalható a legrövidebb főzési idő. Ez alapján feltételezhető, hogy a bizonyos mértékű édesburgonya liszttel való dúsítás már befolyással van a tészta főzési idejére.

A vízben oldható antioxidáns kapacitás mérés eredménye az **1. ábrán** van feltüntetve. A diagramon jól látható a 100% édesburgonya liszt antioxidáns kapacitása mennyire kiemelkedik a többi liszt értékei közül. Továbbá megfigyelhető, hogy az édesburgonya adagolása növeli a lisztkeverékek antioxidáns kapacitását, azonban a növekedés nem arányos a dúsítás növelésével. A száraztészták és a főtt tészták esetében is az figyelhető meg, hogy a 10%-kal és 20%-kal dúsított minták antioxidáns kapacitás értékei a kontroll (100% quinoa) mintához képest csökkennek, majd a 30% édesburgonyával dúsított tészta mutat magasabb értékeket a kontroll- és a többi tésztamintánál. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a célként megfogalmazott antioxidáns kapacitás növelése az elkészített, valamint a megfőzött tészták esetében csak a 30%-os dúsítással érhető el. Az is megállapítható, hogy a száraztésztákhoz képest a főtteknek emelkedett a vízben oldható antioxidáns kapacitás értéke. A főzésről ismert, hogy a kémiai összetételben jelentős változásokat indukál, befolyásolva a zöldségek bioaktív vegyületeinek a koncentrációját, valamint a biológiai hozzáférhetőségét is. A zöldségfajok morfológiai és táplálkozási

tulajdonságaitól függően ez a változás lehet pozitív vagy negatív is, valamint a hőkezelés ideje, típusa és hőmérséklete is eltérő hatással lehet a zöldségek antioxidáns tulajdonságaira (Pellegrini és társai, 2009). Dolinsky és társai 2015-ös kísérleteik során különböző zöldségek antioxidáns aktivitásának változását figyelték meg különböző hőkezelések hatására és azt tapasztalták, hogy párolás esetén minden általuk vizsgált zöldségnek nőtt az antioxidáns aktivitása, főzés hatására pedig ugyan nem minden, de több minta esetében is tapasztaltak növekedést, amit azzal magyaráztak, hogy a pro-oxidáns aktivitást serkentő peroxidáz enzimek magas hőmérsékleten inaktíválódnak, ennek köszönhetően tud növekedni az antioxidáns aktivitás. Az általunk elért eredmény tehát feltehetőleg szintén azzal magyarázható, hogy a tészták főzése során az előbb említett úgymond az antioxidáns aktivitást gátló enzimek a hőkezelés hatására inaktíválódnak, így az antioxidáns kapacitású molekulák nem sérülnek és nő az aktivitásuk.



1. ábra: Minták vízben oldható antioxidáns kapacitás értékek aszkorbinsav egyenértékben kifejezve

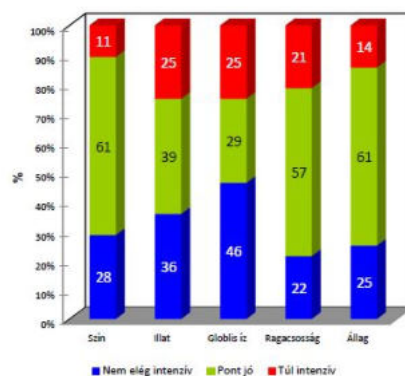
Az érzékszervi bírálat eredményeit a **2., 3. és 4. ábrák** mutatják. A **2. ábráról** leolvasható, hogy szín, ragacsosság és állag szempontjából is a résztvevők több mint 50%-a pont jó értékelést adtak a 10% édesburgonyát tartalmazó tésztamintának, azonban a globális íz esetében a bírálók 46%-a a nem túl intenzív jelzővel értékelte a tésztát. Ezen tésztaminta illata a résztvevők 39%-a szerint pont jó, viszont a bírálók közel azonos hányada, szám szerint 36%-a szerint nem elég intenzív. Az illat és a globális íz nem túl intenzívre való értékelése minden bizonnyal az édesburgonyával csak 10%-kal való dúsításnak tudható be. Ezen minta esetében a kedveltséget nagyban befolyásoló tényező a ragacsosság, emellett a nem elég intenzív illat is jelentős hatással volt a tészta kedveltségére. A 20% édesburgonyát tartalmazó tészta eredményei a **3. ábrán** láthatóak. Szín, illat, ragacsosság és állag szempontjából is a bírálók több, mint 50%-a pont jónak értékelte a tésztát. Globális íz esetében megfigyelhető, hogy nagyobb százalék ítélte meg a terméket pont jónak, mint a 10% édesburgonyával dúsított tésztát, sőt

nem elég intenzívnek már csak a résztvevők 29%-a vélte a terméket, viszont a résztvevők 32%-a már a túl intenzív kategóriába sorolta be ezt a tésztát. A termék illatát is kevesebben ítélték meg nem elég intenzívnek. Ez, továbbá a globális ízre kapott jobb értékelés vélhetően az édesburgonyával való dúsítás fokozásának köszönhető. A termék színét a bírálók közül többen ítélték meg pont jónak, kevesebben nem elég intenzívnek, valamint ugyanannyian túl intenzívnek, mint a 10%-kal dúsított tésztánál, így az édesburgonyatartalom emelésével kedvezően változott a tészta megítélése szín alapján. A nem elég intenzív szín, mint jellemző tulajdonság volt a leginkább negatív hatással ezen tésztaminta kedveltségére. A **4. ábrán** a 30% édesburgonyát tartalmazó tészta érzékszervi eredményei láthatóak. Ezt a tésztamintát minden vizsgált szempont szerint a bírálaton résztvevők legalább 50%-a pont jónak értékelte. A 30% édesburgonyával dúsított tészta színének értékelésénél a bírálók 29%-a már túl intenzívnek ítélte meg a színt, azonban 64% pont jónak és 7% még nem elég intenzívnek. A 20% édesburgonyával dúsított tésztához képest ennél a tésztamintánál már többen értékelték túl intenzívnek és kevesebben pont jónak az illatot. A tészta globális ízét ugyanannyian értékelték túl intenzívnek, mint a 20 % édesburgonyát tartalmazó tésztát, de többen értékelték pont jónak, pontosan a résztvevők 50%-a. A három tészta közül ez érte el a legtöbb pont jó értékelést az állag szempontjából. A bírálók a 20% édesburgonyát tartalmazó tésztához képest ezt a tésztát ragacosabbnak, viszont a 10%-ot tartalmazótól kevésbé ragacosnak ítélték meg. Ezen tésztaminta esetében már egyik jellemző sem befolyásolta szignifikánsan a termék kedveltségét.

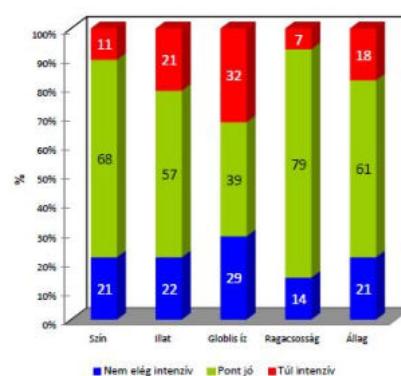
A Magyar szabvány szerinti minősítés eredménye alapján a három tésztamintából kettő az I. osztályba, egy pedig éppen lemaradva az I. osztályról, csak a II. osztályba sorolható be. Az illat, az íz és az állomány tulajdonságok alapján a 30 % édesburgonya liszttel dúsított száraztészta érte el a legjobb értékelést, valamint ez a minta érte el a legmagasabb összpontszámot is, így ez volt a résztvevők által leginkább kedvelt termék.

Következtetések, javaslatok

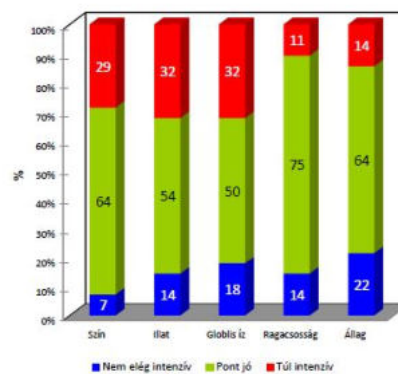
Kutatómunkánk során legfontosabb célunk volt egy olyan zöldségliszttel dúsított gluténmentes, emellett alternatív őrleményből készült száraztészta fejlesztése, amely kedvező beltartalmi tulajdonságokkal, valamint a fogyasztók körében érzékszervi szempontból is optimális paraméterekkel rendelkezik. A célok megvalósításához mind az alapanyagoknak, mind a száraztésztáknak, mind a főtt tésztáknak mértük a



2. ábra: 90% quinoa, 10% édesburgonya tészta JAR adatainak összegzése



3. ábra: 80% quinoa, 20% édesburgonya tészta JAR adatainak összegzése



4. ábra: 70% quinoa, 30% édesburgonya tészta JAR adatainak összegzése

vízben oldható antioxidáns kapacitását spektrofotometrián. A kémiai mérés eredményeképp az lett megállapítva, hogy a 30% édesburgonya liszttel tartalmazó lisztkeverék, száraztészta, valamint főtt tészta mutat jelentős emelkedést a vízben oldható antioxidáns kapacitás tekintetében a 100% quinoa lisztből készült kontroll mintával összevetve. Azonban a 10%, valamint a 20% édesburgonya liszttel tartalmazó száraztészták és főtt tészták esetében a mérések nem mutattak növekedést a kontroll mintához képest. A főtt tészták esetében a száraztésztához képest antioxidáns

kapacitás növekedés figyelhető meg. Egyre több kutatás igazolja, hogy bizonyos zöldségeknek köztük akár az édesburgonyának is különböző főzési módszerek (párolás, vízben főzés) hatására növekedhet az antioxidáns aktivitása. Az érzékszervi minősítés eredményei alapján mindhárom tészta jó eredményt ért el, azonban a legjobb értékelést a 30% édesburgonya lisztet tartalmazó tészta érte el. A 10% és 20% édesburgonya lisztet tartalmazó tészták esetében a legtöbben az illat és az íz intenzitását hiányolták, azonban a 30%-ot tartalmazó tészta ezen szempontok alapján már a legtöbbjük tetszését elnyerte. Összességében a kapott eredmények alapján a termékfejlesztést, emellett a jó beltartalmi jellemzők elérését, az antioxidáns kapacitás növelését sikeresnek mondhatjuk és úgy gondoljuk, hogy az érzékszervi bírálat alapján a fogyasztók számára is egy megfelelő terméket sikerült előállítani.

Irodalomjegyzék

- Alvarez-Jubete, L., Arendt, E.K., Gallagher, E. (2009): Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(4):240–257.
<https://doi.org/10.1080/09637480902950597>
- Arendt, E.K., Zannini, E. (2013): Quinoa. *Cereal grains for the food and beverage industries*, 409–438.
<https://doi.org/10.1533/9780857098924.409>
- Benzie, I., Strain, J. (1996): The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power: The FRAP Assay”. *Analytical Biochemistry*, 239:70–76.
<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Dolinsky, M., Agostinho, C., Ribeiro, D., Rocha, G.D.S., Barroso, S.G., Ferreira, D., ... Fialho, E. (2015): Effect of different cooking methods on the polyphenol concentration and antioxidant capacity of selected vegetables. *Journal of Culinary Science & Technology*, 14(1):1–12.
<https://doi.org/10.1080/15428052.2015.1058203>
- Lu, G., Gao, Q. (2011): Use of sweet potato in bread and flour fortification. *Flour and breads and their fortification in Health and Disease Prevention*, 407–416.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-380886-8.10037-6>
- Magyar Élelmiszerkönyv 2-321 számú irányelve (2019, 5. kiadás)
- MSZ 20500/1-85. Száraztészták vizsgálati módszerei, 1. rész. Fizikai vizsgálatok
- MSZ 20500/3-85. Száraztészták vizsgálati módszerei, 3. rész. Érzékszervi tulajdonságok vizsgálata
- Mu, T.-H., Singh, J. (2019): Sweet potato: chemistry, processing, and nutrition—an introduction. *Sweet Potato*, 1–4.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813637-9.00001-6>
- Pellegrini, N., Miglio, C., Del Rio, D., Salvatore, S., Serafini, M., Brighenti, F. (2009): Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(2):12–22.
<https://doi.org/10.1080/09637480802175212>

Investigation of quinoa flour based pasta enriched with sweet potato flour

Kreszaldó L., Soós A., Szedljak I.J.

Abstract

The aim of the research was to develop a dry pasta made from alternative flour and enriched with vegetable flour, then to increase the water-soluble antioxidant content of the pasta. We made three dry pasta, each containing different proportion of the ingredients. The ingredients were quinoa flour, sweet potato flour, cognac flour, and water. During our examination we examined the flours, the mixtures of flours, the dry pasta and the cooked pasta. The water-soluble antioxidant capacity of the samples was determined by the FRAP (Ferric reducing ability of plasma) assay, which is based on the iron-reducing ability of the samples. For the sensory qualification we did the sensory qualification for flavored and fortified dry pasta according to the MSZ 20050/3-83 standard, and we also did a JAR (just about right) optimum scale rating, which we evaluated with the Penalty Analysis extension. As a result, it was observed that the increase of the water-soluble antioxidant capacity was successful in the samples containing the most sweet potato flour, and the cooked pasta showed a higher value compared to the dry pasta. The result of the sensory qualification shows that the pasta with 30% sweet potato flour content received the best rating.

Keywords: sweet potato, quinoa, dry pasta

Antal Otilia Tamara, Nagy András, Takács Krisztina

Hal *in vitro* emésztési modellek kidolgozása haltenyésztés fenntarthatóságának elősegítése céljából

A szerzők elérhetősége

Antal Otilia Tamara | tudományos munkatárs
antal.otilia.tamara@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0001-8321-5039> | levelező szerző

Nagy András | tudományos főmunkatárs
nagy.andras.dr@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0001-5458-2665>

Takács Krisztina | tudományos főmunkatárs
takacs.krisztina@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0002-7230-6346>

A szerzők munkahelye

MATE ÉTTI Élelmiszertudományi Kutatócsoport
Munkahely címe: 1118 Budapest, Villányi út 29-43.



Összefoglalás

A takarmány aminosav- és zsírsavösszetétele jelentősen befolyásolja a halhús érzékszervi és technológiai tulajdonságait. A takarmányok fehérjetartalma elsődlegesen fontos, mert ellentétben a növényekkel, az állatok, beleértve a halakat is, csak fehérjékből képesek a testfehérjéjüket felépíteni. Az aminosavak egy részét a halak szervezete nem képes előállítani, ezeket a takarmányból veszik fel. A haltáp állati és növényi eredetű fehérjeforrásai eltérő összetételben tartalmazzák a különböző aminosavakat, és minden fehérje emészthetősége más. A haltáppokkal szembeni elvárás a jó emészthetőség, a fenntartható és gazdaságos beszerezhetőség. A kutatók új, alternatív fehérjedús takarmányalapanyagok (pl. rovarliszt) bevonásával próbálják fejleszteni a tápok biológiai értékét, hogy ezzel elérjék a halak megfelelő növekedését, a halminőség javítását.

A bevezetésre kerülő haltakarmányok minőségének igazolására *in vitro* hal emésztési modellek fejlesztése a cél, amely nagy kihívást jelent a kutatók számára. A halak nagy diverzitása, az emésztési folyamat komplexitása, az emésztést befolyásoló tényezők sokfélesége, az *in vivo* fiziológiás körülmények imitálása rendkívül nehéz feladat.

Kulcsszavak: haltakarmány, *in vitro* emésztési modell

Haltakarmányozás

A halak fehérjét, zsírokat, energiát, vitaminokat és ásványi anyagokat igényelnek táplálékukban alapvető élettani funkcióik (növekedés, szaporodás stb.) normális működésének fenntartásához. A tápokkal szemben alapvető minőségi feltételek: a hozzáférhető

tápanyagtartalom, az emészthetőség, a peszticidektől és egyéb mérgeanyagoktól való mentesség. Az emészthető és a metabolizálható energia kedvező arányban kiváló növekedést tesz lehetővé, nagy mennyiségű zsír felhalmozódását mellőzve. Általában a halak növekedése egyenesen arányos a táp fehérjetartalmával, a haltest szárazanyag tartalmának kb. 70%-át adják a fehérjék, ezért ezek a haltápok

legfontosabb vegyületei, egyben a haltáp minőségi mutatói. Ugyanakkor a fehérje a legköltségesebb haltáp összetevő (Wang et al., 2021).

A fehérjetartalom optimális szintje függ a fajtól, az életkortól, a vízhőmérséklettől, a napi adag nagyságától, az etetési gyakoriságtól, a fehérje minőségétől, vagyis az aminosav összetételétől és a nem-fehérje eredetű energia mennyiségétől (Hancz, 2011).

A kereskedelmi forgalomban kapható vízi állatoknak szánt takarmány összetétele a fő fehérjeforrás szempontjából hagyományosan a **halliszt**tól függ. A halliszt elérhetőségének csökkenése, és a költségének a növekedése, az alternatív választási lehetőségek keresését ösztönzi. Ugyanakkor a halliszt alkalmazása mint fő fehérjeforrás nem környezetbarát (Toviho & Bársony, 2020).

Az **állati eredetű fehérjék** -amelyek többnyire az élelmiszeripar melléktermékei (pl. baromfiliszt, hús- és csontliszt, toll-liszt) - alkalmasak a halliszt kiváltására. Ezek a fehérjeforrások azonban költségesek és korlátozottan hozzáférhetőek.

A **növényi eredetű fehérjék**, mint a szójabab, csillagfűrt, repce, borsó, kukoricaglutén, búzaglutén és gyapotmag lisztjei jelentős figyelmet kaptak halliszt-helyettesítőként ezek könnyebb hozzáférhetősége, alacsony áraik és magas fehérjetartalmuk miatt.

A növényi alapú takarmányokban a fehérje mennyiség és az esszenciális aminosav egyensúly általában elégtelen, anti-nutritív komponenseket tartalmaznak, és a hallisztre jellemző bizonyos összetevők (pl. taurin és hidroxiprolin) hiányoznak belőlük, ami rossz növekedési teljesítménnyel, bélgyulladásal és a halhús ízének romlásával kapcsolatos potenciális gondokat okozhat (Toviho & Bársony, 2020). Mindezek korlátozzák a halliszt helyettesítőként való alkalmazásukat.

A haltápban lévő állati és növényi eredetű fehérjeforrások különböző aminosavakat eltérő összetételben tartalmaznak. Ugyanakkor, minden fehérje emészthetősége eltérő, és a halak igénye is különbözik. Mindemellett a megfelelő haltáp-összetétel iránti növekvő igények, a dráguló és nehezen hozzáférhető takarmánytápok miatt egyre inkább szükség van új takarmányalapanyagok keresésére, innovatív tápreceptúrák kidolgozására.

A haltápban lévő növényi és állati alapú fehérjeforrások alternatív fehérjeforrásokkal (pl. rovarliszt; baktériumokból, élesztőgombákból, mikroalgákból és ehető gombákból készült egysejtű fehérjék) történő felváltása vagy kiegészítése erre megoldás lehetne (Wang et al., 2021).

A rovarok fenntartható tápanyagforrásként történő alkalmazásával kapcsolatos érdeklődés az egész világon különösen nagy figyelmet kapott (Toviho &

Bársony, 2020).

A megfelelő fehérje forrás arány (rovar fehérje és esetleg növényi fehérje és halliszt) alkalmazása a tápban, lehet legalább olyan hatékony mint a halliszt kizárólagos alkalmazása, és ugyanakkor így gazdaságosabb, fenntarthatóbb, könnyebb és folyamatos lehetne a hozzáférés a táphoz; ezenkívül kedvezőbbé teheti a halak emésztési folyamatát, az anyagcserefolyamatait, a takarmányhasznosítást, ami pozitív hatással lehet a halak növekedésére, és javíthatja a hal minőségét (jobb érzékszervi és technológiai minőség) is (Wood et al., 2004; Haug et al., 2008, Wulff et al., 2012). A rovarok feldolgozása (pl. zsirtalanítás, kitin eltávolítás, technológiai kezelés) szintén növelheti a táp minőségét (íz, emészthetőség), de mérlegelni kell a költség és a táp biológiai értékét növelő hatékonyság közötti összefüggést (Henry et al., 2015).

***In vitro* hal emésztés modellezése - a haltakarmányok minősítése céljából**

A különböző takarmánykészítmények emészthetőségének a hal növekedésére és minőségére gyakorolt hatását rendszerint *in vivo* halállat kísérletekkel vizsgálják, de az ilyen jellegű vizsgálatok időigényesek és drágák, éppen ezért gyors *in vitro* emésztési modellek felállítására van szükség a hal emésztés szimulálására.

Ezek a modellek az új haltenyésztési módok kidolgozása során választ adnak arra, hogy a takarmány vajon milyen élettani hatással van a halra, és hogy milyen módon igazíthatjuk ezt az információt a növekedéshez és a hal szöveti fehérjeinek minőségéhez. Amikor a takarmány belép a gyomor-bélrendszerbe, a pyloric ceca a gyomor után az első szerv, amely érintkezésbe kerül a takarmánnyal. Ha a takarmány megváltozik, a pyloric ceca-nak alkalmazkodnia kell az új takarmánykomponensek kezeléséhez. Az ilyen adaptációk közé tartoznak olyan morfológiai változások, mint például a bélgyulladás, vagy a kiválasztott enzim aktivitásoknak és szintjeiknek változásai (Wulff et al., 2012). A halak emésztőrendszerének élettani vonásai tehát képesek bizonyos mértékig alkalmazkodni a tápanyag igény és az étrend változásaihoz (Kumar et al., 2019).

A halak emésztőrendszere

Az *in vitro* hal emésztési modellek kidolgozása előtt meg kell ismernünk a halak emésztésének élettani folyamatait, az emésztőrendszerüket. A halfajok száma meghaladja a 20000-et, az emésztőrendszerük anatómiájában eltérő.

A fejbél a szájat és a garatot foglalja magában. Az előbél részei a nyelőcső és a gyomor (Olsson, 2011). Az emésztés helyszíne a halak esetében a nyelőcső hátulsó része, a gyomor (a különböző halfajok gyomrának mérete és alakja jelentős mértékben eltér; vannak halfajok ahol pedig nincs gyomor), a középbél (~vékonybél, 3 része: proximális, közép és disztális bél, nincs olyan egyértelmű makroszkopikus jelleg, mely elválasztaná e hármat egymástól. A felosztás sokszor tetszőleges, mindegyik körülbelül egyharmadnak felel meg.) és az utóbél (rectum, ~vastagbélnek, végbélnek feleltethető meg), valamint a pylorus-függelékek (pyloric ceca). A pylorus-függelékek zsákszerű képződmények, a felszívó felületet növelik meg, ugyanakkor az áthaladási időt is meghosszabbítják. A gyomor végén találhatóak, a proximális bélnek a kiterjesztései - epiteliális rétegük nem különbözik a bél többi részétől - (nem minden fajnál vannak jelen; valódi csontoshalaknál vannak: változó a méretük és számuk; akár 1000 függelék is jelen lehet). Ezek a zsákszerű képződmények béltartalommal telnek meg (tárolás), folytatják a gyomorban megkezdett emésztést, az emésztményből felszabaduló tápanyagokat felszívják, valamint az ürülést a bél irányába szabályozzák (Rust, 2002).

A pylorus-függelékeket gyakran pankreatikus szövet és a hasnyálat valamint az epét szállító vezetékek veszik körbe (Olsson, 2011; Rust, 2002). A pylorust követően nyílik az epevezeték az emésztőrendszerbe (Olsson, 2011).

Az utóbelet gyakran egy szelep (ileorectalis) választja el a bél többi részétől, és a mucosa megjelenése is eltérő ezen rész esetén. A bél általában az anális záróizmossal fejeződik be.

Azoknál a halfajoknál, melyek esetén hiányzik a gyomor (agasztrikus fajok), a nyelőcső egyenesen a vékonybélbe nyílik (Olsson, 2011). A gyomor nélküli fajok esetén a tárolásban szerepet játszó bélgumó („intestinal bulb”) is megjelenhet (Rust, 2002).

A bélgumónak is az élelem tárolásában van szerepe, akárcsak a gyomornak, de funkcionális és hisztológiai tulajdonságait tekintve inkább egy nagy pilórus-függelékre hasonlít. A bélgumó több szempontból is különbözik a valódi gyomortól: a fala vastagabb, nem választ ki savat, a végén nincs pylorus. A gyomor nélküli fajok (melyeknek nincs bélgumója) jellegzetesebb vonása az epevezeték belépésének a helye, ami a proximális bélben található, közvetlenül a nyelőcsövet követően. Bélgumó megjelenése esetén az epevezeték nyílása lehet a bélgumó előtt, vagy akár közvetlenül a bélgumóban.

Néhány halfajnak zúzógyomra van. A halak zúzógyomra elhelyezkedhet az igazi gyomrot követően, de az is lehetséges, hogy nem társul valódi gyomorhoz. Az a szerepe, hogy az emésztményt kicsi élelmiszer

részecskékre őrölje.

Bizonyos fajok belének egy része (pl. cápák, ráják, tüdőshalak, porcos- vértés halak (pl. tokfélék)) spirális redőket tartalmaz, ami megkönnyíti a különböző bélrégiók megkülönböztetését (Olsson, 2011). A spirális redők tulajdonképpen a mucosa (és submucosa) hajtogatódásai, melyek a bél mentén, spirális mintázatban haladnak végig, megnövelve az epiteliális (felszívó) felületet, anélkül, hogy a bél hosszára hatással lennének. A spirális redők ugyanakkor az emésztmény haladását is lelassítják (Olsson, 2011).

Néhány halfaj (pl. cápák, ráják, tüdőshalak) esetén azonban az utóbél lezárása a kloakának nevezett üregben végződik, amibe az emésztő-, húgy- és ivarvezetékek nyílnak (Olsson, 2011).

Járulékos emésztőszervek a hasnyálmirigy, az epehólyag és a máj (Olsson, 2011; Rust, 2002). A halak hasnyálmirigye képezhet egy jól meghatározott szervet (pl. csuka, cápák, tokhal, angolna) vagy lehet diffúz (a leggyakoribb eset). Ez utóbbi esetben a pankreatikus csomók lehetnek szétszórva a zsírszövetben, a mesenteriumban, a májban, az epevezeték, az epehólyag, a pylorus-függelékek és a bél körül, valamint más helyeken. Amikor a hasnyálmirigy egy egyedi szerv formájában van jelen, képezhet egy vagy két szervet. Az elhelyezkedése lehet a lép közelében, a portális véna mentén, a máj előtt, a bél mentén vagy más, a bélhez közeli területeken. A hasnyálmirigy vezetékai lehetnek közösek az epehólyagból induló vezetékkel (mely esetben közös epevezetékéről beszélünk) és/vagy lehetnek különálló vezetékek. Az exokrin pankreatikus szövet egyedi szigeteihez számos kicsi vezeték társulhat, melyek a teljes bél hosszában vezetnek a lumenbe (Rust, 2002).

A legtöbb halnak (de nem az összesnek) van epehólyagja. A halak mája lehet egyetlen szerv, de rendeződhet két vagy több különálló lebenybe is.

A tápanyagok emésztését emésztőenzimek segítik az adott bélszakaszoknak megfelelő pH tartományban (1. táblázat). Az emésztőenzimeknek több izoformája is lehet, eltérő aktivitással, pH optimummal, vagy szubsztrát-specifitással; amelyek akár a különböző környezeti tényezőkhöz való adaptációknak köszönhetőek. A gyomorban a pH 2-5; míg a bélben, a pylorus után 7-8. A gyomorban, a hasnyálmirigyben termelődnek az emésztőenzimek, melyeket az 1. táblázatban foglaltunk össze (Olsson, 2011; Rust, 2002). A gyomornélküli halak esetében a bélgumó - a gyomorral ellentétben - nem tartalmaz savat vagy pepszinogént kiválasztó epiteliális sejteket, a fehérjék lebontásáért elsősorban a tripszin felelős, mely a pilórus-függelékekben és a bél lumenében fejti ki hatását (Olsson, 2011).

1. táblázat A halak néhány emésztőenzimének általános tulajdonságai (Rust, 2002)

Enzim	Szintézis helye	Aktivitás helye	pH optimum	Szubsztrát/ működés	Termék(ek)
Pepszin	Gyomor „oxynticopeptic” sejtei (savat is termelnek)	Gyomor lumen	Savas	Nem specifikus endoproteáz, melyet a savas közeg aktivál	Peptidek
Tripszin	Exokrin hasnyálmirigy	Bél-lumen, Pilórusz-függelék lumene	Semleges	Az enterokináz által aktivált endoproteáz. A bázisos oldallánccal rendelkező aminosavak melletti peptid kötések hidrolízisét katalizálja	Peptidek
Kimotripszin	Exokrin hasnyálmirigy	Bél-lumen, Pilórusz-függelék lumene	Semleges	A tripszin által aktivált endoproteáz. A hidrofób oldallánccal rendelkező aminosavak melletti peptid kötések hidrolízisét katalizálja	Peptidek
Elasztáz	Exokrin hasnyálmirigy	Bél-lumen, Pilórusz-függelék lumene	Semleges	A tripszin által aktivált endoproteáz. A glicin és alanin melletti peptid kötések hidrolízisét katalizálja	Peptidek
Kollagenáz	Exokrin hasnyálmirigy	Bél-lumen, Pilórusz-függelék lumene	Semleges	A tripszin által aktivált endoproteáz, mely elsősorban a kollagént hasítja	Peptidek
Aminopeptidáz (savas és semleges)	Gyomor, Exokrin hasnyálmirigy, Bélműsejtek (enterocyták)	Gyomor lumen; Bél és a pilórusz-függelék lumene és kefeszegélye	Savas/ semleges	Exopeptidáz, a peptid lánc N-terminális végéről hasítja az aminosavat	Kis peptidek és szabad aminosavak
Leucin aminopeptidáz (példa semleges aminopeptidázra)	Bélműsejt	Membránnal társulva, a kefeszegélyben	Semleges	Exopeptidáz, a peptid lánc N-terminális végéről hasítja a leucint	Kisebb peptidek és szabad leucin
Karboxipeptidáz	Exokrin hasnyálmirigy és bélműsejtek	A bél és a pilórusz-függelék lumene és kefeszegélye	Semleges	Exopeptidáz, a peptid lánc C-terminális végéről hasítja az aminosavat	Kisebb peptidek és szabad aminosavak
Nem-pankreatikus lipáz vagy gyomor lipáz	A gyomor nyálkahártya (mucosa) gyomormirigyvei	Gyomor lumene	Savas	Elsősorban gyomor eredetű triacilglicerol lipáz	Lásd a triacilglicerol lipáz és foszfolipáz
Pankreatikus lipáz	Exokrin hasnyálmirigy	A bél és a pilórusz-függelék lumene	Semleges	Több, pankreatikus eredetű lipáz tartozik ide, gyakran az epe sók aktiválják	Lásd a triacilglicerol lipáz és foszfolipáz
Triacilglicerol lipáz	Gyomor, exokrin hasnyálmirigy, bélműsejtek	Gyomor lumen, a bél és a pilórusz-függelék lumene és kefeszegélye	Savas/ semleges	A triacilglicerol 1 és 3 pozíciójában található zsírsavakat hasítja, néha a kolipázzal együtt	2-monogliceridek és szabad zsírsavak
Monoglicerid lipáz	Bélműsejt	A bél és a pilórusz-függelék kefeszegélye	Semleges	A 2-monogliceridekről hasítja a zsírsavat	Zsírsavak és glicerol
Foszfolipáz	Exokrin hasnyálmirigy	A bél és a pilórusz-függelék lumene	Semleges	A foszfolipidekről hasítja a zsírsavakat	Zsírsavak és lizofoszfolipidek
Viasz-észter-hidroláz	Exokrin hasnyálmirigy	A bél és a pilórusz-függelék lumene	Semleges	A viasz észtereket hidrolizálja	Zsiralkoholok
Amiláz	Bélműsejt, bélfőra, hasnyálmirigy	Bél és bélfőra	Semleges	A keményítőt hidrolizálja	Poliszacharidok és monoszacharidok (cukrok)
Celluláz	Bél mikroflóra, az endogén termelést nem igazolták	Bél lumen	Semleges	A cellulózt hidrolizálja	Glükóz
Kitináz	Gyomor és exokrin hasnyálmirigy	Gyomor lumene, bél és pilórusz-függelék	Savas vagy semleges	Az N-acetilglükózamin (kitint) hidrolizálja	Poliszacharidok és monoszacharidok (cukrok)

Halak osztályozása táplálkozási szokásaik alapján

A halak eltérő élőhelyeken élnek és nagyon különböző tápanyagforrásokat igényelnek, mindemellett a táplálkozásuk gyakorisága is eltérő (Olsson, 2011). A halak táplálkozási szokásaik alapján lehetnek detritusz fogyasztók, növényevők, mindenevők és húsevők.

Mindegyik kategórián belül, további osztályozás lehetséges: a halak lehetnek eurifágok (az elfogyasztott élelem jellege nagyon változatos), sztenofágok (a táplálék változatossága korlátozott) vagy monofágok (csak egy fajta táplálékot fogyasztanak). Az akvakultúrában fontos halak többsége vagy eurifág húsevő/ragadozó (pl. lazac, sügér, keszeg, laposhal, rombuszhal, lepényhal), eurifág mindenevő (pl. pettyes harcsa, tilápia) vagy eurifág növényevő (pl. némelyik pontyféle) (Rust, 2002) (**1. ábra**).

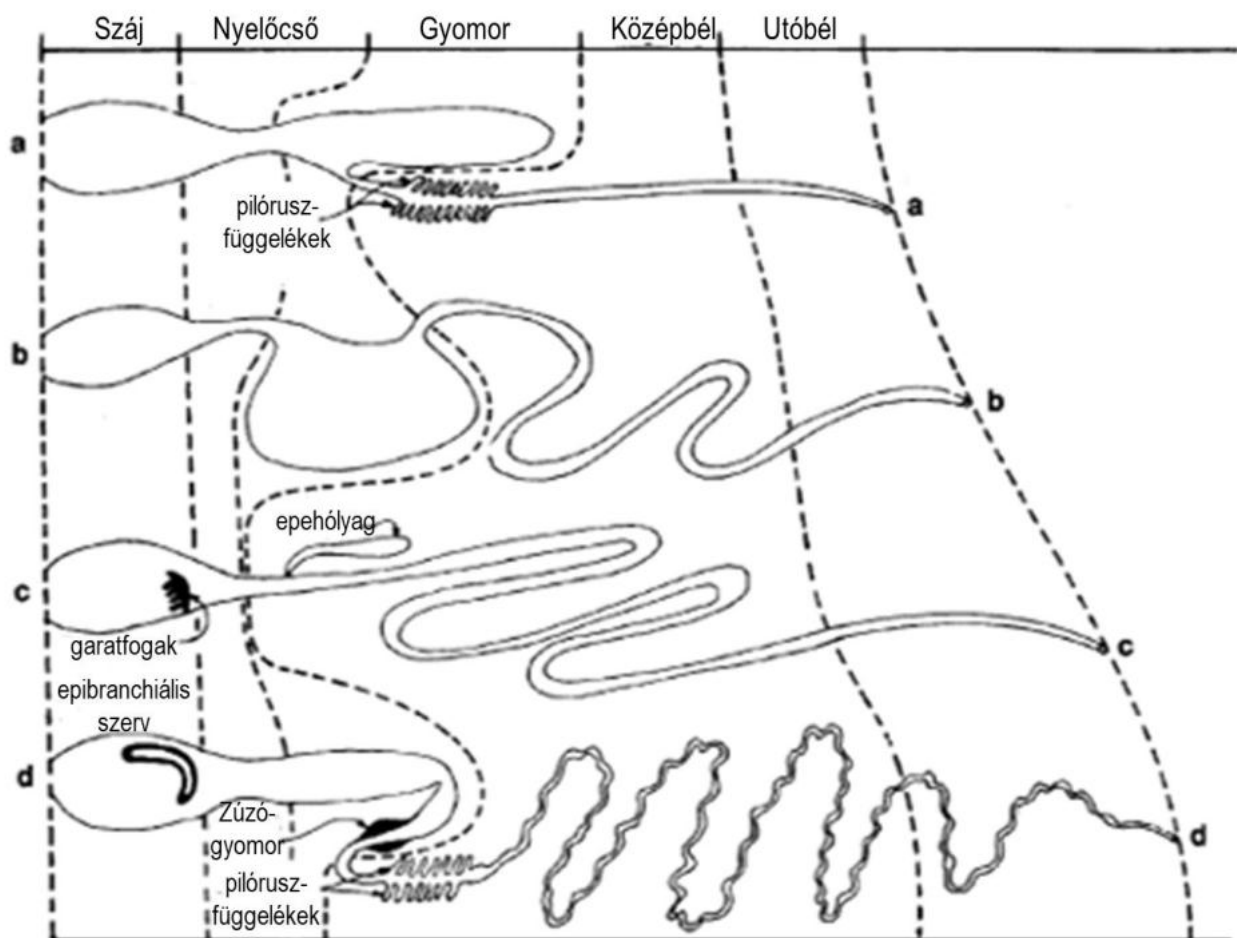
A halak táplálékforrása, valamint az emésztőrendszerük megjelenése és szerepe között közvetlen összefüggés van (**1. ábra**). A húsevőknek a bele rövid, a mindenevőké közepes hosszúságú, míg a növényevőké hosszú (a testhosszhoz viszonyítva). A növényi étrend (növényevő halak) nehezebben

emészthető, és ezért szükség lehet a hosszabb bélre (a testhosszhoz viszonyítva), hogy az emésztési idő növekedhessen. Ezen állításokat azonban óvatosan lehet általánosítani, hisz számos kivétel létezik. A növényevők és húsevők bél hosszára vonatkozó eltérések az egyedfejlődés során is megfigyelhetők, amikor az adott faj étrendje megváltozik (kezdetben húsevő, majd később inkább mindenevő táplálkozásra vált). Ez általában a relatív bélhossz változásával társítható. Azonban, több eltérő, valószínűleg fontosabb módja is létezik a bél felszínének a megnövelésére (Olsson, 2011). Ha a bél felszívó felszínének a területét a hal térfogatához viszonyítva vizsgáljuk, a különbségek kisebb mértékben fejeződnek ki, mivel így már figyelembe vesszük a függelékeket, az epiteliális hajtogatódás mértékét, és az olyan specializált képződmények jelenlétét, mint a spirális redő (Rust, 2002).

Az algákat, korallt, puhatestűeket, detrituszt vagy planktonot fogyasztó halak speciális eseteket képviselnek, melyek gyakran nem követik a húsevő, mindenevő vagy növényevő osztályozás esetén megfigyelhető jellegeket. Például a zooplankton (vagy fitoplankton) fogyasztók és a növényevők is rendelkezhetnek zúzógyomorral. Bizonyos fajoknak

gyomruk és zúzógyomruk is van, másoknak csak egyik a kettő közül. Azon halak esetén, melyek sok kalcium karbonátot tartalmazó gerincteleneket (pl. korallok, puhatestűek) fogyasztanak, hiányozhat a savas (gasztrikus) emésztés, annak ellenére, hogy húsevők. Néhány tilápia esetén, melyek vadon élő körülmények között detrituszt, algát és baktériumokat fogyasztanak, nagyon alacsony a gyomornedv pH-ja (<1,5); ami az alga-sejtfalak lízisét elősegítő adaptáció lehet. Más növényevő fajokban is bizonyították az alacsony gyomor pH-t (Rust, 2002).

víz hőmérséklet változása szintén befolyásolhatja az emésztőrendszer morfológiáját. Pl. a rövid távon hideghez hozzászoktatott pettyes harcsa (*Ictalurus punctatus*) esetén a bél hosszának és súlyának a növekedését figyelték meg. A ponty esetén a bél hossza nem változott, de a nyálkahártya felszíni területe megnövekedett. A bél paraméterek növekedése esetleg ellensúlyozhatja a kevésbé hatékony felvételt alacsonyabb hőmérsékleten. Az évszakokra jellemző változások több tényező kombinációjától függenek, beleértve a hőmérsékletet és a táplálék elérhetőségét,



1. ábra: A tipikus hal emésztőrendszer tagoltság vázlatos ábrázolása. a) eurifág ragadozó y alakú gyomorral (pl. lazac, pisztráng), b) eurifág mindenevő (főleg állati eredetű élelmet fogyaszt) kidudorodó (zsák-alakú) gyomorral (pl. harcsa, tilápia), c) eurifág mindenevő (főleg növényeket fogyaszt); nincs gyomor (ponty és aranyhal), d) sztenofág planktonevő; lemezes gyomor izmos zúzógyomorral (Rust, 2002).

A halak emésztését befolyásoló tényezők

A halak *in vivo* emésztését számos tényező befolyásolja: pl. a halak nagy diverzitása, a különböző környezeti tényezőkhez való alkalmazkodás, a különböző táplálkozási formákhoz idomult faj-specifikus gasztrointesztinális traktus morfológiája (Olsson, 2011). Az étrenden kívül a fejlődési stádiumnak és az egészségi állapotnak is fontos szerepe van. A

és az idényjellegű hormon szintnek is fontos szerepe lehet. Különböző betegségek is okozhatnak morfológiai zavarokat a gasztrointesztinális traktusban (Olsson, 2011). A víz savasodása (8- aspH- ról 7,5- ről) és a tenyésztési hőmérséklet (18 °C-tól 2 °C-ig) a bél proteáz aktivitást akár 36- 50%- kal is lecsökkentheti. A víz sótartalma és oxigén szintje szintén szignifikáns módon befolyásolhatja a lúgos proteáz aktivitást. Kimutatták, hogy a tenyésztés során alkalmazott táp befolyásolja a proteáz aktivitást (Wang et al., 2021).

Mindezen felsoroltak bizonyítják, hogy a hal-

specifikus *in vitro* emésztési modellek felállítása nem egyszerű feladat, nagy kihívás a kutatók számára.

In vitro hal emésztési modell kidolgozása

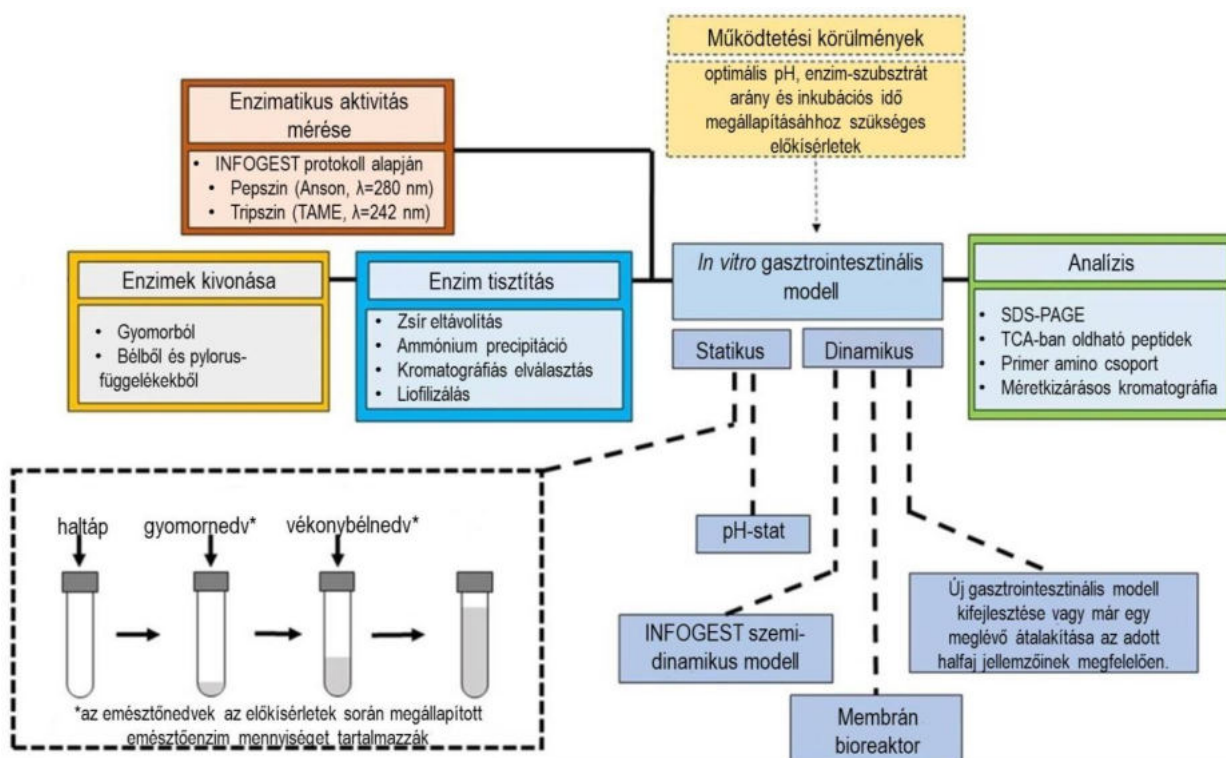
A halak esetében nincs standardizált, egységes protokoll az emésztési modellre vonatkozóan, ami a halak diverzitásából is ered. Azonban halspecifikusan, az adott halfajta emésztésének élettani sajátosságainak ismeretében lehetőség adódhat haltakarmányok emészthetőségének *in vitro* vizsgálatára. Ehhez ismerni kell tehát az adott halfajta emésztőrendszerét, a haltartási hőmérséklet tartományt (amelyben később meghatározható *in vitro* az emésztési hőmérséklet optimuma), az emésztési idő hosszát, az emésztőenzimek átlagos aktivitását, amikor a táp jelen van a gasztrointesztinális traktusban. A rendszer felállításánál az elején többnyire irodalmi adatokra tudunk támaszkodni (pl. bélrendszer pH-ja, emésztési idő), majd egy-egy paraméter beállításával, majd változtatásával újabb ismeretekhez juthatunk (pl. különböző hőmérsékleten tartott halak esetében a hőmérséklet hatása a bélnedvek enzimaktivására).

Az *in vitro* vizsgálatokhoz emésztőenzimekre van szükség, és az emésztési folyamatokat imitáló bélrendszeri fiziológiás körülmények biztosítására. A legtöbb vizsgálat mely halak *in vitro* emésztését modellezte, az emésztőrendszer különböző részeiből kinyert enzim kivonatokat használt (Moyano et al., 2015).

Bizonyos esetekben, a teljes szervezetet vagy a benne lévő emésztőanyagot használták fel enzim forrás kinyerésére (Moyano et al., 2015). Yasumaru & Lemos (2014) foglalkoztak haltakarmányokkal etetett halak *in vitro* emésztésével, amelynél az emésztés modellezésére fajspecifikus - gyomorból, pylorus-függelékéből és a bélből kinyert - emésztési enzimkivonatokat használtak fel.

Azonban több tanulmány emlős (pl. sertés eredetű) vagy baktérium eredetű kereskedelmi forgalomban kapható enzimet használt. A kereskedelmi forgalomban kapható tisztított enzimekkel, az *in vitro* modell alkalmazása révén azonban csökkenthetjük a kísérleti célra felhasznált halak számát, és ez így egy ellenőrzött, reprodukálható (nincsenek inter-individuális különbségek) módja lehetne a haltípek emészthetőségének és minőségének jellemzésére előzetes tájékozódásként.

Számos kutatócsoport hasonlította össze a halspecifikus forrásból származó és a kereskedelmi forgalomban kapható emlős enzimekkel végzett *in vitro* emésztések eredményeit (Moyano et al., 2015). Bebizonyították, hogy a hal emésztőenzimek, különösen a proteázok, a többi gerinces emésztőenzimtól eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek, főleg a szubsztrátokkal szembeni affinitásra, a reakciósebességre, a hőmérséklet optimumra és az inhibitorokkal szembeni érzékenységre vonatkozóan. Az emlős emésztőenzimeket sokkal nagyobb mértékben gátolják a



2. ábra: Hal *in vitro* emésztési modellek kidolgozási lehetőségei (Wang et al., 2021)

reakciótermékek, mint a hal emésztőenzimeket. Több szerző szerint ezért a faj- specifikus emésztőenzim kivonatokkal végrehajtott *in vitro* emészthetőség vizsgálat az *in vivo* körülmények reprezentatívabb modellezését, a biológiai elérhetőség sokkal pontosabb becslését teszi lehetővé (Wang et al., 2021).

Azonban a hal eredetű emésztőenzimek nem kaphatók kereskedelmi forgalomban, így magából a halból kell kivonni őket.

A **2. ábra** a hal *in vitro* emésztés kidolgozásának fontosabb lépéseit (enzim kivonás, -tisztítás, - aktivitásmérés reakciókörülmények (optimális pH, enzim-szubsztrát arány, inkubációs idő megállapítása)) és a lehetséges modell típusokat (pl. statikus/dinamikus) mutatja be. Ezen kívül összefoglalja azokat az *in vitro* emésztés végén alkalmazható analitikai (pl. SDS- PAGE kromatográfia) módszereket, melyeket sokan alkalmaznak fehérje emészthetőség felmérésére (Wang et al., 2021).

2011-ben indult el az ún. COST INFOGEST FA1005 Akció „Improving health properties of food by sharing our knowledge on the digestive process” címmel, amelynek feladata volt vezető európai intézetekből álló hálózat felépítése egy közös cél: az élelmiszerek emésztése, és a tápcsatornában történő lebomlási folyamatok teljes megismerése érdekében. A COST 4 éves periódusa alatt megszületett számos *in vitro* emésztési protokoll összefésült változata, az ún. harmonizált protokoll, melyben az eddig ismert előnyöket, hátrányokat figyelembe vették, valamint a valós körülményeket a legjobban megközelítették. Publikálásra is került az INFOGEST protokoll (Minekus et al., 2014; Brodorb et al., 2019), amelynek újdonsága, hogy az enzimes bontást a módszer meghatározott aktivitással, meghatározott szubsztrát-enzim aránnyal, meghatározott emésztési ideig, adott hőmérsékleten, stb. végzi.

Mivel a halak esetében nem született egységes konszenzus az emésztési modellre vonatkozóan, így ebből a humán emésztésre vonatkozó egyezményes protokollból kiindulva szintén elképzelhető a hal emésztési modellek felépítése. A legtöbb hal *in vitro* emésztési modell statikus. Az egyik legígéretesebb humán modell, amit hal emésztés modellezésére lehet átalakítani, a szemi-dinamikus INFOGEST modell, mely a gyomor szakasz bizonyos vonásait dinamikus módon modellezi, de megőrzi a Minekus et al. (2014) által kifejlesztett modell költség- és eszköz-hatékonyságát (Mulet-Cabero et al., 2020).

A **membrán bioreaktor** modell a folyamatos tápanyag felszívódást is modellezi, két kamrából áll. A belső reakció kamra és a külső kamra között egy dialízis membrán található.

A **pH-stat** módszerrel, mindamellett, hogy az emésztés pH-ját lehet szabályozni, a fehérje összetevő hidrolízisének a mértékét is lehet vizsgálni (Wang et al.,

2021).

A halfajtól és a fejlődési stádiumtól függően, az *in vitro* gasztrointesztinális modell állhat egy vagy két szakaszból. A gyomor nélküli halak esetén nincs szükség gasztrikus szakaszra, de ha gyomorral rendelkező fajt vizsgálunk, a bél szakaszt egy savas, gasztrikus fázis kell megelőzze. A hal lárváknak még nincs funkcionális gyomra, ezért ez esetben elég egyetlen szakasszal modellezni az emésztést, a teljes lárvából kivont enzimekkel (Wang et al., 2021).

A halak által kiválasztott emésztőenzim mennyisége és aktivitása jelentős mértékben függ a környezeti tényezőktől és a tápláléktól, éppen ezért is nehéz a hal emésztés modellezése. Egyelőre idáig az enzimszubsztrát arány meghatározására nem született egyértelmű konszenzus (Moyano et al., 2015).

Yasumaru & Lemos (2014) a haltakarmányokkal etetett halak *in vitro* emésztése után tudta alkalmazni a fehérje-hidrolízisfok *in vitro* pH- stat meghatározását a takarmányfehérjék minőségének felmérésére és a fehérje-emészthetőség jóslására.

Úgy gondoljuk, hogy e módszer megfelelősége akkor tekinthető elfogadottnak, ha az *in vitro* hal emésztési modell egy előre megállapított paraméterekkel beállított rendszer, melyben pontosan ismerjük az alkalmazott enzimek aktivitását, így nagyobb reprodukálhatóságot és könnyebb, egyértelműbb kiértékelést biztosít(hat), mint az *in vivo* hal kísérletek.

Irodalomjegyzék

- Brodorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., ... & Recio, I. (2019): INFOGEST Static *In Vitro* Simulation of Gastrointestinal Food Digestion. *Nature Protocols*, 14(4):991-1014.
<https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Hancz, Cs. (2011): Haltakarmányozás.
<https://docplayer.hu/3203439-Haltakarmanyozas-hancz-csaba.html>,
 Hozzáférés időpontja: 2022.04.20.
- Haug, A., Rødbotten, R. Torunn Mydland, L. Christophersen, O.A. (2008): Increased broiler muscle carnosine and anserine following histidine supplementation of commercial broiler feed concentrate. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 58:71-77. <https://doi.org/10.1080/09064700802213545>
- Henry, M., Gasco, L., Piccolo, G. & Fountoulaki, E. (2015): Review on the use of insects in the diet of farmed fish: Past and future. *Animal Feed Science and Technology* 203:1-22.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.03.001>
- Kumar, V., Wang, H., Lalgudi, R.S., Mcgraw, B., Cain, R., Rosentrater, K.A. (2019): Processed soybean meal as an alternative protein source for yellow perch

- (*Perca flavescens*) feed. Aquaculture Nutrition. 25:917– 931. <https://doi.org/10.1111/anu.12911>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W. & Brodkorb, A. (2014): A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. Food & Function, 5(6):1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Moyano, F.J., de Rodriganez, M.A.S., Diaz, M., Tacon, A.G.J. (2015): Application of *in vitro* digestibility methods in aquaculture: constraints and perspectives. Reviews in Aquaculture, 7(4):223– 242. <https://doi.org/10.1111/raq.12065>
- Mulet-Cabero, A.I. , Egger, L., Portmann, R., Ménard, O., Marze, S., Minekus, M., Le Feunteun, S., Sarkar, A., Grundy, M.M., Carrière, F., Golding, M., Dupont, D., Recio, I., Brodkorb, A., Mackie, A. (2020): A standardised semi-dynamic *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. Food Funct, 11(2):1702–1720. <https://doi.org/10.1039/c9fo01293a>
- Olsson, C. (2011): The Gut. Gut anatomy and morphology. In: Encyclopedia of fish physiology. From genome to environment. (Szerk. Farrell, A.P., Stevens, E.D., Cech, J.J., Richard,s J.G.) Elsevier, London, Waltham, San Diego, pp. 1268–1275. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374553-8.00071-x>
- Rust, M.B. (2002): Nutritional Physiology. In: Fish Nutrition. (Szerk. Halver, J.E., Harry, R.W.) Academic Press, San Diego, London, pp. 367–417. <https://doi.org/10.1016/b978-012319652-1/50008-2>
- Toviho O.A., Bársony P. (2020): Insect based-protein: A new opportunity in animal nutrition. Acta Agraria Debreceniensis, 1:129–138. <https://doi.org/10.34101/actaagrar/1/3744>
- Wang, R., Mohammadi, M., Mahboubi, A., Taherzadeh, M.J. (2021): *In-vitro* digestion models: a critical review for human and fish and a protocol for *in-vitro* digestion in fish. Bioengineered, 12(1):3040–3064. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1940769>
- Wulff, T., Petersen, J., Nørrelykke, M.R., Jessen, F., Nielsen, H.H. (2012): Proteome analysis of pyloric caeca: a methodology for fish feed development? Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(34):8457–64. <https://doi.org/10.1021/jf3016943>
- Wood, J.D., Richardson, R.I., Nute, G.R., Fisher, A.V., Campo, M.M., Kasapidou, E., Sheard, P.R., Enser, M. (2004): Effects of fatty acids on meat quality: a review. Meat Science 66:21–32. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(03\)00022-6](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(03)00022-6)
- Yasumaru, F., Lemos, D. (2014): Species specific *in vitro* protein digestion (pH-stat) for fish: method development and application for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), cobia (*Rahycentron canadum*), and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 426–427:74–84. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.012>

Development of *in vitro* fish digestion models to promote the sustainability of fish breeding

Antal O.T., Nagy A., Takács, K.

Abstract

The amino acid and fatty acid composition of feed influences the sensory and technological properties of fish meat. The protein content of feed is very important, because animals, including fish, can build up the proteins in their body only from proteins. Fish have to gather several amino acids from the feed, because their organism is not able to synthesise them. Animal- and plant- based protein sources of feed contain the different amino acids in various proportions, and the digestibility of each protein is different. Good digestibility, sustainable and economical availability are required for fish feed. Researchers are trying to improve the biological value of feeds by involving new, alternative protein-rich feed materials (e.g. insect flour) in order to achieve proper growth of fish and improve fish quality.

The goal is to develop *in vitro* fish digestion models to verify the quality of fish feed, which will be a big challenge for researchers. The great diversity of fish species, the complexity of the digestive process, the variety of factors that influence digestion, and the implementation of the *in vivo* physiological conditions are extremely difficult tasks.

Keywords: fish feed, *in vitro* digestion model

Jánosi Anna, Koppányné Szabó Erika, Némethné Szerdahelyi Emőke

Fehérje- és DNS-kimutatáson alapuló állatfaj-specifikus vizsgálati eljárások áttekintése

A szerzők elérhetősége

Jánosi Anna | tudományos főmunkatárs
janosi.anna@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0002-7200-4487> | levelező szerző

Koppányné Szabó Erika | tudományos főmunkatárs
koppanyne.szabo.erika@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0001-8321-7157>

Némethné Szerdahelyi Emőke | tudományos főmunkatárs
nemethne.szerdahelyi.emoke@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0003-2419-5802>

A szerzők munkahelye

MATE ÉTTI Élelmiszertudományi Kutatócsoport
Munkahely címe: 1118 Budapest, Villányi út 29-43.



Összefoglalás

A húsok és hústermékek vizsgálatában az élelmiszer-biztonság és a minőségbiztosítás szempontjait figyelembe véve fontos lehet az állatfajok azonosítása, és az idegen fehérjék (növényi és nem-hús eredetű állati fehérjék) kimutatása. Az eredetvizsgálat műszeres megközelítését indokolja, hogy darált húsok, fagyasztott tömbhúsok, különféle hústermékek esetén a fajok érzékszervileg sokszor már nem azonosíthatók. A gazdasági okok mellett a húsok azonosításának egészségi, vallási és állatvédelmi szempontból is nagy a jelentősége. A húsok faj-specifikus eredetének meghatározására az élelmiszeraanalitikai eljárások széles skálája alkalmazható, mely módszerek leggyakrabban a fehérjék vagy a DNS vizsgálatán alapulnak, cikkünkben ezeket tekintjük át.

Kulcsszavak: állatfaj azonosítás, fehérje kimutatás, DNS kimutatás

Bevezetés

Az állati eredetű élelmiszerek kedveltségük és áruk miatt gyakran célpontjai az élelmiszerhamisításoknak. Emellett azonban a tématerületnek egészségvédelmi (pl. vad fajok és haszonállatok eltérő mikrobiológiai állapota), export-import ellenőrzési, vallási fogyasztási tabuk figyelembe vétele, állatvédelmi és vadászati (védett fajok vadászata, illegális behozatala) vonatkozásai is lehetnek. A fogyasztók tájékoztatására, a minőségi termék-előállítás biztosítására szolgál a megfelelő jogszabályi környezetben a kötelező jelölések és nyomonkövethetőségi rendszerek kialakítása. A

dokumentáció mellett azonban szükséges olyan analitikai módszerek rendelkezésre állása és fejlesztése, melyekkel egy egyszerű/összetett vagy friss/feldolgozott termékben is megvalósítható a szelektív, faj és/vagy fajta-specifikus húseredet vizsgálat. A leggyakrabban használt módszerek általában specifikus fehérjék vagy DNS-szakaszok azonosításának elvén működnek. Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE), kétdimenziós elektroforézis (2DE), izoelektromos fókuszálás (IEF), kapilláris elektroforézis (CE) és az immunanalitikai technikák (ELISA, immunkromatográfia) általánosan használt fehérje kimutatáson alapuló módszerek. Ezek a technikák azonban nem minden esetben alkalmasak

vörösáruk és konzerv-típusú hústermékek vizsgálatára, mivel a legtöbb oldható fehérje a tartósítási eljárások során aggregálódik vagy degradálódik. A húsfehérjék és az ellenanyagok kovalens kötésű immunkomplexének kimutatásán alapuló immunanalitikai technikák (ELISA) egy része hőkezelt termékek esetében is működik.

Hátrányuk azonban, hogy egyes fajok egymás melletti kimutatása esetében (csirke-pulyka; sertés-vaddisznó; marha-birka-szarvas) a kifejlesztett immunszérumok keresztaktivitást mutathatnak.

A DNS kimutatásra alapozott technikák előnye, hogy a DNS szekvencia az adott élőlényre jellemző, minden sejtjében azonos. A polimeráz láncreakción alapuló DNS sokszorozás (PCR) technikájának kidolgozása (Mullis, 1987), illetve különböző változatainak elterjedése számos területen hozott jelentős újításokat a bűntények felderítésétől egészen az élelmiszer-analitikáig, orvosi diagnosztikáig. Az eljárás alapja egy adott DNS szekvenciasor *in vitro* felszaporítása 1 kópiáról, elméleti szinten akár 1 millió másolatra. A módszer számos változatát dolgozták ki hús-eredet meghatározásra, mint az egyszerű-PCR, multiplex-PCR, PCR-RFLP, real-time PCR. Legújabb fejlesztések közé tartozik az izotermális PCR eljárás, mely állandó hőmérsékleten történő vizsgálatot jelent, eltérően a korábbi ciklikus, hőprofilos PCR és real-time PCR eljárások helyett, így akár terepen is alkalmazható ún. field-teszteket alapozva meg.

Fehérje alapú vizsgálatok

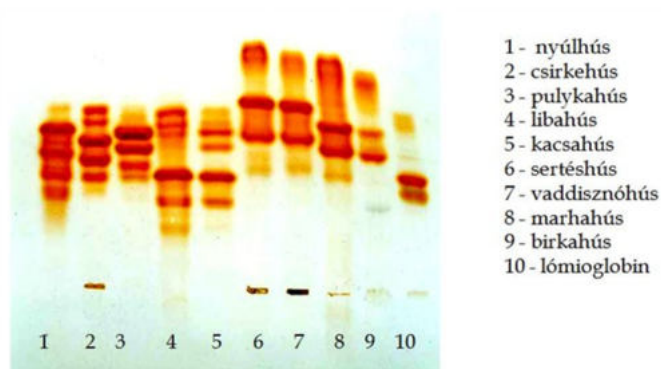
Az élelmiszeranalitika területén az utóbbi évtizedekben igen nagy szerepet kaptak az elektroforetikus és kromatográfias módszerek a fehérjék izolálásában és tisztításában, valamint az állati és növényi eredetű fehérjék jellemzésében.

A húsfehérjék kutatásában az elektroforetikus vizsgálatok – az állatfajok azonosításán és az idegen fehérjék kimutatásán túl – alkalmazhatóak a fehérjemintázatra ható különféle tényezők, (pl. fajta, tartási mód, érlelés, fagyasztás, hőkezelés stb.) nyomon követésére is. Az izomfehérjékben bekövetkező változások tanulmányozása szempontjából előnyös, hogy az elektroforézist követően az általánosan alkalmazott fehérje festéseken kívül más, nagyobb érzékenységgű és különféle specifitású detektálási módszerek is használhatók. A fehérjék elektroforetikus szeparálása alapul szolgálhat további, pl. immunológiai vagy enzimes vizsgálatok elvégzéséhez is. A hús fehérjéi közül a szarkoplazma fehérjékre jellemző, hogy fajspecifitással rendelkeznek. A miofibrilláris fehérjék kevésbé fajspecifikusak, másrészt a tárolás során részben bomlást szenvednek. Ezért az állatfajok

azonosítására elsősorban a szarkoplazma fehérjék használhatók, míg az egy állatfajon belül, a fehérje szerkezetében az élelmiszeripari technológiák hatására bekövetkező, a termék minőségét befolyásoló változások nyomon követésére a miofibrilláris fehérjék megfelelőbbek.

A nátrium-dodecilszulfát (SDS) poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) módszerrel molekulatömeg szerint szeparáljuk a fehérjéket, így az egyes fajokra jellemző mintázat a fehérjék molekulatömegének eltérésein alapul. Ekici (2008) sertéshús és birkahús fehérjemintázatát hasonlította össze, és megállapította, hogy a módszer alkalmas 5% hozzáadott sertéshús kimutatására keverékekből is. Ezt az eljárást sikeresen alkalmazták halfajok azonosítására is. Tajvani kutatók számos murénafaj fehérjéit hasonlították össze, és a miofibrilláris fehérjék esetén az alacsony molekulatömeg tartományban (< 30.0 kD) olyan mintázatot kaptak, ami lehetővé tette az ételmérgezést okozó fajok elkülönítését (Chen és mtsai, 2010).

Az izoelektromos fókuszálás (IEF) az egyes fehérjék izoelektromos pontjának eltérésén alapul. Az IEF egy igen nagy felbontóképességgel rendelkező analitikai módszer, különösen akkor, ha a vékonyrétegben immobilizált pH-gradienst alkalmaznak. A makromolekulák ilyen körülmények között már 0,001 pH izoelektromos pont különbséggel is elválaszthatók. (Hajós, 1993). A fajok azonosítására a szarkoplazma fehérjék közül a mioglobinnak vizsgálata különösen előnyös, mivel az egyes mioglobinnak sávok izoelektromos pontja jellemző a fajokra. Mivel a mioglobin önmagában is színes, a mintázat nagy mioglobin tartalmú húsok esetén festés nélkül is felismerhető. A mioglobin frakciók azonban a hemfehérjék peroxidáz aktivitása alapján az elektroforetikus elválasztást követően pszeudoperoxidáz festéssel specifikusan és érzékenyen detektálhatók, így a világosabb húsrészekből is kimutathatók (**1. ábra**). Az egyes élelmiszeripari technológiák azonban megnehezíthetik a fajok azonosítását, erősen hőkezelt



1. ábra: Mioglobin atlasz (szerzők saját eredménye)

termékek, pl. konzervek esetén a mioglobín mintázat alapján az állatfajok azonosítása már nem lehetséges. Csehi és munkatársai (2016) a nagy hidrosztatikus nyomáskezelés (HHP) hatását tanulmányozva húsminták mioglobín mintázatára azt tapasztalták, hogy a sertéshúsból származó mioglobín 300 MPa nyomáson jelentős mértékben denaturálódott, míg a marhahús mioglobinja 500 MPa-ig is natív maradhat.

Szilárd fázisú immunanalitikai módszerek (ELISA)

Az immunkémiai módszerek élelmiszer-analitika területén történő alkalmazásának az első publikációja 1974-es, Ludström és munkatársainak kutatásáról jelent meg, amely a vágósertésekben és vaddisznóban előforduló *Trichinella spiralis* parazita kimutatását taglalja. A nyers húrok faj-szerinti azonosításához elsősorban nagy molekulású vészérum fehérjéket, albuminokat, globulinokat használnak. Itt probléma lehet, hogy a húsból a maradék vértartalom függhet a vágás minőségétől (Griffith és Bellington, 1984), valamint felmerül a keresztreakció kérdése is, amennyiben a termék vérfehérjét, illetve nem hús-eredetű fehérjét, mint tej- vagy tojásfehérjét tartalmaz (Goodwin, 1992). Alkalmazásuk hátránya, hogy nem specifikusak és keresztreakciókat mutathatnak használatuk során. Ilyen keresztreakciókat adhatnak faj-specifikus meghatározás esetében a sertés és vaddisznó; a marha, szarvas és birka, valamint a különböző baromfi fajok mintái. A későbbiekben a módszerfejlesztések során igyekeztek felváltani a szérumfehérjéket vízzoldható húsfhérjékkel. A további érzékenység növelésére „szendvics” elrendezésű módszereket fejlesztettek. Emellett az immunszérumspecifitás növelésére a keresztreaktivitást fehérje kimerítéssel szüntették meg a mérés előtt. Ezt a technikát alkalmazták Martin és munkatársai (1988a, b, c) sertés, ló és csirke húrok kimutatására nyers húskeverékekből. A hibridóma technika terjedésével, antigénként megtartva az oldható izomfehérjéket a monoklonális ellenanyag előállításának irányába tolódott el a kutatás.

Ennek segítségével dolgoztak ki csirke (Martin és mtsai, 1991), sertés (Morales és mtsai, 1994) azonosítására alkalmas mérőrendszereket, melyeket nyers húrok meghatározásához tudtak igen jól felhasználni. Eközben mind nagyobb igény volt arra, hogy az azonosítás hőkezelt, feldolgozott termékekből is megvalósítható legyen. Hőstabil antigének alapuló ELISA rendszerek kidolgozásában Sherikar és munkatársai (1993) indirekt ELISA rendszert dolgoztak ki húszonosítás céljából. Saját fejlesztésű hőstabil

fehérjekomponenst használtak specifikus immunszérumok előállítására. A poliklonális szérumban jelenlévő a keresztreakciók kivédésére a keresztreakgáló fehérjékkel kimerítették a szérumokat, így téve azokat mono-specifikussá. Jelenleg a kereskedelmi forgalomban is vannak olyan ELISA tesztek, melyekkel állatfaj kimutatási vizsgálatok elvégezhetők.

DNS kimutatásra épülő technikák

A polimeráz láncreakción alapuló eljárások, röviden PCR-technikák a sejtek genetikai információját meghatározó DNS kimutatásán alapulnak, melynek lépései: a DNS izolálása, a DNS-szakaszok enzimes reakcióval történő megsokszorozása, és a kapott termék/termékek azonosítása. Az 1970-es évek elején Khorana és mtsai. írták le elsőként a DNS oligonukleotidok és DNS polimeráz enzim segítségével történő, „*in vitro*” megsokszorozását, a DNS felsokszorozásnak (amplifikáció) láncreakcióvá fejlesztését Kary Mullis dolgozta ki, aki munkásságának elismeréseként 1993-ban Nobel-díjat kapott. A PCR-módszer felhasználásával, néhány óra lefutása alatt néhány molekulából milliárdos kópiaszámú fragmens állítható elő, mely már alkalmas a kimutatásra.

A dezoxiribonukleinsav (DNS) kimutatásán alapuló módszerek élelmiszer-analitikai célokra történő alkalmazásának kritikus pontja azonban a technikák egyik alaplépése a minta DNS tartalmának kivonása. Élelmiszerek vagy a húrok érése során ugyanis átlagos DNS láncméret csökkenéssel és mátrixhatással (élelmiszer sokkomponensű összetétele) is számolni kell. A friss húsból izolálható DNS-lánc hossza 20-50 kilobázispár, mely néhány napos érlelés és tárolás során is 15-20 kilobázispárra csökken, és két hét után már a 100-300 bázispár tartomány felé való eltolódás figyelhető meg. Szintén fragmens méret csökkenés tapasztalható a fermentációs úton előállított szalámik és kolbászfélék esetében. A hőkezelés, különösen a 121 °C-on való sterilizálás pedig drasztikus fragmensméret csökkenést okoz, és az átlagos bázispár méret 400 bázispár alá esik vissza (Teletchea, 2005). Emellett az élelmiszerminta bármiféle fizikai vagy kémiai kezelése (pl. pH, hőmérséklet, nyíró erők) a DNS károsodásához, fragmens méretének csökkenéséhez vezet és a különböző helyeken bekövetkező lánctörések miatt, előfordulhat, hogy a kimutatás lehetetlenné válik. Másrészt a technika mennyiségi mérésre alkalmassá tétele sem teljesen megoldott probléma, pl. a mintának megfelelő technológiailag „kezelt” standardok megközelítésében. Állatfajok vizsgálata esetében, pedig pl. az emlősök és madarak eltérő genomhossza okozhat problémát. Szintén kevésbé tanulmányozott terület az is, hogy az élelmiszer-mátrixból történő izolálást követően

a kapott minta (izolálási eljárástól függően) hogyan reprezentálja a termék eredeti összetételét.

Az egyszerű PCR és a PCR-RFLP a DNS alapú állatfaj azonosítás legegyszerűbb változatainak tekinthetők. A specifikus vizsgálatokban egyszerű PCR esetében csak a kapott állatfaj mintájának jelenléte esetében kapunk jelet a mintából, melyet gélelektroforézises elválasztást és festést követően teszünk láthatóvá. Egyszerű és pontos módszer, sikeres alkalmazásáról nagy számú publikáció található meg emlősök és madarak vonatkozásában. Kezdetben genomiális géneket használtak, a későbbiekben, a 2000- res években megjelent anyagokban, a mitokondriális gének alkalmazását írják le, mivel ezek esetenként nagy, sejtenként akár 1000- es kópiaszámban találhatóak a sejtekben, így a kimutatás sikeresebb. Cytokróm b, D loop illetve 12S RNS-t kódoló szekvenciákat használnak a szerzők (Farag és mtsai., 2015)

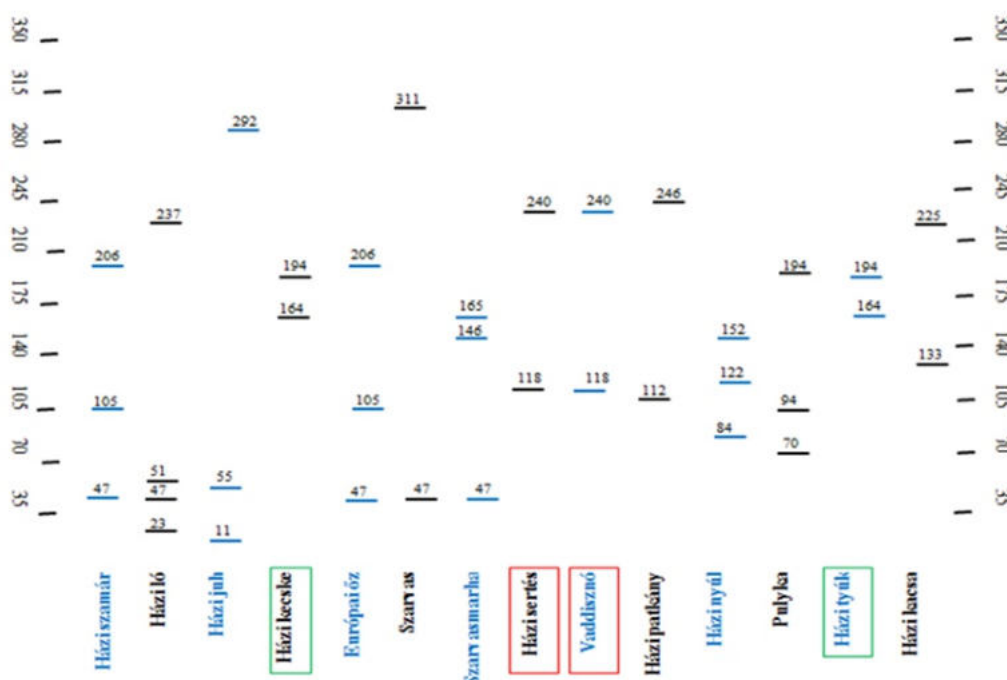
PCR-RFLP változat alkalmazásakor a PCR reakciót követően egy restrikciós enzim kezelés következik, így az elválasztó gélen egy sávmintázat jön létre, mely fajtajellemző, hasonlóan a fehérje miogloblin atlaszéhoz (2. ábra). A restrikciós enzimek specifikus, 4-8 nukleotid hosszú szekvenciát ismernek fel a DNS- láncon és azt annak meghatározott pontja mentén hasítják el. Az ezzel az eljárással nyert DNS- fragmensek mérete és száma lesz fajra jellemző. Állatfajok PCR- RFLP alapú azonosítására leggyakrabban mitokondriális eredetű gének, közülük is a citokróm b fehérjét kódoló gén rövidebb- hosszabb szakaszait sokszorozzák fel. A legtöbb ezirányú kutatás alapja Meyer és mtsai. (1995) által publikált citokróm b fehérjét kódoló gén

359 bázispár hosszú szakaszának PCR- RFLP vizsgálata. Kutatásuk során meghatározták a sertés, marha, vaddisznó, bölény, birka, kecske, ló, csirke, pulyka és emberi génszakasz mintegy hat (AluI, RsaI, TaqI, HinfI, HaeIII és MboI) restrikciós enzim hasítás utáni fragmenshossz eloszlását. Munkájuk érdeme volt az is, hogy haszonállatok (sertés, baromfi és birka) húskeverékeit is elemezve, arra a következtetésre jutottak, hogy maximum három fajkeverékből álló minta elemezhető eredményesen a mintázatok összetétele miatt.

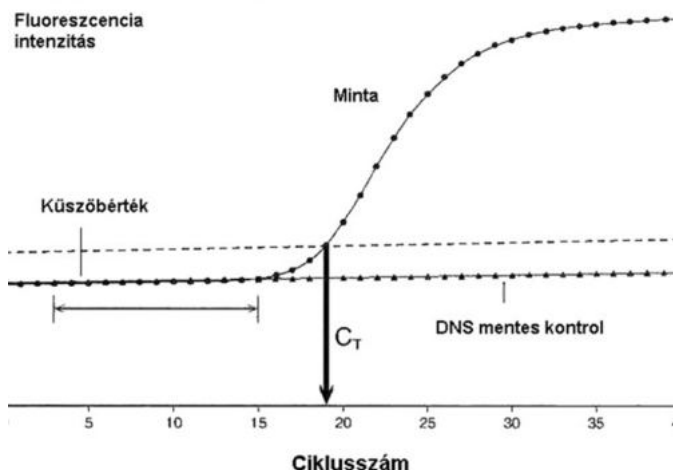
A területen számos publikáció jelent meg, haszonállatok (kérődzők, sertés), vadászható nagyvadak (szarvasfélék) és baromfi fajták elkülönítésének témakörében (Mane, 2016)

A real-time PCR eljárások kidolgozása során létrejött rendszerrel a futási időben nyomonkövethető grafikusan is a sokszorozott DNS (3. ábra). Ezzel a rendszerrel kiváltható a termék futtatás-festés folyamata, a berendezés beruházási és fenntartási költsége viszont jelentősen nagyobb lehet, mint az egyszerű PCR rendszerekben. Ennek ellenére a módszer széles körben elterjedt, különösen a GM növények mérésében, mely megköveteli a kvantitatív eredményeket, illetőleg az orvosi diagnosztikában.

Állatfaj azonosításban is jó eredményeket értek el vele, viszont a mennyiségi analízisben továbbra is sok a nyitott kérdés, így pl. sejtanyag vagy mitokondriális eredetű több kópiás géneket használunk, a DNS mennyisége hogyan konvertál a fehérje illetőleg az izomszövet, zsírszövet mennyiségéhez (Ballin és mtsai, 2009).



2. ábra: Különböző haszon- és vadállatok cytb1-cytb2 primerrel sokszorozott PCR-RFLP mintázata (AluI; HinfI. és MseI restrikciós enzimes emésztést követően) (Meyer és mtsai 1995)



3. ábra: A real-time polimeráz láncreakció során kapott grafikus görbe (Forrás: Applied Biosystem)

Real-time PCR (Q-PCR), kvantitatív analízisben történő használata során leggyakrabban relatív mennyiségeket származtatnak, melyet az ismert standardból kapott vonatkoztatási és keresett gén küszöb ciklus értékének (C_t) különbsége alapján az ismeretlen minta C_t érték különbségéből számítanak. A mérés szempontjából az ún. C_t érték a meghatározó, mely az a küszöb ciklusszám, mely esetében a jel szignifikáns eltérést mutat. Minél nagyobb egy minta C_t értéke, annál kisebb mennyiségű vizsgált összetevőt tartalmaz.

A kvantitatív analízishez azonban a minta összetételének és előállítási technológiájának megfelelő standard referencia anyag, illetve ismert kópiaszámú, fazon belül kevésbé variálódó szekvenciára, mint vonatkoztatási génszakaszokra van szükség. A módszert Sawyer és mtsai. (2003) eredményesen adaptálták marhahús mennyiségi kimutatására birkahús mellett (0,1%-100% nyershús keverékekben). Munkájuk során a viszonyítási alap egy univerzális, emlősökre specifikus primerpárral sokszorozott jel volt, ehhez hasonlították a marhaspecifikus primerekkel kapott jeleket. A módszer a felhasznált modellrendszerben megfelelően működött, de a szerzők a későbbiekben szükségesnek tartották az összetőredezett DNS-tartalmú minták elemzését, valamint szövetekben és állatfajokban mitokondriális génkópiák eltérőségének vizsgálatát.

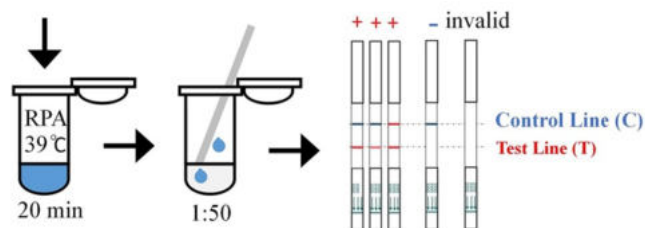
Rodriguez és mtsai. (2005) kvantitatív PCR módszert fejlesztettek ki sertéshús mennyiségi mérésére marhahús mellett, TaqMan próba alkalmazásával, mitokondriális 12S riboszóma RNS-gének alapján. A módszer regressziós paramétereit, linearitását és érzékenységét vizsgálva a 0,5-5%-os tartományban nyers, sterilizett modellek és plazmidba integrált standard sort használtak és hasonlították össze. Mindhárom kalibráció megfelelően bizonyult azonban

egymástól eltérő paraméterekkel rendelkeztek, így ez az eredmény is megerősíti azt a tényt, hogy az adott hústermék csak az adott technológiának megfelelően felépített kalibráló sor mellett kvantifikálható.

Izotermális PCR rekombinááz polimeráz enzim felhasználásával (RPA)

Egy újabb típusú, DNS alapú vizsgálati módszer az úgynevezett izotermális PCR, amely egyesíti a PCR szelektivitását és érzékenységét, a mérési eljárás jelentős egyszerűsítésével és minimális műszerhasználattal. Ez utóbbi lehetővé teszi, hogy akár terepen (szántóföld, üzemcsarnok) elvégezhető vizsgálatok legyenek fejleszthetők az alkalmazásával. Vegyszerköltsége jelenleg még jelentős, a primerek és próbák tervezése gyakorlatot igényel. A DNS-rekombinááz enzimet alkalmazva a DNS sokszorozás 37-40 °C-on, állandó hőmérsékleten történik, ez teszi lehetővé, hogy a reakció 30-40 perc alatt végbemenjen a korábbi ciklikus hőmérsékletet igénylő, hosszadalmas nagyműszeres analízis helyett. Az izotermális PCR abban is különbözik a hagyományos PCR módszertől, hogy speciális, legalább 30-35 bp hosszú primerek szükségesek hozzá. A vizsgálatokhoz ezen kívül szükség van egy 50-55 bp hosszúságú próba szekvencia használatára is, amelyet úgy kell megtervezni, hogy a próba 5' végétől 29-30 bp távolságra lévő timin bázist tetrahydrofuranra cserélünk. A sokszorozás során ugyanis a DNS-rekombinááz enzim ezen a helyen tud kötődni az egyszálú DNS-hez és innentől kezdi meg a komplementer szakasz sokszorozását. A DNS-sokszorozást követően az eredmények kiértékelése egyszerű módon tesztcsikkal vagy Sybr green festékkel tehető láthatóvá (4. ábra).

A módszert elsőként virológiai, mikrobiológiai, vizsgálatokra használták, de gyorsan elterjedt élelmiszeripari használata is a 2010-es évektől, többek között állatfaj azonosításra. A területen sikerrel alkalmazták nagyvágó állatok (sertés /Mangalica, marha, ló, birka) és baromfi húskimutatására (kacsa, csirke) (Szántó-Egész és mtsai, 2016.; Cao és mtsai, 2018.; Zhu és mtsai, 2018; Kissenkötter és mtsai, 2020).



4. ábra: Tesztcsikk kiértékeléssel végzett RPA vizsgálat menete (Lin és mtsai, 2021)

Irodalomjegyzék

- Ballin, N.Z., Vogensen, F.K., Karlsson, A.H. (2009): Species determination – Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Science*, 83:165–174. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.06.003>
- Cao, Y., Zheng, K., Jiang, J., Wu, J., Shi, F., Song, X., Jiang, Y. (2018): A novel method to detect meat adulteration by recombinase polymerase amplification and SYBR green I. *Food Chem.*, 266:73–78. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.115>
- Chen, T.Y., Chen, N.H., Lin, W.F., Hwang, K.L., Huang, Y.C., Hwang, D.F. (2010): Identification of causative fish for a food poisoning in Taiwan by using SDS-PAGE technique. *Journal of Marine Science and Technology*, 18:593–596. <https://doi.org/10.51400/2709-6998.1924>
- Cseh, B., Szerdahelyi, E., Pásztor-Huszár, K., Salamon, B., Tóth, A., Zeke, I., Jónás, G., Friedrich, L. (2016): Changes of protein profiles in pork and beef meat caused by high hydrostatic pressure treatment. *Acta Alimentaria*, 45:565–571. <https://doi.org/10.1556/066.2016.45.4.14>
- Ekici, K. (2008): The species identification of raw meat with sds-page technique. *Indian Vet. J.*, 85:1193–1195.
- Farag, M.R., Imam, T.S., Dhama, K. (2015): Identification of some domestic animal species (camel, buffalo and sheep) by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial cytochrome b gene. *Adv. Anim. Vet. Sci.*, 3(2): 136–142. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2015/3.2.136.142>
- Goodwin, P. (1992): Immunoassay methods for animal specification. 33–39. p. In Morgan M.A., Smoith C.J., Williams P.A. (eds) *Food safety and quality assurance: application of immunoassay system*. London: Elsevier Sci.Publ.
- Griffiths, N.M., Billington, M.J. (1984): Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay beef blood serum to determine indirectly the apparent beef content of beef joints and model mixtures. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 35:909–914. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740350816>
- Hajós, Gy. (1993): Elektroforézis és alkalmazása az élelmiszerfehérjék elválasztásában. *Élelmiszer-vizsgáló Közlemények*, 39:6–26.
- Khorana, H.G. (1971): Study on polynucleotides: repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*, 56:341. [https://doi.org/10.1016/0022-2718\(71\)90031-6](https://doi.org/10.1016/0022-2718(71)90031-6)
- Kissenkotter, J., Bohlken-Fascher, S., Forrest, M.S., Piepenburg, O., Czerny, C.P., Abd El Wahed, A. (2020): Recombinase polymerase amplification assays for the identification of pork and horsemeat. *Food Chem.*, 322:126759. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126759>
- Lungström, I., Engvall, E., Ruitenbergh, E.J. (1974): ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay – in serological diagnosis of *Trichinella spiralis* infection. In: *Proceedings of third international congress of parasitology*, Vol I. II. III. Vienna: Facta Publications, 1204–1205.
- Mane, B.G., Mendiratta, S.K., Tiwari, A.K. (2009): Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products. *Food Chem.*, 116(3):806–810. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.030>
- Martin, R., Azcona, J.I., Casas, C., Hernandez, P.E., Sanz, B. (1988a): Sandwich ELISA for detection of pig meat in raw beef using antisera to muscle soluble proteins. *Journal of Food Protection*, 51:790–794. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-51.10.790>
- Martin, R., Azcona, J.I., Casas, C., Hernandez, P.E., Sanz, B. (1988b): A sandwich ELISA for detection of horse meat in raw meat mixtures using antisera to muscle soluble proteins. *Meat Science*, 22:143–153. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(88\)90088-5](https://doi.org/10.1016/0309-1740(88)90088-5)
- Martin, R., Azcona, J.I., Tirmo, J., Hernandez, P.E., Sanz, B. (1988c): Detection of chicken meat in raw meat mixtures by a sandwich enzyme immunoassay. *Int. Journal of Food Science and Technology*, 23:303–310. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb00584.x>
- Martin, R., Wardale, R.J., Jones, S.J., Hernandez, P.E., Patterson, R.L.S. (1991): Monoclonal antibody sandwich ELISA for the potential detection of chicken meat in mixtures of raw beef and pork. *Meat Science*, 30:23–31. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(91\)90031-k](https://doi.org/10.1016/0309-1740(91)90031-k)
- Meyer, R., Höfelein, C., Lüthy, J., Candrian U. (1995): PCR-RFLP: A simple method for species identification in food. *Journal of AOAC*, 78(6):1542–1551. <https://doi.org/10.1093/jaoac/78.6.1542>
- Morales, P., Garcia, T., Gonzales, I., Martin, R., Sanz, B., Hernandez, P.E. (1994): Monoclonal antibody detection of porcine meat. *Journal of Food Protection*, 54:146–149. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-57.2.146>
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. 335–350 p. In: Wu, R. (ed.): *Methods in Enzymology. Recombinant DNA. Part F*. New York: Elsevier Inc., 628 p. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Rodríguez, M.A., Garcia, T., Gonzales, I., Hernandez, P.E., Martin, R. (2005): TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. *Meat Science*, 70:113–120. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.12.005>

- Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout S., Mcdowell D. (2003): Real-time PCR for quantitative meat species testing. Food Control, 14:579-583. [https://doi.org/10.1016/s0956-7135\(02\)00148-2](https://doi.org/10.1016/s0956-7135(02)00148-2)
- Sherikar, A.T., Karkare, U.D., Khot, J.B., Jayaras, B.M., Bhilegaonkar, K.N. (1993): Studies on thermostable antigens production of species-specific antiadrenal sera and comparison of immunological techniques in meat speciation. Meat Science, 33:121-136. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(93\)90099-4](https://doi.org/10.1016/0309-1740(93)90099-4)
- Szántó-Egész, R., Jánosi A., Mohr, A., Szalai, G., Koppányné Szabó, E., Micsinai, A., Sipos, R., Rátky, J., Anton, I., Zsolnai, A. (2016): Breed-specific detection of mangalica meat in food products. Food Anal. Methods., 9:889-894. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0261-0>
- Teletchea F., Maudet C., Hanni C. (2005): Food and forensic molecular identification: update and challenges. Trends in Biotechnology. 23(7):359-366. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.05.006>
- Zhu, P., Gao, W., Huang, H., Jiang, J., Chen, X., Fan, J., Yan, X. (2018): Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by real-time recombinase polymerase amplification. Food Analytical Methods. 11(8):2076-2084. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1188-z>

Overview of animal species-specific testing procedures based on protein and DNA detection

Jánosi A., Koppányné Szabó E., Némethné Szerdahelyi E.

Abstract

In the investigation of meat and meat products, the identification of animal species and the detection of foreign proteins (plant-derived and non-meat animal proteins) may be important, taking into account food safety and quality assurance considerations.

The instrumental approach to origin testing is justified by the fact that in the case of minced meat, frozen block meat and various meat products, the species can often no longer be identified organoleptically. In addition to economic reasons, the identification of meat is also important from health, religious and animal welfare points of view. A wide range of food analytical methods can be used to determine the species-specific origin of meats. Commonly used methods are based on the analysis of proteins or DNA, which we review in our article.

Keywords: *animal species identification, protein detection, DNA detection*

Lengyelne Kónya Éva, Berki Mária, Tömösköziné Farkas Rita, Abrankó László

Aminosav-vizsgálatok az élelmiszeriparban – analitikai kihívások és megoldási lehetőségek

A szerzők elérhetősége

Lengyelne Kónya Éva | tudományos munkatárs
lengyelne.konya.eva@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0002-9022-3392> | lev. szerző

Berki Mária | kutatási munkatárs
berki.maria@uni-mate.hu

Tömösköziné Farkas Rita | tudományos főmunkatárs
tomoskozine.farkas.rita@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0002-2479-0292>

Abrankó László | egyetemi tanár
abranko.laszlo@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0002-0160-7280>

A szerzők munkahelye

MATE ÉTTI Élelmiszerkémia és Analitika Tanszék
Munkahely címe: 1118 Budapest, Villányi út 29-43.



Összefoglalás

Az egészséges táplálkozás fontos része a megfelelő fehérjebevitel is, mely mára már nem csupán az elfogyasztott fehérje mennyiségét, hanem a minőségét (emészthetőség, felépítő aminosavak minősége és mennyisége, egyéb antinutritív komponensek jelenléte) is jelenti. A fehérjéket felépítő aminosavak vizsgálatára egyre nagyobb igény mutatkozik, mely a fehérje és az aminosav molekulák sokféleségéből adódóan kihívások elé állítják mind a kutatókat, hatóságokat, mind pedig a műszergyártó cégeket is. Munkánk célja összefoglalást adni a fehérje hidrolízis, mint az aminosav analízis egyik kulcslépésének követelményeiről és nehézségeiről, a felszabadított aminosavak elválasztásának és detektálásának sokrétűségéről a hagyományos és újonnan fejlesztett módszerek bemutatásával arra keresve a választ, hogy lehetséges-e egy egységes, szabványosított módszer kialakítása az aminosavak meghatározására.

Kulcsszavak: aminosav, fehérje-hidrolízis, kromatográfia, származékképzés

Aminosav vizsgálatok jelentősége

Az aminosavak kémiaileg sokszínű, és így eltérő fiziko-kémiai sajátságokkal rendelkező molekulacsalád. A legismertebb 20 fehérjeépítő aminosav mellett több tucat további természetes és egyéb szintetikus aminosavat ismerünk (Zarándi & Szolomájer, 2017). Ezek vizsgálatára irányuló módszerek az élelmiszeriparban és takarmányozásban egyaránt egyre nagyobb jelentőséggel bírnak. Legfontosabb alkalmazási területük talán az élelmi fehérjék táplálkozási

minőségének, tápértékének vizsgálatához kapcsolódik. Mára egyre szélesebb körben elfogadott az a nézet, hogy az egészséges táplálkozáshoz szükséges napi fehérjebeviteli mennyiség, illetve az ehhez tartozó referenciaértékek megítéléséhez, az elfogyasztott fehérje mennyisége önmagában nem nyújt elegendő információt. A fehérje tápértékét több tényező együttesen határozza meg. Ezek közül kiemelendő i) az aminosav összetétel, ii) a fehérje/aminosav emészthetősége és iii) a fehérje/aminosav emésztést befolyásoló, az elfogyasztott fehérjével együtt elfogyasztott ún. antinutritív összetevők minősége és

mennyisége. Az élelmi fehérjék minőségének jellemzéséhez tehát kulcsfontosságú, hogy ismerjük annak aminosav összetételét, illetve legalább bizonyos esszenciális aminosavak mennyiségét.

A fehérje, illetve abban található aminosavak emészthetőségének meghatározása során szintén szerepet kaphat az aminosav-tartalom meghatározása. A fehérjeminősítési mutatók egy csoportja a fehérjét aminosav-forrásnak tekinti, így ezen mutatók esetében a fehérjeminősítést az aminosav összetétellel hozzák összefüggésbe. A humán táplálkozástudományban a fehérjék aminosav alapú értékének meghatározására hosszú ideig a PDCAAS (Protein Digestability Corrected Amino Acid Score / Fehérje emészthetőséggel korrigált aminosavérték) mutató alkalmazása volt a standard. E mutató alapja az aminosav érték (amino acid score, AAS) meghatározásakor a minősítendő fehérje 7 esszenciális aminosav-tartalmának (hisztidin, izoleucin, lizin, leucin, treonin, triptofán, valin), illetve az összesített kéntartalmú (metionin és cisztein) és összesített aromás aminosavak (fenilalanin és tirozin) mennyiségét (mg/g) összevetjük az „ideális elvi” referenciafehérje azonos mutatóinak mennyiségével (mg/g). Ezen arányok legkisebb értékét tekintjük az aminosav értéknek. A vonatkozó WHO/FAO útmutatóban rögzített „ideális elvi” referenciafehérje aminosav összetétele – az eltérő igények alapján – korcsoportfüggő módon került megállapításra. Az így kapott AAS értéket ezt követően a teljes fehérje emészthetőségi faktorával kell korrigálni ahhoz, hogy megkapjuk a PDCAAS értéket. Ennek az átlagos emészthetőségi korrekciós faktornak az alkalmazása jelenti a PDCAAS mutató egyik legjelentősebb korlátját. Ennek oka, hogy jelentős mennyiségi eltérés mutatkozhat a teljes fehérje nyersfehérje alapon számolt emészthetőségében az egyes nélkülözhetetlen (esszenciális) aminosavak egyedi emészthetősége között.

A PDCAAS mellett, a WHO/FAO 2011-es szakmai konzultációja nyomán 2013-ban megjelent javaslat alapján a DIAAS (Digestible, indispensable amino acid score/Emészthető nélkülözhetetlen aminosavérték) mutatót helyezi előtérbe, hiszen ez élettani szempontból relevánsabb információt szolgáltathat az esszenciális aminosavak hasznosíthatóságáról (FAO/WHO, 2011). A PDCAAS és a DIAAS mutatók közötti leglényegesebb különbség, hogy míg a PDCAAS esetében az aminosav értéket (AAS) a teljes fehérje eredő emészthetőségi faktorával kell korrigálni, a DIAAS mutató esetén, az emészthetőséget aminosav-specifikusan kell meghatározni és aminosav-specifikus korrekciót kell alkalmazni. A fent említett két fehérjetápérték-mutató meghatározásához elengedhetetlen a termék, illetve DIAAS esetén annak emésztményéből származó minták

aminosavprofilozása is.

Az aminosav profil, illetve az aminosavak mennyiségének ismerete, a fehérje tápérték mutatók meghatározásán túl, további információt nyújthat az élelmiszer minőségére vonatkozóan.

Fényt deríthetünk például az élelmiszer-feldolgozás során alkalmazott magas hőmérséklet okozta – akár aminosav szintű kémiai változásokra, melyek szintén kedvezőtlen hatással lehetnek a tápértékre (Mehta & Deeth, 2016). Ezen túl, az aminosavak vizsgálatával közelebb juthatunk akár hamisításra utaló jelek feltáráshoz. Ennek legismertebb példája a hús és hústermékek kötőszövet-arány meghatározására kidolgozott rutinszerű élelmiszerminőségi vizsgálat. A fogyasztók élelmiszerekkel kapcsolatos tájékoztatásáról szóló EU-rendelet [1169/2011/EU rendelet] ugyanis előírásokat fogalmaz meg a maximálisan megengedhető kötőszövet-tartalomra (egész pontosan a kollagén/izomfehérje arányra) a „hús” kifejezéssel jelölt élelmiszer-összetevők esetében. E mutató meghatározásához a nyersfehérje tartalom ismerete mellett szükség van a kollagéntartalom vizsgálatára is. Ez utóbbit, konszenzusos módon, a hidroxiprolin-tartalom 8-szorosaként, számítással becsülhetjük.

Élelmiszerminőség és -biztonság szempontjából szintén érdekesek az aminosavak deaminálási vagy dekarboxilezési reakcióinak termékei, amelyek módosítják az aminosavprofil, illetve olyan vegyületeket hoznak létre, amelyek szerepet játszanak az élelmiszerromlási folyamatokban, illetve élettani szempontból is aktívak. Ezek közé tartoznak a biogén aminok, amelyek az aminosavak dekarboxilezésével alakulnak ki és a dezaminálás során keletkező α -ketosavak. Ezek vizsgálatára alkalmazható analitikai módszerek nagymértékben hasonlítanak az aminosavak vizsgálati módszereire (Önal, 2007).

Végül az aminosav vizsgálatok (mért aminosavak összesített mennyiségét alapul véve) hasznos információt nyújthatnak mintában lévő fehérje mennyiségének meghatározásához olyan esetekben amikor a nyersfehérje-tartalom vizsgálati módszerek csak korlátozottan alkalmazhatók (pl rovarfehérjék, gombák vizsgálata), illetve ilyen módszerekkel kapott eredmények (korrekciós faktorok) validálása során.

A fenti példákból látható, hogy az aminosavak vizsgálata széles körben alkalmazható az élelmiszeriparban, ugyanakkor meghatározásuk a ma napig számos kihívást tartalmaz. Az ezekre adott különböző válaszok és megközelítések miatt ezért nem létezik olyan domináns, vagy akár egyeduralkodó analitikai módszer, amely széles körben rutinná vált volna. E munkában az ismertebb módszerek sajátosságait, kulcsfontosságú lépéseit, a legelterjedtebb megoldási lehetőségeit, megközelítéseket tekintjük át.

Aminosav vizsgálati módszerek áttekintése

A fentiekben említett élelmiszeripari, táplálkozástudományi kérdéseken túl, számos egyéb területről érkező igény mutatkozik az aminosavak vizsgálatára. Általánosságban elmondható, hogy a több (sok) aminosav együttes szelektív meghatározására alkalmas műszeres analitikai módszerek három plusz egy kulcspontja i) a fehérje aminosavakká történő hidrolízise, ii) a keletkezett aminosavak kromatográfiás elválasztása, iii) az aminosavak kimutatása és mennyiségi meghatározására alkalmazott detektálási eljárás, valamint plusz egy faktorként, az elválasztásra és a detektálásra is hatással lévő kémiai származékképzési eljárás jelenti.

Az élelmiszervizsgálati gyakorlatban számos, a fenti megközelítésen alapuló, döntően kromatográfiás technikán alapuló aminosav vizsgálati protokoll terjedt el. Vannak általánosabb érvényű szabványos, vagy szabványszerű módszerek, és gyakran találkozunk gyártói applikációkon alapuló módszerekkel is. Ez utóbbiak legtöbbször a derivatizációs, és/vagy elválasztástechnikai kulcslépésekhez eszközt, reagenseket fejlesztők módszerei. Fontos megjegyezni, hogy a módszerek nagy része egyedi termékcsoportra és sokszor csak bizonyos aminosavakra kidolgozott és validált aminosav meghatározási vizsgálati módszertakar. Mi több, egy részük csupán a vizsgált termékekben, mintákban előforduló szabad aminosavak (illetve ezek közül néhány) meghatározására összpontosít, azaz nem ad útmutatást a hidrolízis lépésre vonatkozóan. Az **1. táblázatban** néhány ismertebb, szabványos (szabványszerű) módszert foglaltunk össze.

1. táblázat: Néhány ismertebb, szabványos (szabványszerű) aminosav vizsgálati műszeres analitikai módszer

Módszer azonosító	Alkalmazott analitikai technika
MSZ EN ISO 13903:2005 Takarmányok. Az aminosav-tartalom meghatározása	HPLC
MSZ EN 12742:2000 Gyümölcs- és zöldséglevék. A szabadaminosav-tartalom meghatározása. Folyadékromatográfiás módszer	HPLC
AOAC 80.47 Amino Acids in Vitamin Preparations	titrálás, fotometria
AOAC 975.44 Lysine (Available) in Nutritional Supplements	HPLC
AOAC 985.28 Sulfur Amino Acids in Food and Feed Ingredients	ioncserés kromatográfia
AOAC 965.31 Lemon Juice	spektroszkópia
AOAC 994.12 Amino Acids in Feeds	aminosav analízátor (ioncserés kromatográfia)
AOAC 999.13 Lysine, Methionine, and Threonine in Feed Grade Amino Acids and Premixes	Aminosav analízátor (ioncserés kromatográfia) – elválasztást követő ninhidrin vagy OPA származékképzéssel
AOAC 2012.07 Calculation of Whey Protein Fraction in Milk-Based Infant Formula	HPLC
AOAC 2018.06 Total Amino Acids in Infant Formulas and Adult Nutritionals	UHPLC-UV
AOAC 2019.09 Total Proteinogenic Amino Acids and Taurine in Infant Formula and Adult/Pediatric Formula	UHPLC

Összességében elmondható, hogy az érzékelhető igény és az ezt kiszolgálni szándékozó törekvések ellenére, jelenleg nem létezik átfogó, azaz minden élelmiszertípusra, és táplálkozási szempontból minden lényeges aminosav vizsgálatára egyaránt alkalmasnak tekinthető egységes, validált módszer, kiváltképp az első kulcslépésnek tekinthető hidrolízis tekintetében.

Fehérje hidrolízis

Az aminosavak meghatározásának első kulcslépése az élelmiszerekben lévő fehérjék hidrolízise, a peptidkötések bontásával az aminosavak felszabadítása. A hidrolízis körülményeinek megválasztása során figyelembe kell venni az egyes aminosavak stabilitását és a különböző peptidkötések ellenállását. Olyan peptidkötések, ahol valin, izoleucin vagy leucin van jelen, ott a hidrolízis nehézkes, hosszabb időt igényel, hogy a teljes aminosav mennyiséget kinyerjük. Ezzel ellentétben, a savérzékeny aminosavak, mint a szerin, treonin ilyen hidrolízis idő mellett még a mérés előtt részben roncsolódhatnak, így ott rövidebb hidrolízis időt kell választani. Következésképpen az egyes fehérjék különbözőképpen fognak reagálni – más-más arányban szabadulnak fel vagy vesznek el/sérülnek az aminosavak – a hidrolízis folyamatára attól függően, hogy milyen az eredeti aminosav szekvenciájuk, így szükséges valamilyen korrekciós faktorokat alkalmazni, rosszabb esetben ugyanazon fehérje pontos aminosav összetételének meghatározásához különböző hidrolízis folyamatoknak van alávetve a minta, majd ezekből külön történik a mennyiségi analízis. Az aminosavak vizsgálata így is időigényes és sokszor drága laboratóriumi vizsgálat, de a hidrolízis módszerek fejlesztése és a mérési idő optimalizálása lehetővé tenné a rutin alkalmazást (Darragh & Moughan, 2008).

A klasszikus, általánosan alkalmazott eljárás során a minta hidrolízise 6 M sósavval 100-165 °C-on, vákuumban, oxigénmentes közegben 24-72 h alatt történik meg. A módszer nagy hátránya a hosszú hidrolízis idő illetve bizonyos aminosavak instabilitása és érzékenysége. A kéntartalmú aminosavak (cisz(e)in, metionin) illetve triptofán meghatározása esetén a fenti módszer nem megfelelő. A cisz(e)in és metionin méréséhez egy előoxidációs lépésre van szükség az érzékeny aminosavak megvédéséhez, mely egy perhangyasavas reakciót jelent jeges körülmények között, így ciszteinsav illetve metionin-szulfon formában történik az analízis. Hasonlóképpen a triptofán is különleges eset, melyhez viszont lúgos hidrolízis alkalmazható 4,2 M NaOH segítségével. A tirozin meghatározásának elősegítésére pedig fenol (0,1%-os arányban) hozzáadása ajánlott. Egyéb hidrolízis módszerek például a proteázok alkalmazása csak

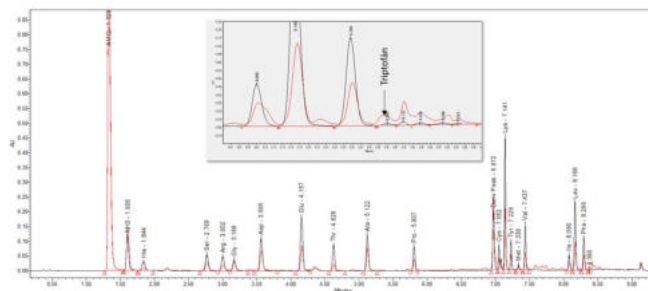
kisebb jelentőséggel bírnak (Gilani et al., 2008; Otter, 2012). Egy szabványosított, széles termékkörre alkalmazható hidrolízis módszer kifejlesztése felé irányul több kutatás is, hogy a fenti nehézségek kiküszöbölhetőek legyenek (Marino et al., 2010; Rutherford & Dunn, 2011). Elsődleges cél a léptécsökkentés, mint a minta és felhasznált vegyszer mennyiségének redukálása, másrészt a hidrolízis időbeli rövidítése, ugyanakkor az aminosavak védelmét, megfelelő feltárást is figyelembe véve.

A mikrohullámú vákuumroncsolás alkalmas lehet kisebb mintamennyiségek felhasználásával, jóval rövidebb hidrolízis idővel az aminosavak kötésből való felszabadítására. A hidrolízis idejét, hőmérsékletét illetve bemért mintamennyiséget optimalizálva teljes búzaszem fehérje hidrolízisét végezték 6M HCl jelenlétében mikrohullámú roncsolást alkalmazva. A 200 mg-os mintamennyiség 150°C-on 3 órán át tartó hidrolízise, mint optimált hidrolízis paraméterek ellensúlyozták az aminosav maradékok felszabadítását a búzamatrixból valamint limitálták a későbbi degradációt illetve transzformációt amellet, hogy 85%-os teljes aminosav visszanyerést eredményezett a teljes fehérjére vonatkoztatva (Kabaha et al., 2011).

Messia és munkatársai (2008) húсок és hústermékek hidroxiprolin vizsgálatára alkalmaztak 20 perces hidrolízis időt mikrohullámú roncsolással, ahol ebben a speciális esetben hasonló precizitást és pontosságot kaptak, mint a hagyományos módszerrel. Így a 24 órás hidrolízis időt lényegesen le tudták csökkenteni, melynek során bár csak a hidroxiprolin mennyiségét mérték, a többi aminosav esetén is hasonlóan jó pontosságot értek el nagy hatékonyságú anion cserélő kromatográfiával amperometriás detektálással, ahol a hidroxiprolin meghatározásához nincs szükség sem oszlop előtti, sem pedig oszlop utáni származékképzésre.

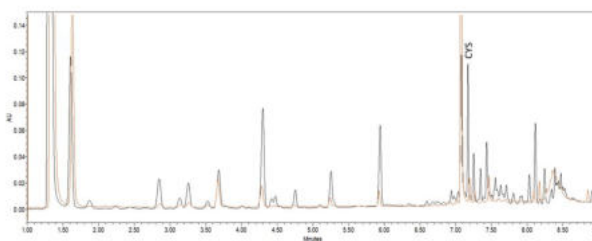
Kutatási tevékenységünk során magunk is több esetben szembesültünk a fehérje hidrolízis, valamint az egyes aminosavak meghatározásának nehézségeivel. A fehérjéket felépítő aminosavak kémiai diverzitása, eltérő stabilitása és a rendelkezésre álló mérési rendszer ajánlása alapján többféle hidrolízis módszer segítségével optimalizáltuk az aminosavak minél pontosabb meghatározásához szükséges fehérje bontási lépést. A rendelkezésre álló mikrohullámú vákuumroncsolóhoz (Milestone Ethos One) fejlesztett külön rotor alkalmassá teszi a készüléket fehérje hidrolízis kivitelezéséhez. A mikrohullámú vákuumroncsolóban történő hidrolízis lényegesen lerövidíti a feltárást idejét, kevesebb mint egy óra alatt, kis mintamennyiségek (10–50 mg) és kevesebb vegyszerhasználat (<50 ml HCl) mellett megy végbe a peptidkötések felbontása. Munkánk során figyelme véve a fentebb említett aminosavak eltérő stabilitását és a

készülégyártó ajánlását, rövidebb – csak felmelegítés, illetve hosszabb – felmelegítés után 20 perces hűtőtartás hidrolízis időt alkalmaztunk 1% fenolt tartalmazó 6M HCl oldattal végezve a hidrolízist. Tapasztalataink alapján mindkét roncsolási módszerre szükség van a megfelelő pontosságú mérésre, mert a triptofán hosszabb idő elteltével nagyrészt elroncsolódik, nem detektálható (**1. ábra**).



1. ábra: BSA minta 6M HCl, 1% fenolos közegben végzett rövid (piros) és hosszú (fekete) mikrohullámú roncsolással (részletek a szövegben) és AQC származékképzést követően felvett RP-UHPLC-DAD kromatogramja

A kéntartalmú aminosavak instabilitása miatt perhangyasavas előreakciót követően végeztük el a mikrohullámú feltárást. A perhangyasavas reakció többféle fehérje molekula esetében sem eredményezett szignifikánsan jobb kimutathatóságot (**2. ábra**), így saját tapasztalataink alapján, az AQC derivatizációt (részletesebben lásd később) alkalmazó UHPLC-DAD módszerrel történő méréseinkhez rutinszerűen, az 1% fenolt tartalmazó 6M HCl oldattal végzett a rövidebb és hosszabb hidrolízist alkalmazzuk.



2. ábra: BSA minta 6M HCl, 1% fenolos közegben, perhangyasavas előreakciót követő (bordó) illetve anélküli (fekete) hidrolízis kromatogramja

Aminosavak kromatográfiás elválasztása és detektálása

A hidrolízist követi a felbontott peptidkötésekből felszabaduló aminosavak elválasztása, azonosítása és mennyiségi meghatározása. Az aminosavak elválasztása, minőségi és mennyiségi meghatározása többféle módszer terjedt. Az elválasztás történhet kapilláris elektroforézissel, illetve vékonyréteg kromatográfiával, gázkromatográfiával, ioncserés és

fordított fázisú folyadék kromatográfiával. A legelterjedtebb technika az ioncserés és a fordított fázisú HPLC, illetve az utóbbi időben a fordított fázisú UHPLC technika is egyre inkább előtérbe kerül (Gilani et al., 2008, Kaspar et al., 2009, Rutherford & Gilani, 2009).

Az alkalmazandó módszerek sokszínűségének egyik oka, hogy az aminosavak többsége – az aromás gyűrűvel rendelkező aminosavak kivételével (fenilalanin, triptofán, hisztidin, tirozin) – gyenge kromofor és nem fluoreszkál, ezért a legtöbb széleskörben és rutinszerűen alkalmazott folyadékkromatográfiás detektorral, úgymint ultraibolya (UV), illetve a fluoreszcenciás detektálással (FLD), származékképzés nélküli detektálásuk nem megoldott. Alternatíva lehet a tömegspektrometriás meghatározás, amely esetén az aminosavak kis iontömegei és ikerionos szerkezete okoz nehézséget. (Violi et al. 2020).

Származékképzés nélkül a meghatározás kevésbé időigényes és a származékképzés lehetséges hibái (részlegesen végbement reakció, származékok stabilitása, esetleges mellékreakciók és azok termékei) sem lépnek fel.

A kémiai származékképzés fent említett sajátágai ellenére, rutinszerű kromatográfiás aminosav elemzés során, az UV és FLD detektálás robusztusságának előnyéért „cserébe” a leginkább elterjedt módszerek általában alkalmaznak valamiféle származékképzési eljárást. A származékképzést alkalmazó kromatográfiás módszerek esetében a derivatizáció kapcsán két általános megközelítés létezik. Egyik, hogy az aminosavak elválasztását natív formájukban végezzük és a származékképzést a kolonnán történő elválasztást követően, de a detektálást megelőzően hajtjuk végre. Ez a megközelítés az oszlop utáni származékképzés (post-column derivatisation). E megközelítés során a kémia reakció a derivatizálószer effluenshez történő adagolásával, áramlás közben (in-line) valósul meg. Az ún. aminosav analizátorok ezt a megközelítést alkalmazzák. Jellegzetes elválasztási módszer a kationcserés kromatográfia és az elválasztást követő ninhidrines származékképzésen alapuló spektrofotometriás detektálás (Berisha et al., 2021). Az oszlop utáni származékképzési megközelítés előnye, hogy oszlopkromatográfiás módszereknél jól automatizálható megoldást jelent, ugyanakkor a detektorba kerülő, feleslegben lévő derivatizálószer ronthatja a detektálás minőségét.

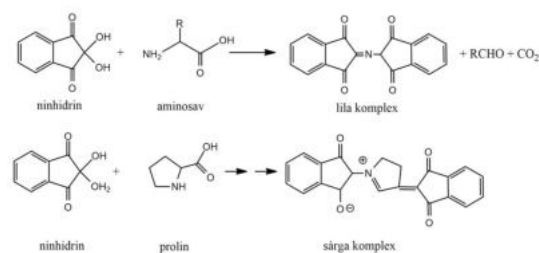
Másik megközelítés lényege, hogy a származékképzés a kromatográfiás elválasztást megelőzően történik meg. Ez az oszlop előtti származékképzés (pre-column derivatisation). Ebben az esetben a kromatográfiás elválasztás „alanya” immáron nem a natív aminosavak, hanem az azokból képzett származékok. Ebben az esetben, a

legalkalmasabb kromatográfiás módszer kiválasztásánál, illetve optimalizálásánál figyelembe kell venni az alkalmazott derivatizálószer és a kialakuló származék kromatográfiás sajátágait. Az oszlop előtti származékképzést alkalmazó módszerek esetén leginkább a fordított fázisú, C18 oldalláncokkal fedett kolonnákkal végrehajtott HPLC és UHPLC elválasztás alkalmazása terjedt el. (Aristoy & Toldrá, 2016).

Származékképzés

A származékképzésnél elvárás, hogy (i) a reakció legyen gyors és kvantitatív, (ii) lehetőség szerint vizes közegben menjen végbe, (iii) a reagens a primer-, és a szekunder aminocsoportokkal is reagáljon, (iv) a keletkezett származékok stabilak legyenek (Illisz et al. 2008). Általánosságban elmondható, hogy az oszlop előtti, és oszlop utáni származékképzési módszerek közül az oszlop előtti származékolás az elterjedtebb. Az oszlop utáni származékképzésnek megvannak a maga előnyei, mint (i) a mellékreakciók nem fontosak, (ii) nem elvárás, hogy a folyamat teljesen végbe menjen, mivel a származékképzés mértéke reprodukálható, (iii) nincs szükség stabil származéokra. Az oszlop utáni származékképzés hátrányai között érdemes megemlíteni a reakció paramétereinek körülményesebb, korlátozottabb kontrollálását, a reagens-bevezető rendszer miatti többletköltséget, a minta hosszabb áramlási útját és ebből eredő csúcshévesedési jelenségeket, valamint a reagens lehetséges interferenciáját a detektálás során. Az oszlop előtti származékképzés esetén is felmerülhet a melléktermékek vagy a nem reagált, visszamaradt reagens által okozott interferencia, de a rendszerbe jutott mennyiség ebben az esetben lényegesen kisebb.

Az 1950-es években elsők között kifejlesztett aminosav meghatározásra alkalmas eljárás ioncserés kromatográfiára épült oszlop utáni ninhidrines származékképzéssel (Moore & Stein, 1948). Az aminosavak ninhidrinnel való reakciójának terméke egy olyan komplex, mely erős lila színével teszi lehetővé a meghatározást 570 nm hullámhosszon. A színreakció sárga komplexet eredményez prolin illetve hidroxiprolin esetén, mely 440 nm-en detektálható (**3. ábra**).

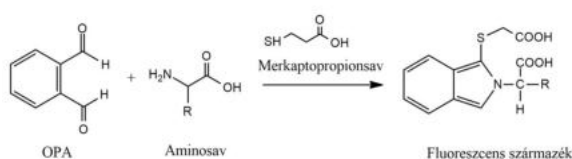


3. ábra: Aminosavak reakciója ninhidrinnel

A ninhidrin mellett máig a legjellemzőbb származékképzők még az orto-ftálaldehid (OPA), a fenil-izotiocianát (PITC), a 9-fluorenilmetil-kloroformát (FMOC), és a 6-aminokinolin-N-hidroxi-szukcinimidil-karbamát (AQC).

OPA

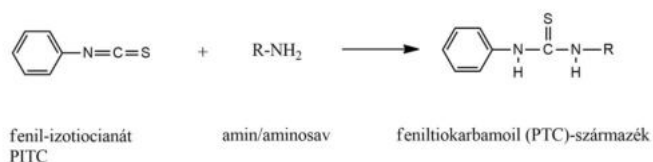
Az orto-ftálaldehid mind oszlop előtti, mind pedig oszlop utáni derivatizálószerként is alkalmazható és széles körben elterjedt. A keletkezett származék fluoreszcensen jól detektálható, míg maga az OPA nem ad jelet (**4. ábra**). A ninhidrinnel ellentétben az OPA nem reagál a prolinnal vagy csak egyéb reagens jelenléte mellett, akkor is csak kis mértékben.



4. ábra: Aminosavak reakciója orto-ftálaldehiddel

PITC

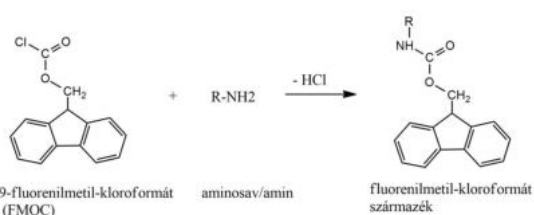
Fenil-izotiocianát (PITC) az N-terminális aminosavakkal reagál jól – ideértve a prolint is – feniltio-karbamoil(PTC)-aminosavat képezve, melynek abszorbancia maximuma 254 nm-en van (**5. ábra**).



5. ábra: Aminosavak reakciója fenil-izotiocianáttal

FMOC

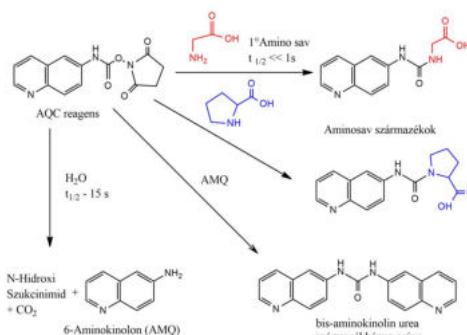
A 9-fluorenilmetil-kloroformát az elsődleges és a másodlagos aminosavakkal is reagál. A gyorsan lejátszódó reakció eredményeként stabil, fluoreszcens származék képződik (**6. ábra**). Az FMOC reakció hátránya, hogy a reagens vizes közegben hidrolizálódhat illetve dekarboxileződhet fluoreszcens alkoholt képezve, mely együtt eluálódik az aminosavakból képzett származékokkal (Bank et al, 1996).



6. ábra: Aminosavak reakciója 9-fluorenilmetil-kloroformáttal

AQC

Az aminosavak 6-aminokinolin-N-hidroxi-szukcinimidil-karbamáttal (AQC) történő gyors reakciója szintén egy erősen fluoreszcens származéket eredményez elsődleges és másodlagos aminosavak esetén is. Derivatizációt követően egy 55°C-on történő hőtartás szükséges, hogy egyrészt a tirozin kis mellékterméke monoszármazékká alakuljon, másrészt a maradék AQC reagenst 6-aminokilononná, n-hidroxi-szukcinimiddé és szén-dioxiddá hidrolizálja. Az aminosavak AQC-származékai stabilak, UV-aktívak és a maradék AQC valamint a keletkező melléktermékek nem okoznak gondot az aminosavak detektálásánál (**7. ábra**).



7. ábra: Aminosavak reakciója 6-aminokinolin-N-hidroxi-szukcinimidil-karbamáttal

Összefoglalásként elmondható, hogy az aminosavak vizsgálatára számos analitikai megközelítés egyszerre van jelen a gyakorlatban, vagyis nem beszélhetünk egyeduralgódó szabványosított, egységes aminosav analízis módszerről. Az elmúlt 50-70 évben kidolgozott, rutinszerű analitikai eljárások, derivatizációs technikák továbbra is jól alkalmazhatók, ugyanakkor a fejlesztések célja robusztusabb, gyorsabb és szélesebb körben alkalmazható származékképzési módszerek létrehozása. A mintaelőkészítési eljárások tekintetében az idő- és vegyszerszükséglet csökkentése, valamint az automatizálás jelenti a fő fejlesztési célokat. E területen a mikrohullámú roncsolási technika és a stabil származékképzésen alapuló UHPLC módszer ötvözése egy jól működő koncepciót jelenthet a különböző fehérjetartalmú minták vizsgálatokor és jelentősen egyszerűsítheti, lerövidítheti a hagyományos minta-előkészítési eljárásokat, a megfelelő reprodukálhatóság elérése mellett.

Irodalomjegyzék

- Aristoy, M.C., Toldrá, F. (2016): Amino Acids: Determination. In Encyclopedia of Food and Health (Eds.: Caballero, B., Finglas, P.M., Toldrá, F.) Academic Press, 2016, 141-148.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384947-2.00027-1>
 Bank, R.A., Jansen, E.J., Beekman, B., te Koppele, J.M. (1996): Amino acid analysis by reversephase high-

- performance liquid chromatography: Improved derivatization and detection conditions with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Analytical Biochemistry*, 240(2):167-176.
<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0346>
- Berisha, K., Bytyçi H., Mednyánszky, Zs., Kiss, E., Simon-Sarkadi, L. (2021): Amino acid and biogenic amine composition of busha cattle milk. *Acta Alimentaria*, 50(1):144-152. <https://doi.org/10.1556/066.2020.00226>
- Darragh, A.J., Moughan, P.J (2008): The effect of hydrolysis time on amino acid analysis. *Journal of AOAC International*, 88(3):888-893.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/88.3.888>
- FAO/WHO (2011): Dietary protein quality evaluation in human nutrition. *FAO food and nutrition paper* 92.
- Gilani, G.S., Xiao, C., Lee, N. (2008): Need for accurate and standardized determination of amino acids and bioactive peptides for evaluating protein quality and potential health effects of foods and dietary supplements. *Journal of AOAC International*, 91(4):894-900. <https://doi.org/10.1093/jaoac/91.4.894>
- Ilisz, I., Berkecz, R., Péter, A. (2008): Application of chiral derivatizing agents in the high performance liquid chromatographic separation of amino acid enantiomers: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(1):1-15.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.12.013>
- Kabaha, K., Taralp, A., Cakmak, I., Ozturk, L. (2011): Accelerated hydrolysis method to estimate the amino acid content of wheat (*Triticum durum* Desf.) flour using microwave irradiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7):2958-2965.
<https://doi.org/10.1021/jf103678c>
- Kaspar, H., Dettmer, K., Gronwald, W., Oefner, P.J. (2009): Advances in amino acid analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(2):445-452.
<https://doi.org/10.1007/s00216-008-2421-1>
- Marino, R., Iammarino, M., Santillo, A., Muscarella, M., Caroprese M., Albenzio M. (2010): Technical note: Rapid method for determination of amino acids in milk. *Journal of Dairy Science*, 93(6):2367-2370.
<https://doi.org/10.3168/jds.2009-3017>
- Mehta, B.M., Deeth, H.C. (2016): Blocked Lysine in Dairy Products: Formation, Occurrence, Analysis, and Nutritional Implications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15:06-218.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12178>
- Messia, M.C., Di Falco, T., Panfili, G., Marconi, E. (2008): Rapid determination of collagen in meat-based foods by microwave hydrolysis of proteins and HPAEC-PAD analysis of 4-hydroxyproline. *Meat Science*, 80(2):401-409.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.01.003>
- Moore, S., Stein, W.H. (1948): Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 176(1):367-388. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)51034-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)51034-6)
- Otter, D.E. (2012): Standardised methods for amino acid analysis of food. *British Journal of Nutrition*, 108:S230-S237. <https://doi.org/10.1017/s0007114512002486>
- Önal, A. (2007): A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103(4):1475-1486.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.028>
- Rutherford, S.M., Dunn, B.M. (2011): Quantitative amino acid analysis. *Current Protocols in Protein Science*, 63(1):3.2.1-3.2.6.
<https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0302s63>
- Rutherford, S.M., Gilani, G.S. (2009): Amino acid analysis. *Current Protocols in Protein Science*, Suppl. 58, Unit 11.9. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1109s58>
- Violi, J.P., Bishop, D.P., Padula, M.P., Steele, J.R., Rodgers, K.J. (2020): Considerations for amino acid analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A tutorial review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 131:116018. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116018>
- Zarándi M., Szolomájer, J. (2017): Amino acids: chemistry, diversity and physical properties, *Amino Acids, Peptides and Proteins*, 42:1-84.
<https://doi.org/10.1039/9781788010627-00001>

Amino acid analysis in food industry – analytical challenges and optional solutions

Lengyelne Kónya É., Berki M., Tömösköziné Farkas R., Abrankó L.

Abstract

Protein consumption is important and essential part of the balanced diet, and nowadays it means not only the amount of protein is itself, but the quality of the protein consumed (digestibility, quality and quantity of the amino acids, other possible antinutritive compounds). There is an even higher demand on determination of amino acid composition of the protein as assessing the protein quality. Proteins, peptides and amino acids are a chemically diverse set of molecules, so the accurate analysis is difficult and challenging for researches, authorities and instrument producers as well. Our aim is to give summary on protein hydrolysis methods' requirements and limitations as a first step of amino acid analysis, and collect the difficulties of separation and detection of amino acids through classical and new methods searching for answer on the question of the possibility of a standardized, validated amino acid analysis method.

Keywords: amino acid, protein hydrolysis, chromatography, derivatisation

Kaszab Tímea, Boda Boglárka, Pomázi Andrea, Mohácsiné Farkas Csilla

Különböző probiotikus aktivitású *Lactobacillus bulgaricus* törzsek növekedésének nyomon követése fiziko-kémiai tulajdonságok segítségével

Szerzők elérhetősége

Név: Kaszab Tímea¹ | egyetemi adjunktus | levelező szerző
Szerző elérhetősége: kaszab.timea@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0003-4995-8845>

Név: Boda Boglárka² | hallgató
Szerző elérhetősége: bodabogi5@gmail.com

Név: Pomázi Andrea² | egyetemi docens
Szerző elérhetősége: pomazi.andrea@uni-mate.hu

Név: Mohácsiné Farkas Csilla² | egyetemi tanár
Szerző elérhetősége: mohacsine.farkas.csilla@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0001-7950-4460>

A szerzők munkahelye

¹MATE ÉTTI Élelmiszeripari Méréstechnika és Automatizálás Tanszék
Munkahely címe: 1118 Budapest, Ménesi út 43-45.

²MATE ÉTTI Élelmiszer-mikrobiológia,-higiénia és -biztonság Tanszék
Munkahely címe: 1118 Budapest, Ménesi út 43-45.



Összefoglalás

A probiotikumok védelmi funkciókat töltenek be a szervezetben. Elsődleges feladatuk a káros anyagokkal szembeni védelem. Az egyik legjelentősebb probiotikumot termelő mikroorganizmus a tejsavbaktérium. A fermentált élelmiszerek íz anyagban gazdagabbak, eltarthatóbbak és biztonságosabbak is. A joghurtok olyan erjesztett tejtermékek, amelyek *Streptococcus thermophilus*-t és *Lactobacillus bulgaricus*-t is tartalmaznak. Rendszeres fogyasztásuk az immunrendszer számára előnyös. Kutatásunkban 15 különböző probiotikus aktivitású *Lactobacillus bulgaricus* törzs szaporodását követtük nyomon fiziko-kémiai tulajdonságok alapján. A kísérletet megelőzően kalibrációs tesztet végeztünk a három csoportból kiválasztott egy-egy mintával. A kísérlet során sovány tejporból készült tejkészítményben aktivált törzsekből beoltott, frissen készített tejkészítményeket 11 órán át 37 °C-on tartva meghatároztuk a pH-t, a sejtszámot és a minták viszkozitását. Az eredmények kiértékelésekor a pH görbék inflexiós pontját, a 4 és 11 óránál meghatározott pH, sejtszám és viszkozitás értékeket, valamint az pH görbe inflexiós pont elérésének időpontjában mért értékeket vizsgáltam.

A vizsgált 15 minta 4 és 11 óránál, valamint az inflexiós pontban vett pH értékeinél nem találtunk szignifikáns különbséget az eltérő probiotikus aktivitást mutató csoportok között, átlaguk és szórásuk megközelítőleg azonos volt. A szaporodást vizsgálva a probiotikus minták átlagos telepszáma volt a legmagasabb, de szignifikánsan nem különbözött el a másik két csoporttól. A probiotikus törzsek viszkozitása 4 és 11 óránál átlagban harmada a másik két csoport értékeinek, emellett szignifikánsan elkülönül tőlük. A pH görbe inflexiós pontjának időpontjában meghatározott viszkozitás-értékeket nézve a nem probiotikus törzseké volt a legmagasabb, a legkisebb a probiotikus törzseké, emellett utóbbiak szignifikánsan elkülönültek a többitől. Összességében elmondható, hogy a viszkozitás, mint fizikai paraméter alkalmas lehet a különböző probiotikus aktivitást mutató törzsek elkülönítésére.

Kulcsszavak: probiotikum, *Lactobacillus bulgaricus*, fiziko-kémiai tulajdonságok, növekedés

Bevezetés

A probiotikumok olyan mikroorganizmusok, amelyek védelmi funkciókat töltenek be a szervezetben, főleg a bélben. Olyan mikrobiótát alkotnak, amelyekben emésztést segítő enzimek találhatóak. Elsődleges feladatuk különböző káros anyagokkal szembeni védelem. A probiotikus baktériumoknál kimutatták, hogy hatásuk van a túlérzékenységi reakciókra úgy, hogy stimulálják az immunrendszer ingerküszöbét. Kutatásokban arra a következtetésre jutottak, hogy egyes betegségek pl. ételallergia, bélgyulladás kezelhetők probiotikumok alkalmazásával (Isolauri et al., 2001).

A tejsavbaktériumok gram-pozitív, spórákat nem képző baktériumok, amelyek pálcák vagy kokkusok formájában jelenhetnek meg. Ezek a mikroorganizmusok aerob toleráns anaerobok, működésükhöz nem szükséges oxigén, de jelenlétében is aktívak maradnak. A szénhidrátokat, elsősorban a glükózt és a laktózt tejsavvá bontják. Ennek jelentős szerepe van, ugyanis a keletkezett tejsav a környezete pH-ját a savas tartományba tolja el, ezzel meggátolva a kórokozók jelenlétét (Cubas-Cano et al., 2017). A tejsavasan erjesztett élelmiszerek alapanyaga különböző élelmiszer csoportból származhat, mint pl. tej, hús és zöldségek. Fermentáció során ezekből az alapanyagokból egyedi készítmények készíthetők el, amelyek íz anyagban gazdagabbak, eltarthatóbbak és biztonságosabbak is. (Eş, et al., 2017)

A joghurtok olyan erjesztett tejtermékek, amelyek *Streptococcus thermophilus*-t és *Lactobacillus bulgaricus*-t is tartalmaznak. Pu et al. (2017) vizsgálatukban Nyugat-Kína területéről választottak ki 45 évnél idősebb nőket és férfiakat. A kísérletben résztvevőket két csoportba osztották, az egyiknek probiotikumot tartalmazó joghurtokat adtak, míg a másik volt a kontroll csoport, akik nem kapták ezt a terméket. Közben vérvizsgálattal követték nyomon a folyamatot. A végeredmény igazolta a probiotikumok kedvező tulajdonságát. Az emberek, akik fogyasztották a joghurtot, mérhetően jobb immunszintet értek el.

Másik fontos paraméter a kémhatás volt. Számos kísérletet végeztek Minto et al. (2014), hogy miként befolyásolja a reakciók végbemenetelét a pH változása. A puffer képességek befolyásolják a kémhatást, azonban a kiválasztott tenyészet nincs rá nagy hatással.

Eredményeik alapján a joghurt tárolása során mért adatokból láthatóvá vált a pH szignifikáns csökkenése. A tejsavbaktériumok a tejben lévő szénhidrátokat pl. glükózt, laktózt tejsavvá alakítja, ezért idő elteltével pH-ja csökkeni fog. Ez megakadályozza más esetleg káros fajok elszaporodását. A jó minőségű joghurtban 1:1 az

aránya a kokkusoknak és a pálcáknak.

Különböző hatások és paraméterek befolyásolják az anyagok szerkezeti jellemzőit. Figura (2007) könyvében a reológiát vizsgálta, azaz az anyagokat és azok változásait valamilyen erő hatására. Az áramlás egy folyamatos deformáció, ami az idő múlásával jellemezhető. Ebből arra lehet következtetni, hogy minden anyag folyékonyra tehető. Az állandó nyírófeszültség hatására áramlások keletkeznek. Ez a jelenség egy viszkozus viselkedés. A viszkozitás más néven belső súrlódás egy folyadék vagy gáz belső ellenállásának mértéke. Számos tanulmány foglalkozik a probiotikus joghurtok viszkozitásával, azonban azok zömmel kész joghurtok tárolás alatti viselkedését vizsgálják (Costa et al., 2015; Mousavi et al., 2019).

Jelen kísérletünk célja egyrészt a különböző probiotikus aktivitást mutató törzsek növekedésének nyomon követése volt a sejtszám és pH mérése alapján. Célunk volt továbbá megvizsgálni, hogy a viszkozitással, mint fizikai paraméterrel megkülönböztethetők-e egymástól az eltérő probiotikusságú törzsek az alvadás folyamán.

Anyagok és módszerek

A kísérlet során 15 *Lactobacillus bulgaricus* baktériumtörzset vizsgáltunk, melyek a probiotikus aktivitásuk alapján 3 csoportba sorolhatók: probiotikus, mérsékleten probiotikus és nem probiotikus.

A kísérletet megelőző kalibrációs mérés során, a három csoportból kiválasztott, 1-1 törzssel kalibrációs mérést végeztünk, amelyhez az **1. táblázatban**, a csillaggal jelölt mintákat használtuk fel. A vizsgálathoz mikrobiológiailag tiszta, sovány tejporból 3,5%-os fehérjetartalmú kikevert tejet készítettünk sterilizált desztillált víz hozzáadásával. 10 mg fagyasztva szárított baktériumot kevert tejjel 10 ml-re felöntve, törzssuszpenziót készítettünk. A baktériumok felélesztése érdekében a törzssuszpenziót 37 °C-on 24 órán át inkubáltuk, majd Breed-festéssel meghatározott kezdeti sejtszám alapján az elkészített tejet oltottuk be ezzel az aktivált baktérium-suszpenzióval, hogy a kezdeti sejtszám $10^6/100$ ml tej legyen.

1. táblázat: A kísérlet során felhasznált *Lactobacillus bulgaricus* baktériumtörzsek

<i>Lactobacillus bulgaricus</i> baktériumtörzsek		
Probiotikus	Mérsékleten probiotikus	nem probiotikus
R1, S6, S10*, S11, S22	S1, S7, S8, S9, Y12, S28*	S2, S3*, S4, S29, S30

A kalibráció során a beoltást követően a sejtszámot 11 órán át minden órában meghatároztuk a 37 °C-on inkubált szuszpenzióból, három párhuzamos méréssel, MRS agarral rétegzett lemezöntési módszerrel. A lemezöntéshez tízszeres hígításokat készítettünk hat lépésben peptonos hígítófolyadék segítségével, és a lemezeket inkubátorba helyeztük 72 órára 37 °C-on. A 15 mintából álló kísérlethez is a törzs-suszpenziókkal oltottuk be a tejporból készített tejet a különböző vizsgálatokhoz. A beoltott tej-suszpenzió sejtszámát három kiválasztott időpontban, 0., 4. és 11. órában határoztuk meg három párhuzamos méréssel MRS agarral rétegzett lemezöntési módszerrel. Ezt követően a Petri-csészéket 37 °C-on 72 órát inkubáltuk. A kalibráció és a kísérlet során a telepeket leszámoltuk, és korrigáltuk az eredeti joghurt-suszpenzió hígításával. A könnyebb összehasonlítás érdekében relatív telepszámot határoztunk meg 4. és 11. óránál:

$$\text{relatív telepszám} = \frac{\text{átlagos telepszám 1 ml szuszpenzióban 4 v. 11 óránál}}{\text{átlagos kezdeti telepszám 1 ml szuszpenzióban}}$$

A baktériumok aktiválása után és a fent említett három időpontban (0., 4. és 11. óra) Breed-festéssel, fénymikroszkóppal 100x nagyítás mellett, immerziós olaj segítségével is végeztünk sejtszám meghatározást.

A joghurt-suszpenzió beoltását követően rögzítettük a pH változását 20 órán át 37 °C-on. Egy Mettler Toledo Seven Multi pH mérő (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) segítségével a 4 percenként felvett értékekből mintánként 300 adatot gyűjtöttünk. Meghatároztuk a pH görbék inflexiós pontját Torrestiana és mtsai (1994) cikke alapján az alábbi összefüggés segítségével:

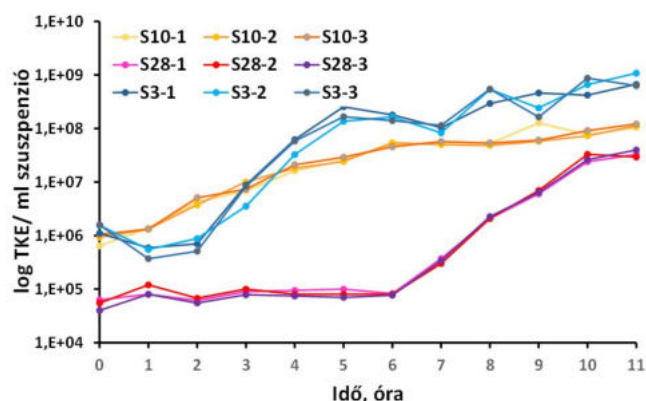
$$pH = (A - D) \left(1 + \left(\frac{t}{C} \right)^B \right) + D$$

A pH görbe inflexiós pontjának pH és idő értékét is vizsgáltuk. A pH méréssel párhuzamosan Haake

RotoViscol (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) rotációs viszkoziméter segítségével mértük a joghurt-suszpenzió viszkozitását Din10 Ti mérőfejjel, 2 1/s nyírási sebesség mellett 37 °C-on 11 órán át. A mért viszkozitás értékek közül a 4. órában, 11. órában, a pH görbe inflexiós pontjában mért értékeket, valamint a maximális viszkozitás értéket használtuk fel. Az adatok kiértékelését SPSS 25.0 szoftverrel, Microsoft Excel 2013 program segítségével, valamint MS Excel Solver bővítménye felhasználásával végeztük.

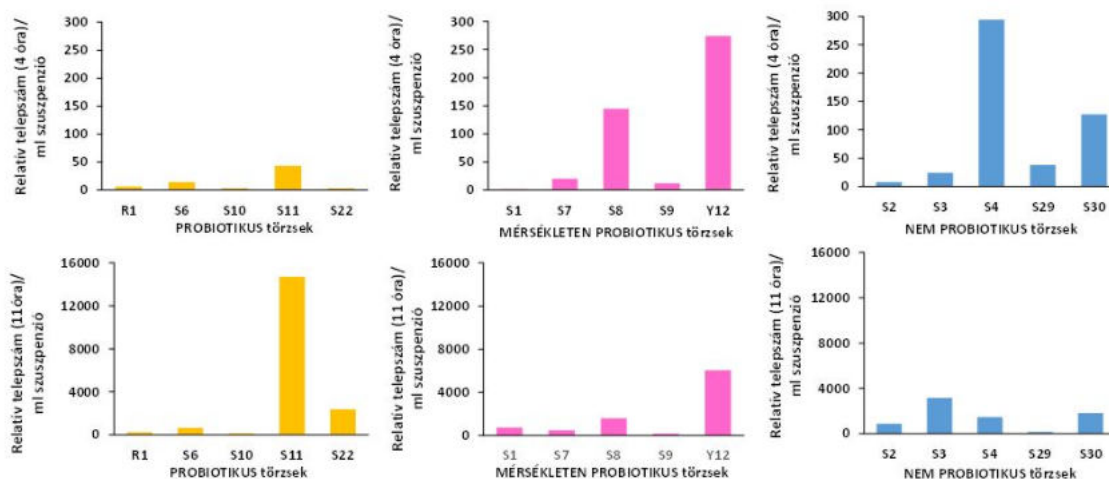
Eredmények és értékelésük

A kalibrációs minták eredményei alapján megállapítottuk (1. ábra), hogy a nem probiotikus minta szaporodott el a legnagyobb mértékben, elérve a 1*10⁹ sejt/ml nagyságrendet. Ezzel szemben a mérsékelt probiotikus és nem probiotikus minták csupán 5*10⁷ - 9*10⁷ sejt/ml nagyságrendig szaporodtak el.



1. ábra: A kalibrációs baktérium-minták telepszámjai

A 15 mintával végzett kísérlet eredményeiből a 4. és 11. órában meghatározott relatív telepszámokat a

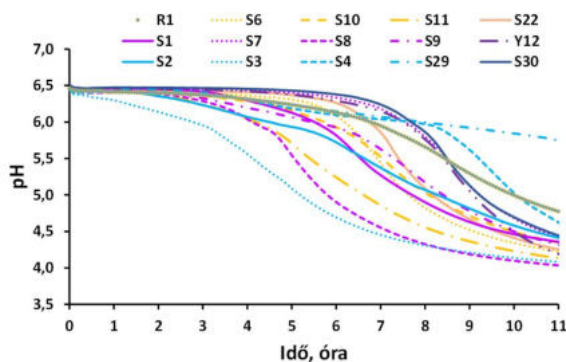


2. ábra: A mikrobátörzsek relatív telepszáma 4 és 11 óránál

2. ábra szemlélteti. Látható, hogy négy óránál a probiotikus törzsek telepszámai nőttek a legcsekélyebben, de a kezdeti telepszámhoz képest jelentős eltérések vannak. Az S11-nél kiugróan magas az érték a többihez képest, ez fejlődött a legjobban. Legkevésbé az S10 és az S22. A mérsékleten probiotikus csoportnál elmondható, hogy az Y12 folyamatosan gyarapodott telepekben egészen a kísérlet végéig. Közepes értékekkel fejlődött az S8. Az S9 a kezdeti sejtszámhoz képest. Ugyanezek elmondhatóak az S1-re is, de a kiértékelés végére jelentősebb telepszám növekedést lehetett tapasztalni. Elmondható, hogy az Y12 az eredeti állapotához képest változott a legtöbbet. A nem probiotikus törzsek telepképzései az eredeti állapothoz mérten heterogénebbek. Az S4-nél a kezdeti állapot volt a legkedvezőbb, míg az S3-nál és az S2-nél kellett egy kis idő elteljen mire a telepképződés jelentősebb lett volna. Ezzel szemben, az S30 lassabban, de egyenletesebben képezte a telepeket. Összességében elmondható, hogy a nem probiotikus csoport mintáinak szaporodása volt a legintenzívebb, míg a leglassabb ütemben a mérsékleten probiotikus törzsek telepszáma nőtt. Emellett mindhárom csoportban nagy a minták közötti szórás, és mindhárom csoportban egy-egy minta kiugró gyorsasággal szaporodik.

A 4 és 11 óránál meghatározott sejtszámok eredményei alapján a lemezöntéssel végzett telepszámlálás megbízhatóbbnak bizonyult a Breed-festéshez képest. A három párhuzamos lemezöntés telepszáma alapján a probiotikus minták átlagos telepszáma volt a legmagasabb, de szignifikánsan nem különbözött el a másik két csoporttól, de mindhárom csoport elérte átlagosan a 10^8 ml-enkénti telepszámot.

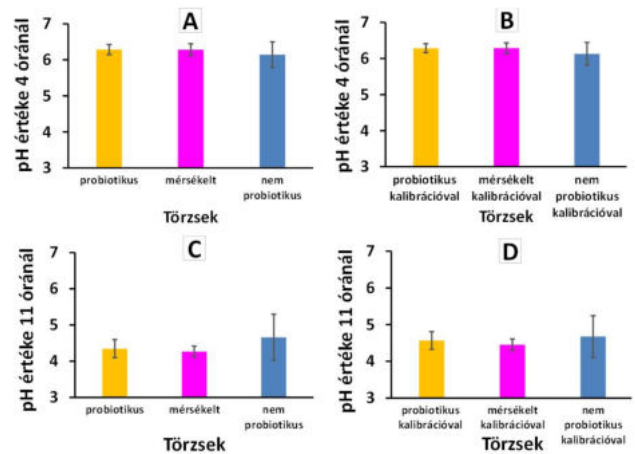
A szuszpenziók pH értékeit összehasonlítottuk, és a **3. ábrán** ennek eredménye látható, de csak a sejt- és telepszámlálással azonos időtartamig, 11 óráig. 11 óra végére a legjobban az S8 savanyított, szinte megegyezett az S3 értékével. Utána egyértelműen az S11 következett egy kissé nagyobb pH értékkel. Nagyon érdekesen alakult az Y12 is. A kezdeti órákban alig indult el a savanyítás, majd a 7. órát követően erőteljes pH



3. ábra: A vizsgált 15 mikrotörzs pH görbéi 11 óra alatt (sárga – probiotikus, lila – mérsékleten probiotikus, kék – nem probiotikus)

csökkenés történt. Elmondható, hogy a mérés felénél kisebb lett az Y12 a pH értéke, mint az S11, ami előbb érte el a kíván savanyítási tendenciákat.

A következő diagramokon (**4. ábra**) a 4 és 11 órás csoportátlagok láthatóak a csoporton belüli szórással 4 és a 11 órás pH értékekre nézve. Nem látható szignifikáns különbség a csoportok között egyik esetben sem, de némileg csökkentette a szórást a kalibrációs minták pH értéke mindhárom csoportnál.

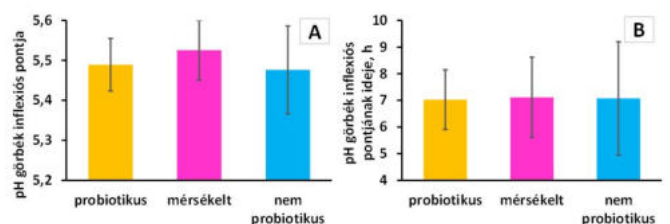


4. ábra: A különböző probiotikus képességű csoportátlagok 4 órás pH értéke (A), kalibrációval (B), 11 órás pH értéke (C), kalibrációval (D)

A 11 órás pH értékek esetében (**4/C-D. ábra**) a kalibrációs minták megnövelték a pH értékeket, de a szórást ezzel szemben javították. Emellett elmondható, hogy a nem probiotikus csoport mutatta a legnagyobb szórást 4 és 11 óránál függetlenül a kalibrációs mintáktól. Szignifikáns különbségről itt sem beszélhetünk, amit az SPSS is megerősített.

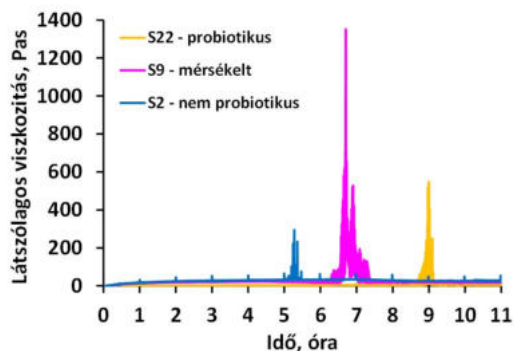
A pH görbék inflexiós pontjában meghatározott pH érték és az inflexiós ponthoz tartozó idők összehasonlításakor megállapítottuk, hogy a kalibrációs minták érdemben nem változtattak az eredményeken, így az **5. ábrán** a kalibrációs minták nélküli eredmények láthatóak.

A 15 mintával végzett kísérlet eredményeiből a 4 és 11 óránál, az inflexiós pontban mért pH értékeket, valamint az inflexiós ponthoz tartozó időket összevetve nem találtunk szignifikáns különbséget az eltérő probiotikus aktivitást mutató csoportok között, átlaguk és szórásuk megközelítőleg azonos volt.



5. ábra: A pH görbék inflexiós pontjában a pH értékek (A) és a hozzá tartozó idők (B)

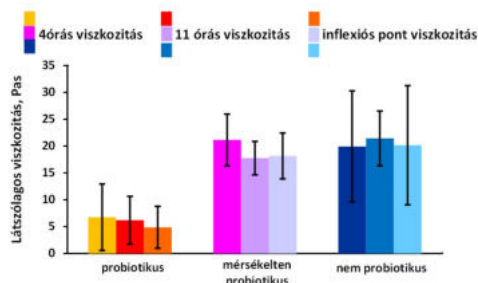
A látszólagos viszkozitás mérésekor a kísérlet 15 mintájánál tapasztalható volt egy csúcs a látszólagos viszkozitás értékekben, ám ezeknek nagysága, valamint időbeli megjelenése eltérő volt. A **6. ábra** a különböző probiotikusságú csoportokból a leglátványosabbakat szemlélteti. Látható, hogy a mérsékleten probiotikus minta maximális viszkozitás értéke a legnagyobb.



6. ábra: Különböző probiotikusságú minták viszkozitásának alakulása az idő múlásával

A kalibrációs mérések telepszámainak alakulása alapján kiválasztott időpontokban meghatározott viszkozitás értékek alapján megállapítottuk, hogy a probiotikus törzsek viszkozitása 4 és 11 óránál átlagban harmada a másik két csoport értékeinek. Továbbá szignifikánsan elkülönül a probiotikus csoport a mérsékleten probiotikus és nem probiotikus csoportoktól. A mérsékleten probiotikus és nem probiotikus törzsek átlagos viszkozitása nem mutat szignifikáns különbséget egyik kiválasztott pillanatban sem.

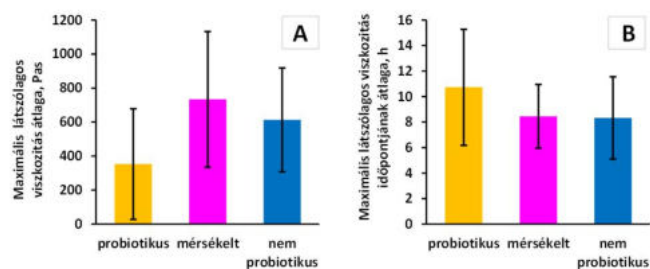
A pH görbe inflexiós pontjának időpontjában meghatározott viszkozitás-értékeket megvizsgálva elmondható, hogy a nem probiotikus törzseké volt a legmagasabb, a legkisebb a probiotikus törzseké, emellett utóbbiak szignifikánsan elkülönültek a többitől (**7. ábra**).



7. ábra: Látszólagos viszkozitás értékek 4. és 11. órában, valamint a pH mérés inflexiós pontjában

A látszólagos viszkozitás maximális értéke esetében (**8. ábra**) a csoportátlagokat összehasonlítva (**8.A ábra**) nem látható szignifikáns különbség, és a csoportokon belüli szórás is magasnak bizonyult. A maximális viszkozitás megjelenésének időpontjait vizsgálva (**8.B ábra**) szintén nincs szignifikáns

különbség, azonban látható, hogy a csoportátlagok szerint leghamarabb a nem probiotikus mintáknál, míg legkésőbb a probiotikus mintáknál jelentkezik a viszkozitás csúcs.



8. ábra: A baktériumtörzsek maximális viszkozitás értékeinek csoportátlaga (A) és megjelenési ideje (B)

Következtetések, javaslatok

A kísérlet során 15, eltérő probiotikus aktivitást mutató *Lactobacillus bulgaricus* törzset vizsgáltunk 11 órán keresztül. A pH változása, a sejtszám-növekedése és a viszkozitás változása alapján különbségek láthatóak a törzsek között. A viszkozításban az idő múlásával a joghurtta alakulás folyamán egy kiugró csúcs, mint maximális érték jelentkezett. Emellett a sejtszám változása és a pH görbe alapján meghatározott időpontok, úgy, mint 4 óra, 11 óra és inflexiós pont időpontjában lévő viszkozitás értékek segítségével a probiotikus törzsek csoportja szignifikánsan elkülönült a mérsékelt- és nem probiotikus csoportoktól. Összességében elmondható, hogy a viszkozitás, mint fizikai paraméter alkalmas lehet a különböző probiotikus aktivitást mutató törzsek elkülönítésére. Javasoljuk a kísérletek megismétlését és a baktériumtörzsek meghatározott arányú szimbiotikus tenyésztésének vizsgálatát, mivel a joghurtokban többféle tejsavbaktérium (*Streptococcus thermophilus* és *Lactobacillus bulgaricus*) van jelen egy időben.

Irodalomjegyzék

- Costa, M.P., Frasco, B.S., O. Silva, A.C., Freitas, M.Q., M. Franco, R.M. and Conte-Junior, C.A. (2015): Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) pulp, probiotic, and prebiotic: Influence on color, apparent viscosity, and texture of goat milk yogurts Journal of Dairy Science, 98:1-9.
<https://doi.org/10.3168/jds.2015-9738>
- Cubas-Cano, E., González-Fernández, C., Ballesteros, M., Tomás-Pejó, E. (2018): Biotechnological advances in lactic acid production by lactic acid bacteria: lignocellulose as novel substrate. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 12(2):290-303.

- <https://doi.org/10.1002/bbb.1852>
- Eş, I., Khaneghah, A.M., Barba, F.J., Saraiva, J.A., Sant'Ana, A.S., Hashemi, S.M.B. (2018): Recent advancements in lactic acid production—a review. *Food Research International*, 107:763-770. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.001>
- Falade, K.O., Ogundele, O.M., Ogunshe, A.O., Fayemi, O.E., Ocloo, F.C. (2015): Physico-chemical, sensory and microbiological characteristics of plain yoghurt from bambara groundnut (*Vigna subterranea*) and soybeans (*Glycine max*). *Journal of food science and technology*, 52(9):5858-5865. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1657-3>
- Figura, L., Teixeira, A.A. (2007): *Food physics: physical properties—measurement and applications*. Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-34194-9>
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., Salminen, S. (2001): Probiotics: effects on immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2):444-450. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.444s>
- Mousavia, M., Heshmatia, A., Garmakhanyb, A.D., Vahidinias, A., Taheria, M. (2019): Optimization of the viability of *Lactobacillus acidophilus* and physicochemical, textural and sensorial characteristics of flaxseed-enriched stirred probiotic yogurt by using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 102:80-88. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.023>
- Mani-López, E., Palou, E., López-Malo, A. (2014): Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 97(5):2578-2. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7551>
- Minto, M., Phebus, R.K., Schmidt, K.A. (2015): Plant extract enhances the viability of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in probiotic nonfat yogurt. *Food science & nutrition*, 3(1):48-55. <https://doi.org/10.1002/fsn.3189>
- Prescott, C.S., Breed, R.S. (1910): The determination of the number of body cells in milk by a direct method. *The Journal of Infectious Diseases*, 632-640. <https://doi.org/10.1093/infdis/7.5.632>
- Pu, F., Guo, Y., Li, M., Zhu, H., Wang, S., Shen, X., ..., He, F. (2017): Yogurt supplemented with probiotics can protect the healthy elderly from respiratory infections: a randomized controlled open-label trial. *Clinical Interventions in Aging*, 12:1223. <https://doi.org/10.2147/cia.s141518>
- Slavchev, A., Kovacs, Z., Koshiba, H., Nagai, A., Bázár, G., Krastanov, A., ..., Tsenkova, R. (2015): Monitoring of water spectral pattern reveals differences in probiotics growth when used for rapid bacteria selection. *PLOS One*, 10(7):e0130698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130698>
- Torrestiana B.S., Brito de la Fuente, E., Lacroix, C., Choplin, L. (1994): Modelling the acidifying activity profile of *Lactobacillus bulgaricus* cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42:192-196. <https://doi.org/10.1007/bf00186958>

Monitoring the growth of *Lactobacillus bulgaricus* strains with different probiotic activity using physicochemical properties

Kaszab T., Boda B., Pomázi A., Mohácsiné Farkas Cs.

Abstract

The primary task of probiotics is protection against harmful substances. The most important probiotic-producing microorganisms are lactic acid bacteria. Fermented foods are richer in flavour, more shelf-stable, and safer. Yogurts are fermented milk products that contain both *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. Their regular consumption is beneficial for the immune system. In our research, we monitored the growth of 15 strains of *Lactobacillus bulgaricus* with different probiotic activities based on physico-chemical properties. Before the experiment, a calibration test was performed with one sample selected from each group. During the experiment, the pH, cell count, and viscosity were determined from freshly prepared milk products inoculated with activated strains kept for 11 hours at 37 °C. The inflection point of pH curves, pH, cell count, and viscosity values were determined at 4 and 11 hours, and at the inflection point of the pH curve.

No significant differences for the 15 strains were found at either sampling time. The average number of colonies of the probiotic samples was the highest, but it was not significantly different from the other two groups. The viscosity of the probiotic strains at 4 and 11 hours was on average a third of the values of the other two groups, with significance. Looking at the viscosity values determined at the time of the inflection point of the pH curve, the non-probiotic strains had the highest and the probiotic strains had significantly the lowest value. Overall, it can be said that viscosity as a physical parameter can be suitable for separating strains showing different probiotic activities.

Keywords: amino acid, protein hydrolysis, chromatography, derivatisation

Friedrich-Ivanics Judit, Albert Krisztina Zita, Bánlaki-Doma Eszter

Kíméletes szárítási módok hatása a medvehagyma (*Allium ursinum* L.) beltartalmi jellemzőinek alakulására

A szerzők elérhetősége

Friedrich-Ivanics Judit¹ | laboratóriumi koordinátor | Levelező szerző
friedrich-ivanics.judit.eszter@uni-mate.hu

Albert Krisztina Zita¹ | egyetemi adjunktus
albert.krisztina.zita@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0001-7950-4460>

Bánlaki-Doma Eszter² | koordinációs referens
eszter.doma@am.gov.hu

A szerzők munkahelye

¹MATE ÉTTI Gyümölcs- és Zöldségfeldolgozás Technológia Tanszék
Munkahely címe: 1118 Budapest, Villányi út 29-45.

²Agrárminisztérium
Munkahely címe: 1055 Budapest, Kossuth tér 11.



Összefoglalás

A medvehagyma (*Allium ursinum* L.) egyre növekvő népszerűségét tapasztalva, előtérbe került annak lehetősége, hogy a növény szezonális jellegét megszüntetve, egész évben elérhető terméként, az év bármely szakában kihasználhatjuk ételízesítő aromáját, egészségvédő tulajdonságait. A medvehagyma eltarthatóságának növelése és biológiai értékeinek megőrzése érdekében kísérletünkben három különböző kíméletes szárítási módszert alkalmaztunk: liofilezést, vákuumszárítást és mikrohullámú-vákuumszárítást. Az alkalmazott szárítási módszereket a levelek és a szárrészek esetében is elvégeztük, valamint vizsgáltuk a különböző szárítási hőmérsékletek (40 és 50 °C) hatását.

Az elkészült szárítmányokat műszeresen és érzékszervileg minősítettük. A vízáktivitás, szerkezet, rehidrálnálhatóság, valamint az antioxidáns-kapacitás és a polifenoltartalom értékeit figyelembe véve az 50 °C-on liofilezett minták bizonyultak a legalkalmasabbnak szárított termék előállítására. Az érzékszervi bírálat eredményeit megvizsgálva, összbenyomás tekintetében a legjobb eredményt az 50 °C-on vákuumszárított és mikrohullámú vákuumszárított medvehagyma levelek érték el. Szárak esetében zöld színüket leginkább a vákuumszárított minták tartották meg, a liofilezett minták pedig kifakultak.

Kulcsszavak: medvehagyma, *Allium ursinum* L., szárítási mód, beltartalom

Bevezetés

Egyes források szerint a germánok úgy tartották, a növény 'medveerővel' bír, s ezért nevezték el a barna medvéről, melyet hagyományosan hatalmas tisztelet övezett (Csurgó, 2012). A medvehagyma hosszú nyelű

levelei fényes felületűek, lehetnek elliptikusak, széles lándzsa alakúak. Szára 10-40 cm hosszú, sima tapintású, világoszöld színű. Április-májusban virágzik, fehér színű, 6 szirmú ernyős virágzatokat nevelve (**1. ábra**). Toktermése nagy mennyiségű fehérjét (21,4%) és zsíros olajat (18,8%) tartalmaz, utóbbi jelentős tokoferol-tartalommal rendelkezik.



1. ábra: Medvehagyma (*Allium ursinum* L.) (Treben, 1990 nyomán)

A medvehagyma fő hatóanyaga egy cisztein-aminosav-származék, a kéntartalmú alliin, mely a friss növénynek természetes alkotója. Az eredeti vegyület szagtalan, a növény felszeletelése során azonban jellemző szagú, bomlékony vegyület keletkezik, mivel az alliináz enzim az alliant egy kevésbé stabil vegyületté, a szintelen allicinné alakítja – ez adja az *Allium* fajok karakteres aromáját, ízét. Az allicin antibiotikus és vérzsírérték-csökkentő hatása bizonyított.

Az átalakulás során poliszulfidok is keletkeznek, melyek lipidcsökkentő hatással rendelkeznek. A kevésbé stabil allicin enzimek hiányában részben ajoenné alakul, mely nagymértékben csökkenti a trombocita aggregációt, más néven a vérlemezkék kicsapódásának esélyét (Bernáth, 2013; Sobolewska, 2015).

Az *Allium* fajok, így az *Allium ursinum* L. is, a flavonoidokban igen gazdag források közé tartoznak. (Carotenuto et. al., 1996)

Carotenuto és társai (1996) három új flavonoid-glikozid vegyületet izoláltak medvehagymából, a már ismert két vegyületen felül. A Wu és munkatársai (2008) által azonosított két újabb vegyülettel eddig összesen hét flavonoid-glikozid (mindegyik kemferol-vegyület) izolálására került sor medvehagymából. Ugyanebben az évben egy, a növény minden szervét vizsgálat alá vető tanulmány szerint, más *Allium* fajokhoz képest a medvehagyma bizonyult a legmagasabb antioxidáns- és gyökfogó képességgel rendelkező egyednek. A relatíve magas antioxidáns-kapacitást legnagyobb mértékben a levelekben tapasztalták, és többek között a magas flavonoid-tartalommal magyarázták (Stajner et. al., 2008).

A feldolgozott élelmiszerek jelentős része veszít biológiai értékéből a feldolgozás során, s ez alól az antioxidáns-kapacitás és a polifenol tartalom sem feltétlenül kivétel. Azonban számos kutatás látott napvilágot azzal kapcsolatban, hogy bizonyos eljárások növelni látszanak élelmiszereink biológiai értékét. Vizsgálataink kiindulópontja volt a medvehagyma iránti egyre nagyobb érdeklődés. Számos gasztronómiai témájú weboldal, blog, rádió- illetve televízió műsor

foglalkozott a medvehagyma pozitív egészségügyi hatásaival és a konyhában betöltött szerepével. Egyre több élelmiszeripari kis- és középvállalkozás kínálatában jelentek meg a medvehagymával ízesített termékek. A tartósítási módok közül különösen a szárított változat kedvelt.

Fentiek alapján kísérletünk célkitűzése különböző kémleletes szárítási módok hatásának tanulmányozása volt a medvehagyma levél és szár antioxidáns hatású vegyületeinek és érzékszervi tulajdonságainak alakulására.

Anyagok és módszerek

Mintaelőkészítés

A vizsgálatokhoz felhasznált nyersanyag a Mecsek észak-keleti erdőterületeiről származó medvehagyma növény levél és szárrészei voltak. Első lépésben kiválogattuk a sérült, fonnyadt növényi részeket, így kizárólag ép, egészséges nyersanyagot dolgoztunk fel. A virágokat és bimbókat eltávolítottuk, majd a leveleket megmostuk, a felesleges nedvességet papírtörülkö segítségével óvatosan felitattuk. A szárítás hatékonyságának növelése érdekében a nyersanyagot egységes méretű szeletekre vágtuk: a levelek kb. 5x5 mm-es négyzetekre, a szár részeket hosszában szeleteltük, szintén 5 mm-enként. A felaprított minták előkezelés nélkül kerültek szárításra.

Az alkalmazott szárítási módszerek

Vákuumszárításnál az aprított nyersanyagot egy rétegben, egyenletes eloszlással helyeztük el a tálcán, melyet a vákuumkamra fűtőlapjára tettünk. Mind a szár, mind a levél szárítását 40, illetve 50 °C hőmérsékleten is elvégeztük, az alkalmazott nyomás 7,98 mbar volt. A szárítást Memmert V0-200 típusú vákuumszárító berendezéssel végeztük.

Mikrohullámú vákuumszárításra Labotron 600 típusú szárítót használtunk. Mind a szár, mind a levél szárítását 300 Watt teljesítmény mellett végeztük el. Az aprított nyersanyagot szintén egy rétegben, egyenletesen elosztatva üveg edénybe helyeztük, melyet a berendezésbe helyezve, a forgó tálcára illeszkedő üvegburával fedtünk le. Az alkalmazott nyomás itt is 7,98 mbar volt.

Fagyasztva szárítást Leybold-Heraeus típusú liofilező berendezéssel végeztük. A Petri-csészébe helyezett mintákat egy éjszakán át fagyasztó szekrényben tároltuk, -18 °C hőmérsékleten. A berendezés tálcájára egyidejűleg 6 db Petri-csésze került. A szárítás során a kamrában maximálisan 1 mbar nyomás uralkodott.

Mindhárom szárítási módszer esetében 6,5% nedvességtartalom vagy annál alacsonyabb

nedvességtartalom elérése volt a célt.

A kísérlet során elkészült mintákat összehasonlítottuk egy kiskereskedelmi forgalomban kapható megvegyagya levél szárítmánnyal. Ennek előállítási módja ismeretlen, azonban tulajdonságai (nem porózus szerkezet, erősen barnult szín) hagyományos szárítószekrényes szárításra engednek következtetni.

Mivel szárított megvegyagya szár kiskereskedelmi forgalomban nem volt kapható, ezért az összehasonlíthatóság kedvéért 50°C-on hagyományos, meleg levegős, atmoszférikus (100 literes Labor Műszeripari Művek LP 232/1 típusú) szárítószekrényben szárított mintákat is készítettünk.

A minták jelölésére az **1. táblázatban** található kódokat alkalmaztuk. Az elkészült szárítmányokat a **2. és a 3. ábra** szemlélteti.

1. táblázat: A szárítási eljárásokhoz tartozó jelölések

Jelölés	Szárítási eljárás megnevezése
L 40°C	Liofilezés 40 °C-on
L 50°C	Liofilezés 50 °C-on
V 40°C	Vákuum-szárítás 40 °C-on
V 50°C	Vákuum-szárítás 50 °C-on
VM	Mikrohullámú vákuumszárítás
Kiskeresk.	Kiskereskedelmi forgalomban kapható szárított levél
Szárítószekr.	Hagyományos, szárítószekrényben szárított szár 50 °C-on



2. ábra: Szárított levelek. (1. oszlop: L 50 °C, L 40 °C; 2. oszlop: V 50 °C, V 40 °C; 3. oszlop: VM, Kiskeresk.)



3. ábra: Szárított szárak. (1. oszlop: V 50 °C, V 40 °C; 2. oszlop: L 50 °C, L 40 °C; 3. oszlop: VM, Szárítószekr.)

Vizsgálati módszerek

Rehidráthatóság vizsgálata

A szárítmányok minőségére vonatkozóan rendkívül meghatározó szempont a visszanedvesedés mértéke, különös tekintettel arra, hogy a félkész élelmiszerek (úgy mint levesporok, instant mártások) iránti kereslet egyre növekszik és a fogyasztó számára mérvadó tulajdonság az elkészítéshez szükséges idő rövidege, továbbá a visszanedvesedett komponens érzékszervi minősége. A rehidrációs ráta, másnéven a visszanedvesítési index kiszámítása az alábbi képlet alapján történt (Barta, 2007):

$$RR = \frac{m_r}{m_{sz}}$$

ahol,

RR a rehidrációs ráta,

m_r a rehidratált minta tömege (g),

m_{sz} a száraz termék tömege (g).

A vizsgálat első lépéseként a különböző szárítási eljárással tartósított megvegyagya minták tömegét analitikai mérleggel megmértük, főzőpoharakba helyeztük, majd 35 illetve 90 °C-os desztillált vízzel jelre töltöttük. A főzőpoharakat állandó hőmérsékleten tartott vízfürdőbe helyeztük, 5 illetve 60 perc időtartamra. Az idő leteltével a mintákat kivettük, a szárítmányokról a felesleges vizet szűrőpapír, tölcser és Erlenmeyer-lombik segítségével lecsepegtettük. A minták tömegét analitikai mérleggel visszamértük.

A megvegyagya szárítmányok antioxidáns kapacitásának meghatározását (FRAP, Ferric Reducing Ability of Plasma) Benzie és Strain (1996) által kidolgozott módszerrel végeztük. A módszer elve, hogy antioxidáns aktivitással rendelkező vegyületek jelenlétékor a ferri-(Fe³⁺)-ionok ferro-(Fe²⁺)-ionokká redukálódnak, melyek alacsony pH-n tripiridil-triazinnal (TPTZ) komplexet képeznek, színes terméket, a ferro-tripiridil triazint hozva létre. A Fe²⁺-TPTZ erőteljes kék színe miatt fotometriásan mérhető, 593 nm-en. Az antioxidáns kapacitás értékét mmol AS/100 g szárazanyagtartalomra adtuk meg.

Az összes polifenol tartalom meghatározását Singleton és Rossi (1965) módszerével végeztük. A meghatározást Folin-Ciocalteu reagens segítségével mértük, a bekövetkező színváltozást 765 nm-en határoztuk meg. Az eredményeket mg GSE/100 g szárazanyagtartalomra számolva adtuk meg.

A levél- és szár minták érzékszervi bírálatát profilanálízissel végeztük 12 fő bíráló bevonásával. A bírálók 10 osztást tartalmazó, strukturált lineáris skálán jelölték be tapasztalataikat 11 szempontnak megfelelően.

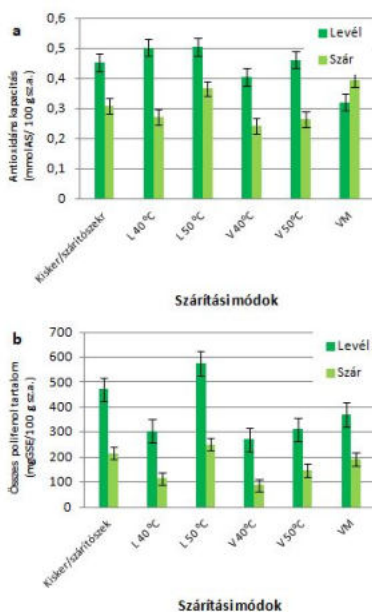
Eredmények és értékelésük

A medvehagymák szárítási idejét vizsgálva a legrövidebb szárítási idővel rendelkező módszernek a mikrohullámú vákuumszárítás bizonyult: levél és szár esetében is 35 perc elegendő volt 5% (levél) és 4,5% (szár) nedvességtartalom eléréséhez.

A legalacsonyabb nedvességtartalommal rendelkező szárítmány az 50°C-on, vákuum-szárítással tartósított medvehagyma szár lett (2,1%). Ehhez 4 órányi folyamatos szárításra volt szükség. A leghosszabb ideig a liofilezással történő szárítás valósult meg melyhez 8 óra kellett.

Antioxidáns kapacitás

Eredményeink alapján egyértelműen látható, hogy egy kivételtől (mikrohullámú-vákuum szárítás) eltekintve, a szárított levelek antioxidáns kapacitása jelentősen magasabb a szárított szár mintáknál (4a. ábra). Továbbá a liofilezált és a vákuum-szárítással tartósított minták esetében megfigyelhető az a tendencia, miszerint magasabb szárítási hőmérséklet magasabb antioxidáns kapacitást eredményez. Ez a tapasztalat megfelel az általunk tanulmányozott szakirodalmi eredményeknek is. Ugyancsak egyértelmű tendenciát tapasztaltunk a liofilezés és a vákuum-szárítás során mért antioxidáns kapacitás értékeknél is, azonos hőmérsékletek esetében a liofilezált minták antioxidáns kapacitása bizonyult magasabbnak. Vizsgálataink alapján a levél szárítmányok esetében az 50 °C-on liofilezált, szár esetében pedig a mikrohullámú vákuum szárítással tartósított minta rendelkezett a legmagasabb antioxidáns kapacitással.



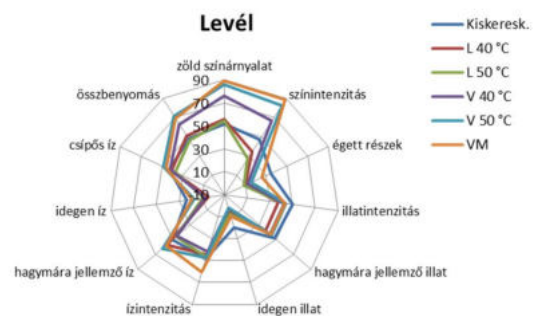
4. ábra: Medvehagyma szárítmányok antioxidáns kapacitása (a) és összes polifenol-tartalma (b)

Összes polifenol-tartalom

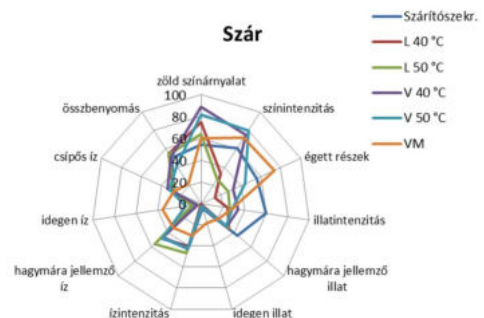
A diagramon jól látható (4b. ábra), hogy a levél-szárítmányok minden esetben sokkal magasabb polifenol-tartalommal rendelkeznek, mint a szár minták. Az antioxidáns kapacitáshoz hasonlóan itt is a magasabb hőmérséklet magasabb polifenol-tartalmat eredményezett. Megfigyelhető továbbá az is, hogy azonos hőmérsékleteken (szintén az antioxidáns kapacitáshoz hasonlóan) a liofilezált minták polifenol-tartalma magasabb a vákuum-szárított mintáknál, mind a levél, mind a szár esetében. Ez szintén egybeesik a fentebb említett szakirodalmi adatokkal. Jól látható, hogy mind a szár, mind a levél-szárítmányok közül az 50°C-on liofilezett minták rendelkeznek a legmagasabb teljes polifenol-tartalommal.

Érzékszervi bírálat értékelése

Az érzékszervi bírálat profilanalízisének eredményeinek értékei (5-6. ábra) százalékban szerepelnek.



5. ábra: Levél szárítmányok érzékszervi bírálat eredménye



6. ábra: Szár szárítmányok érzékszervi bírálat eredménye

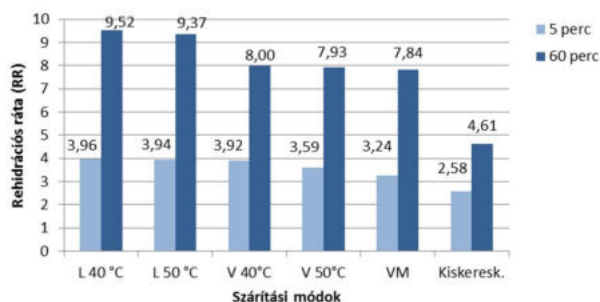
A levél szárítmányok esetében a bírálók jelentős mértékű eltérést tapasztaltak a minták színintenzitását illetően. A legerőteljesebb színintenzitást a mikrohullámú vákuumszárítással kezelt minták esetében érzékelték. Kis különbséggel, második legintenzívebb színnel rendelkező szárítmányként az 50°C-on vákuumszárított mintát jelölték meg. A vákuum-szárított és liofilezett minták sorrendben egymást követik a színintenzitást illetően, azonban a szárítás hőmérsékletére vonatkozóan nem vonhatunk le következtetéseket. A leghalványabbnak a liofilezett szárítmányok bizonyultak: rendkívüli mértékben elvesztették színüket. A zöld színárnyalat észlelése

ugyanazt az eredményt hozta. Égett részeket leginkább a kiskereskedelmi forgalomban kapható szárítmányban észlelték. A vákuum- és fagyaszttva szárított minták esetében a bírálók nem tapasztaltak számottevő mennyiségű égett darabot. A hagymára jellemző illat esetében felállított sorrend megegyezik az illatintenzitás sorrendjével. Érdekes módon a mikrohullámú vákuumszárítással tartósított medvehagyma levelek ízét tapasztalták a legintenzívebbnek, azonban a legjellegzetesebb hagyma-íz az 50 °C-on vákuum-szárított minták esetében érzékelték a bírálók. Az idegen íz jelenlétét szintén a kiskereskedelmi forgalomban kapható szárítmányban érezték a legerőteljesebbnek. Mind a csípősség, mind az összbenyomás tekintetében az 50 °C-on vákuum-szárított és a mikrohullámú vákuumszárítással tartósított medvehagyma levelek szerepelnek az első helyen. A száraz bírálati eredményeiből összeállított sugárdiagram a levelek minőségi paramétereitől, kedveltségi megoszlásától teljesen eltérő képet mutat. A zöld színárnyalat és a színintenzitás egyaránt a vákuum-szárított minták esetében érzékelhető leginkább. A zöld színárnyalat legkevésbé a szárítószekrényben szárított mintában volt érzékelhető: a sárga színárnyalat sokkal inkább dominált. A zöld szín dominanciája és a kíméletes szárítási módszerek során alkalmazott hőmérséklet között összefüggés tapasztalható: az alacsonyabb hőmérsékleten a medvehagyma száraz nagyobb mértékben őrizték meg zöld színüket. A színintenzitást vizsgálva itt is a liofilizált minták bizonyultak a legfakóbbnak. A mikrohullámú vákuumszárítással kezelt mintában túlzott mértékben fordult elő égett szárrész. Az illat intenzitása és a jellegzetes hagyma-illat a levelekhez hasonlóan itt is a nem kíméletes szárítással előállított mintánál volt a legerősebb. Íz tekintetében az 50 °C-on liofilizált medvehagyma szár bizonyult sikeresnek. A csípős íz jelenlétét csak kismértékben érzékelték a bírálók.

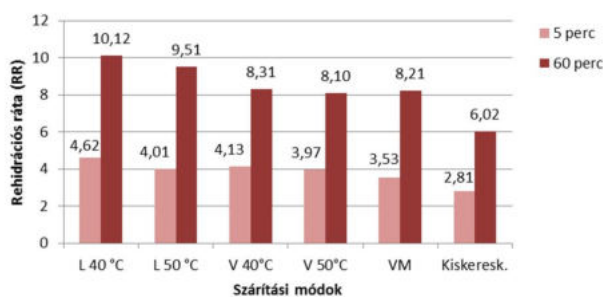
Rehidratációs ráta

A levélszárítmányok rehidráthatóságával kapcsolatos eredményeket oszlop-diagramokon (7-8. ábra) szemléltetjük. Összehasonlítva a 35 és 90 °C-on, 5 és 60 percig végzett visszanedvesítések eredményeit, egyértelműen kijelenthető: hosszabb ideig tartó és magasabb hőmérsékleten történt rehidráció magasabb rehidrációs rátát eredményezett. Eredményeink alapján a visszanedvesítés ideje sokkal inkább befolyásoló tényező, mint az alkalmazott hőmérséklet.

Levelek esetében 60 percnyi rehidráció alatt csaknem megduplázódott a rehidrációs ráta értéke az 5 perces időtartamhoz képest. Ezzel szemben a 35 és 90 °C-os visszanedvesítés között csaknem minden



7. ábra: Szárítási módok és rehidráthatóság idő-függése 35 °C-on levelek esetében



8. ábra: Szárított száraz. (1. oszlop: V 50 °C, V 40 °C; 2. oszlop: L 50 °C, L 40 °C; 3. oszlop: VM, Szárítószekr.)

esetben csupán néhány tizednyi eltérést tapasztaltunk az értékekben. Az egyetlen kivételt a 60 percnyi visszanedvesítésen átesett mikrohullámú levélszárítmány jelenti. A legnagyobb mértékű rehidrációra képes szárítmányok a liofilizált minták bizonyultak. Bár a 40 és 50 °C-on fagyaszttva szárított minták rehidráthatósága között a különbség nagyon csekély, az adatok alapján a 40 °C-on liofilezett levél rehidráthatóbbnak bizonyult. A liofilezett minták nagymértékű rehidráthatósága porózus, szivacsos anyagszerkezetüknek köszönhető.

Következtetések, javaslatok

Kutatásaink során azt vizsgáltuk, hogy az általunk alkalmazott szárítási technológiák, valamint a hőmérséklet változtatásával melyik szárítási módszer bizonyul alkalmasabbnak a medvehagyma beltartalmi paramétereinek és érzékszervi tulajdonságainak megőrzésére. A nyersanyag szárítási idejét tekintve legrövidebb idő alatt a mikrohullámú vákuumszárítással sikerült a terméket megszáritani, leghosszabb ideig pedig a liofilezés tartott. 10 °C hőmérséklet különbség csekély, de minden esetben azonos mértékben eredményezett nedvességtartalom csökkenést. Azonos körülmények között végzett szárítás során a medvehagyma száraz végső nedvességtartalma minden esetben alacsonyabb volt a levelekéhez képest. Legalacsonyabb nedvességtartalommal az 50 °C-on vákuumszárított szár rendelkezett.

A vízakaktivitás értékek alakulása függ az alkalmazott

szárítástól és a szárítási hőmérséklettől. A magasabb szárítási hőmérséklet minden esetben alacsonyabb értéket kaptunk. A legalacsonyabb vízáktivitás értékkel az 50 °C-on liofilezett szár rendelkezett.

Kimutattuk, hogy a rehidrációs ráta alakulása függ a visszanedvesítés idejétől és az alkalmazott hőmérséklettől, s csekély mértékben a szárítás hőmérsékletétől is. Ezen tényezők közül a rehidrációs időtartama befolyásolta leginkább a rehidrációt. A leginkább rehidráálható termékeknek a liofilezett szárítványok bizonyultak, porózus szerkezetüknek köszönhetően.

Méréseink során egyértelmű összefüggést tapasztaltunk a szárítási hőmérséklet és az antioxidáns kapacitás valamint a teljes polifenol-tartalom között. 10°C-kal magasabb hőmérsékleten szárított minták esetében magasabb értékeket mértünk. A levél szárítványokban az esetek többségében magasabb antioxidáns kapacitást és polifenol-tartalmat mutattunk ki, mint a szárakban.

A színmérés alátámasztotta, hogy a szárítás eredményeképpen a szárítványok többsége sötétebb lett a nyers medvehagymához képest. Liofilezésnél azonban a szárak jelentős mértékben kifakultak. A színvizsgálat eredményei összhangban vannak az érzékszervi bírálat során tapasztaltakkal. Sajnos a hagymára jellemző illat intenzitása gyengének bizonyult a vákuum alkalmazása miatt és a csípős íz karaktere sem volt kellőképpen domináns. Összbenyomás tekintetében az 50 °C-on vákuum-szárított és a mikrohullámú vákuum szárítással tartósított medvehagyma levelek szerepelnek az első helyen. A szárak esetében pedig a liofilezett mintákat preferálták a bírálók.

Köszönetnyilvánítás

A kutatás az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005 pályázat keretében valósult meg.

Irodalomjegyzék

- Barta, J. (szerk.) (2007): A gyümölcsfeldolgozás technológiái. Budapest, Mezőgazda Kiadó, 145-163; 273.
- Benzie, I.F., Strain, J.J. (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239:70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bernáth J. (szerk.) (2013): Vadon termő és termesztett gyógynövények. Budapest, Mezőgazda Kiadó, 165-167.
- Carotenuto, A., Feo, V.D., Fattorusso, E., et. al. (1996): The flavonoids of *Allium ursinum*. *Phytochemistry*, 41:531-536. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00574-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00574-9)
- Csurgó, S. (2012): Családi gyógynövénytár. Budapest, Mezőgazda Kiadó, 101-103.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol Vitic.*, 16:144-158.
- Sobolewska, D., Podolak, I. (2015): *Allium ursinum*: botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochem. Rev.*, 14:81-97. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9334-0>
- Stajner, D., Popovic, B. M., Canadanovic-Brunet, J., Stajner, M. (2008): Antioxidant and scavenger activities of *Allium ursinum*. *Fitoterapia*, 79, 303-305. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.01.008>
- Wu, H., Dushenkov, S., Ho, C., et al. (2008): Novel acetylated flavonoid glycosides from the leaves of *Allium ursinum*. *Food Chemistry*, 115:592-595. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.058>
- Treben, M. (1990): Egészség Isten patikájából. 24. kiadás alapján, 7. változatlan utánnomás. Budapest, HUNGA PRINT Könyvek, HUNGA PRINT Nyomda és Kiadó, 44-46.

Influence of gentle drying methods on the changing of the nutritional characteristics of ramson (*Allium ursinum* L.)

Friedrich-Ivanics J., Albert K., Bánlaki-Doma E.

Abstract

*The growing popularity of *Allium ursinum* L. has brought to the fore the possibility of using its seasonal nature as a year-round product, taking advantage of its flavouring and health-promoting properties at any time of the year. In order to increase the shelf-life and to preserve the biological values of ramson, three different gentle drying methods were used in the experiment: lyophilisation, vacuum drying and microwave-vacuum drying, respectively. The drying methods used were applied to both leaves and stalk parts, and the effect of different drying temperatures (40 and 50 °C) was investigated.*

The dried products were instrumentally and also organoleptically graded. Taking into account the values of water activity, structure, rehydratability, antioxidant capacity and polyphenol content, the samples lyophilised at 50 °C were found to be the most suitable for the production of dried product. When the results of the sensory evaluation were examined, the best results in terms of general aspect were obtained for the vacuum dried and microwave vacuum dried ramson leaves at 50 °C. In case of stalk, green colour was retained most by vacuum-dried samples and faded by lyophilized samples.

Keywords: shallot, *Allium ursinum* L., drying method, contents

Lippai Laura, Mednyánszky Zsuzsanna, Kocsis Tamás, Kiskó Gabriella

Vízkefirkultúrával fermentált ital fejlesztése

A szerzők elérhetősége

Lippai Laura¹ | hallgató
lippai.laura@stud.uni-mate.hu

Mednyánszky Zsuzsanna² | egyetemi docens
mednyanszky.zsuzsanna@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0002-1654-5596>

Kocsis Tamás¹ | egyetemi adjunktus
kocsis.tamas.jozsef@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0001-7169-7245>

Kiskó Gabriella² | egyetemi tanár | levelező szerző
kisko.gabriella@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0003-3344-5308>

A szerzők munkahelye

¹MATE ÉTTI Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia és -biztonság Tanszék
Munkahely címe: 1118 Budapest, Somlói út 14-16.

²MATE ÉTTI Táplálkozástudományi Tanszék
Munkahely címe: 1118 Budapest, Somlói út 14-16.



Összefoglalás

A vízkefir kevésbé ismert fermentált készítmény, amely a japán kristálygomba fermentleve. A vízkefir mikrobiológiai jellemzői nagyban függenek a származási helytől, a fenntartástól és a fermentáció körülményeitől. A munka célja egy ízesített vízkefir ital fejlesztése volt a mikrobiológiai összetétel és érzékszervi paraméterek vizsgálata mellett. A mikrobióta összetételének vizsgálata hagyományos tenyésztéses vizsgálatokat követő MALDI –TOF MS készülékkel történt. Az érzékszervi vizsgálatok során 20 laikus bíráló minősítette az első fermentáció eredményeként készült ízesítetlen valamint második fermentáción átesett ízesített vízkefir termékeket. Mind az ízesítetlen, mind az ízesített vízkefir italokban a tejsavbaktériumok, ecetsavbaktériumok és élesztőgombák domináltak. Az azonosított ecetsav- és tejsavbaktérium fajok az *Acinobacter indonesiensis* és a *Gluconobacter oxidans* spp. *oxydans*. valamint a *Lactobacillus ghanensis* és a *Lactobacillus satsumensis* voltak. Mellettük 3 élesztőgomba faj, a *Saccharomyces cerevisiae*, a *Pichia fermentans* és a *Wickerhamomyces anomalus* került azonosításra. Az érzékszervi vizsgálatok során a bírálók a gyümölcsös ízesítésű mintákat preferálták. A fejlesztett ital alternatívaként szolgálhat egyes fogyasztói csoportok (pl. tejérzékenyek, vegánok) számára, mindemellett a szénsavas üdítőitalok egészségesebb helyettesítője is lehet.

Kulcsszavak: vízkefir, fermentált ital

Bevezetés

Emésztőrendszerünket a rostban gazdag gabonák, hüvelyesek, gyümölcsök és zöldségek mellett fermentált termékekkel, például a savanyú káposztával vagy a kefirrel is támogathatjuk. Kevésbé ismert, de hasonlóan jótékony hatású fermentált készítmény a vízkefir, amely a japán kristálygomba, másnéven tibicos fermentleve. A kristálygomba megjelenéséről kapta a nevét, amely egy kristályszerű, glükopoliszacharid gélben élő főleg *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Acinetobacter*, *Saccharomyces*, *Candida* és *Kloeckera* nemzetségekből álló szimbiotikus közösség. A fermentációhoz elsősorban kristálygomba, cukor és víz szükséges. A terméket ízesítve is elkészíthetjük pl. aszalt gyümölcsökkel, citrommal vagy gyömbérrel. Egy-két napos, 20-25 °C-on végzett fermentációval készül el a szénsavas, enyhén édes, savanykás ital, amelynek számos jótékony hatást tulajdonítanak. A vízkefir jelentős antioxidáns és probiotikum forrása lehet (Zeynep és társai, 2021). A vízkefir mikrobiológiai összetétele nagyban függ a származási helytől, a fenntartástól és a fermentáció körülményeitől (Prado és társai, 2015). Előállításánál általában 10:100 arányban oszlik meg a kristálygomba és az oldat (Fiorda és társai, 2017). Benne a mikrobák szaporodását cukoroldat, gyümölcslé, zöldséglé vagy valamilyen gabona alapú ital biztosítja, amely megfelelő mennyiségben tartalmaz szacharózt vagy fruktózt. A termékben a fő fermentációs végtermékek a tejsav, ecetsav, etanol és szén-dioxid (Laureys és De Vuyst, 2017).

A gombaszemcséket dextrán mátrix alkotja (Fels és társai, 2018), melyek ösztömegének növekedése a fermentáció során 4-5%. A gombaszemcsék képzéséért *Lactocaseibacillus casei* (korábban *Lactobacillus casei*), *Lactobacillus* (*L.*) *nagelii*, *L. hordei*, *L. hilgardii* és *Leuconostoc mesenteroides* (Davidovic és társai, 2015) felelősek. A fermentáció során jellegzetes és fontos mikrobák a *Lactocaseibacillus paracasei* (korábban *L. paracasei*), *L. hilgardii*, *L. nagelii* és *Saccharomyces cerevisiae* (Laureys és De Vuyst, 2017). A *L. hilgardii* és a *L. nagelii* kulcsfontosságú fajok a mikrobaközösségben, különösen az exopoliszacharid termelésük miatt (Fels és társai, 2018). A tejsavbaktériumok mellett ecetsavbaktériumok, főleg *Acetobacter* fajok is részei a mikrobaközösségnek, ugyanakkor nem mindig detektálhatóak, akár ugyanabban a kultúrában sem (Laureys és De Vuyst, 2014, 2017). *Gluconobacter* fajok, mint a *G. liquefaciens* és a *G. roseus/oxydans* ritkábban kerülnek kimutatásra (Laureys és társai 2018). A vízkefirben az élesztőgombák (pl. *Saccharomyces*, *Zygorulaspóra*, *Dekkera*) jelenléte kulcsfontosságú, mivel a szacharózt hidrolizálják el extracelluláris β -D-fruktofuranozidázukkal glükózra és fruktózra (Watson; 1993). A *Saccharomyces cerevisiae* megtalálható

szinte az összes kultúrában. Más *Saccharomyces* fajok sokkal kevésbé fordulnak elő a vízkefirben. A vízkefirben rendszeresen találunk *Candida* fajokat is, mint például a *C. ethanolica*, *C. californica*, *C. lambica*, *C. valida* és a *C. valdiviana*. Ritkábban *Dekkera*, *Zygorulaspóra*, *Yarrowia* és *Pichia* fajokat is kimutatnak (Lynch és társai, 2021).

Mivel a tejsav- és ecetsavtermelésnek köszönhetően a vízkefir pH-ja jellemzően 4,5 alatt van az erjedés kezdetétől fogva (Laureys és társai, 2018), a nem kívánatos mikrobák növekedésének kockázata alacsony. Néhány *Enterobacter* fajon kívül (Waldherr és társai, 2010; Zanirati és társai, 2015) nem azonosítottak még vízkefirben patogén mikroorganizmusokat. A vízkefir etanoltartalma (ami főleg a fermentáció késői szakaszában keletkezik és jellemzően 0,02 és 2,0% között van) is segíthet a patogénekkal szembeni védelemben (Laureys és De Vuyst, 2014).

A munka célja egy kristálygomba-kultúrával fermentált ital fejlesztése volt a mikrobiológiai összetétel és érzékszervi paraméterek vizsgálata mellett.

Anyagok és módszerek

A vízkefir elkészítése

A kísérletek során alkalmazott vízkefir-kultúra egy egri háztartásból származott. A kultúra szobahőmérsékleten való fenntartásához 2 napos ciklusokban szükséges a fermentációt elvégezni. A vízkefir elkészítése során elsőként 75 g kereskedelembe kapható kristályos szacharóz bemérése történt 1000 ml forrásban lévő vízbe, amit 5 perces forrásban tartás követett. A 7%-os cukoroldat 25 °C fok alá való lehűlését követően, tiszta, csatos üvegbe töltés, majd 100 g vízkefirgomba és 25 g héj nélküli citromkarika hozzáadása következett. Az üveg lezárása után 25 °C-os, közvetlen fénytől védett helyiségben 48 órán keresztül zajlott a fermentáció. Két nap elteltével egy tiszta szűrő segítségével a fermentlé és a vízkefirgomba elválasztásra került egymástól. Ezt követően a leszűrt vízkefirgomba az előzőleg ismertetett recept szerint új fermentáció során újra felhasználásra került.

Második fermentáció során az első fermentációban elkészült, szűrt fermentlé további erjesztése történt ízesítő anyagokkal. A szűrt lé (1000 ml) tiszta, jól záródó üvegbe való töltését követően a 120 ml gyümölcslé vagy cukoroldat (9 g szacharóz 110 ml vízben oldva) hozzáadása történt. Ezt követően 25 °C-os, közvetlen fénytől védett helyiségben, 24 órán keresztül zajlott a fermentáció, majd további felhasználásig a minták hűtőben voltak tárolva. A mérések elvégzéséhez használt 2. fermentációs minták minden esetben 1 napos hűtőtárolást követően kerültek felhasználásra a mikrobiológiai és érzékszervi vizsgálatok során is.

Felhasznált gyümölcslevek

A 2. fermentációban felhasznált gyümölcslevek kereskedelmi forgalomban kapható 100%-os almálé, 100%-os narancslé és 100%-os áfonyalé voltak. A narancslé felhasználás előtt szűrve lett, mivel a fermentáció során a rostok felúsztak a folyadék tetejére és egy „rostdugót” képeztek.

Mikroba csoportok számának meghatározása

Az első- és a második fermentációt követően a fermentlevekből tizedelő hígítási sor készítése után a megfelelő hígítási tagokból szelektív táptalajok esetében szélesztéssel, míg az összmikrobaszám meghatározása során lemezöntéssel történt a mikrobaszámok meghatározása. Az összes mikrobaszám meghatározása TGE agaron, az *Acetobacter*-ek számának meghatározása ABA tápagon 30 °C fokos 2 napig végzett inkubálással zajlott. A tejsavbaktériumok számának meghatározásához használt MRS lemezek inkubációja anaerob tenyészedényben 37 °C-on, míg az élesztőszám meghatározáshoz használt RBC tápagar lemezek inkubációja 25 °C fokon történt 3 napon keresztül.

Mikrobák identifikálása MALDI-TOF MS-sel

Az identifikáláshoz tiszta tenyészetek elkészítésére volt szükség. Az izolálás a különböző mikroba csoportok sejt számának meghatározásához készített lemezek különböző morfológiát mutató telepekből történt. Az izolált mikroorganizmusok azonosítása Bruker Microflex LT MALDI-TOF tömegspektrométerrel történt hangyasavas szuszpenzió készítési protokoll szerint (Horváth és munkatársai, 2020).

Érzékszervi bírálat

A minták érzékszervi bírálatát 20 laikus végezte. A fogyasztói érzékszervi teszt a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Budai Campus I épületében zajlott. A minták 3 számjegyű kódjának és sorrendjének megalkotása véletlenszám generátorral történt. A fogyasztói érzékszervi tulajdonságokat a bírálók

5 pontos skálán értékelték. A bírálók a minták mellé kaptak egy pohár vizet, hogy 2 kóstolás között ki tudják öblíteni a szájukat. A bírálatok értékelését papírlapon hajtották végre. Az adatok elemzése Office Excel feladatkezelővel történt.

Eredmények és értékelésük

Mikrobaszám meghatározás

Az első fermentáció végére a vízkefir italban az összes mikrobaszám 6,7 log tke/ml volt (**1. táblázat**), melyben hasonló nagyságrendben voltak kimutathatók a tejsavbaktériumok, *Acetobacter*-ek és élesztőgombák. A 2. fermentációs minták mindegyikében az összessejtszám 1 nagyságrenddel történő növekedése volt megfigyelhető. A tejsavbaktériumok mennyisége a cukros mintában kisebb mértékben (1 nagyságrenddel) növekedett, míg a gyümölcsös mintákban jelentősebben (2 nagyságrenddel) lett nagyobb a mennyiségük. Az eredmények alapján a gyümölcsös mintáknak tejsavbaktériumok esetében mikrobaszám növelő hatás tulajdonítható be a cukoroldattal szemben. A gyümölcsmintákat összehasonlítva az áfonyásban volt a legtöbb tejsavbaktérium, ugyanakkor nem volt nagyságrendnyi különbség a minták között. A cukros mintában az 1. fermentációhoz képest az *Acetobacter*-ek száma is növekedést mutatott (1 nagyságrenddel). A gyümölcsös minták közül a narancsosban volt nagyobb mennyiségű *Acetobacter*. A cukros és gyümölcsös mintákban az élesztők mennyisége is nőtt az 1. fermentációhoz képest, közülük a cukros tartalmazta a legtöbb élesztőt, valószínűleg mert a szacharózt az élesztők tudták a legjobban hasznosítani.

A MALDI-TOF MS identifikálás eredményei

A mikrobák azonosítása előtt a különböző tápagarokról 18 különböző morfológiájú telep lett felhasználva tiszta tenyészet készítéséhez. Végül 7 mikrobafajt sikerült azonosítani, amelyek a 18 tiszta tenyészetben többször előfordultak.

1. táblázat: Mikroba csoportok sejt száma a vízkefir mintákban a fermentáció végén

Termék	Mikrobaszám (log ₁₀ TKE/ml)				
	Összes mikroba	Tejsavbaktériumok	Acetobaktériumok	Élesztőgombák	Penészgombák
1. fermentáció	6,7	4,6	4,0	4,8	<1,0
cukros	7,5	5,7	5,7	5,9	<1,0
almás	7,5	6,1	3,0	4,2	<1,0
áfonyás	7,0	6,6	3,0	5,6	<1,0
narancsos	7,4	6,0	4,8	4,8	<1,0

Identifikálva lett az Acetobacteriaceae családba tartozó *Acinobacter indonesiensis* (DSM 15552T) faj, amely először 2000-ben lett leírva (Lisdiyanti és társai, 2000). Ezek a baktériumok az alkoholt és a cukrot nem teljesen oxidálják el, ami ecetsav képződéshez vezet oxigén jelenlétében. Az *A. indonesiensis* széles körben elterjedt a természetben és számos forrásból izolálható, mint az ecet, az alkoholos italok, a trópusi gyümölcsök vagy a virágok (Sengun és Karabiyikli, 2011). Laureys és társai 2018-ban mutatták ki először a fajt egy belgiumi vízkefirből. Megállapították, hogy az *A. indonesiensis* aktívabb volt anaerob körülmények között, illetve a folyadékban volt nagyobb mennyiségben jelen. A másik azonosított Acetobacteriaceae családba tartozó ecetsav baktérium a *Gluconobacter oxidans* subsp. *oxydans* (B544 UFL) volt. Ez az obligát aerob mikroba szereti a cukros közegeket, mint az érett szőlő, alma, datolya, de megtalálható méheken, ciderben, borban, vagy a kerti talajban is.

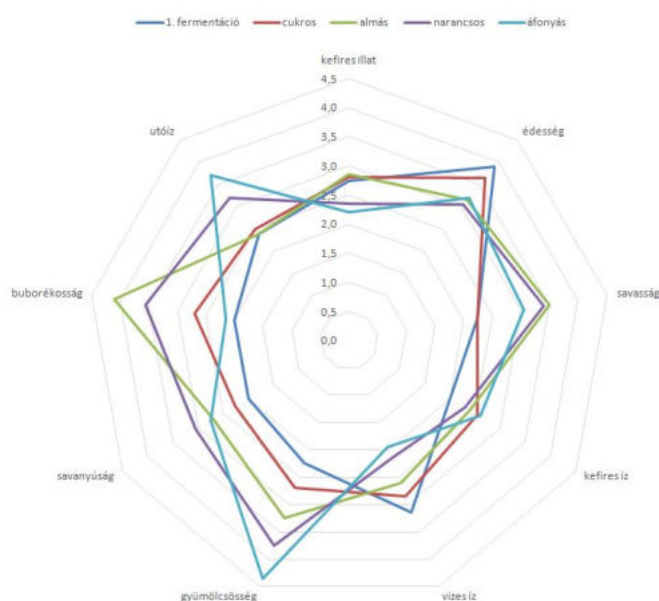
Két *Lactobacillus* fajt is sikerült azonosítani. A *L. ghanensis* (DSM 18630T) a glükózt és számos más szubsztrátot gázképzés nélkül tejsavvá alakítja. Európai vízkefirből 2019-ben Angelescu és társai mutatták ki először. Közeli rokonságban áll vele a másik azonosított *Lactobacillus*, a *L. satsumensis* (DSM 16230T), amely szacharóz tápközegben is képes szaporodni és ismétlődő D-glükózból álló homopoliszacharidok termeléséért felelős, különösen az α -(1,6)-glükánokért, amelyek az elsődleges polimerei a gombaszemcséknek, tehát ez a *Lactobacillus* részt vesz a gombaszemcsék képzésében (Côté és társai, 2013).

Három élesztőgomba faj is azonosításra került. A *Saccharomyces cerevisiae* (DSM 70868) jelenléte a vízkefirben kulcsfontosságú, mivel a szacharózt extracelluláris β -D-fruktofuranozidáz aktivitásával glükózra és fruktózra hidrolizálja. A cukrokból képes szén-dioxidot és alkoholt előállítani, ezáltal nagyban befolyásolja a vízkefir érzékszervi tulajdonságait. A *Pichia fermentans* (CBS 2068), anamorfnévén *Candida lambica* a környezetben is megtalálható, különösen a leveleken, a virágokon, a vízben és a talajban. Néha megtalálható gyümölcsök felületén, leginkább a szőlőn. A lambic (spontán fermentációval készült) sör egyik jellegzetes alkotója. A *Wickerhamomyces anomalus* (DSM 6766NT), anamorfnévén *Candida pelliculosa*, a borkészítés egyik jellegzetes mikrobája. A mikroba megtalálható a fákon, növényeken és gyümölcshéjakon, rovarokon, az emberi bőrön és ürülékben, szennyvízben és a tengeri környezetben. Széleskörű előfordulása nagy tűrőképességének köszönhető, mivel bírja a hőmérséklet-, pH- és az ozmotikus változások okozta stresszt.

Az érzékszervi bírálat eredményei

A kóstolást laikusok végezték, mert az átlag fogyasztó véleményének megismerése volt a vizsgálat célja. Az eredmények szubjektívek, mert a kóstolók saját ízlésén alapul, amely minden embernek más. Az előre meghatározott tényezőket a bírálóknak 1-től 5-ig terjedő skálán kellett értékelniük, hogy az adott tulajdonság mennyire jellemző vagy nem jellemző az adott mintára. A vízkefirnek három számjegyű kóddal lettek ellátva. Az érzékszervi bírálaton 20 ember vett részt, 18 nő és 2 férfi, 23 és 62 éves kor között. Az eredmények sugar diagramon ábrázolva láthatók, amely lehetőséget ad a minták szemléletes összehasonlítására, és az ízprofiljuk felvételére. A bírálatot megelőző kérdőív kitöltését követően kiderült, hogy a bírálók 75%-a rendszeresen fogyaszt probiotikus termékeket, viszont csak 20%-uk ismerte a vízkefirgombát és ennek fele 10% ivott már vízkefirt.

Az **1. ábra** szemléletesen mutatja a különböző minták közötti különbségeket. Legédesebbnek az 1. fermentációs és a cukros minták bizonyultak a bírálók szerint, míg a legkevésbé édes a narancsos minta volt. Ez az eredmény azért érdekes, mert az 1. fermentációs mintában volt a legkisebb cukortartalom (nem publikált mérési adat). Valószínűleg ebben a mintában a savak nem nyomják el olyan mértékben a cukros ízt, emiatt a kisebb cukortartalom mellett is édesebbnek érződik. A legsavasabbnak és legsavanyúbbnak az almás és a narancsos mintát tartották a bírálók, míg legkevésbé az 1. fermentációs és a cukros mintákat. Egyik mintában sem volt kiemelkedő a kefires illat és íz a bírálók szerint,



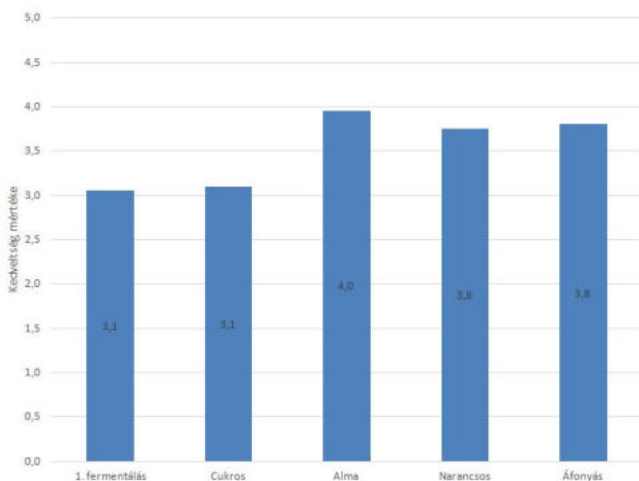
1. ábra: A vízkefir minták ízprofilja

ami pozitív eredmény, így az erre érzékenyebb fogyasztók is választhatják ezeket az italokat. A legvizesebb ízűnek az 1. fermentálás mintáját tartották, valószínűleg azért, mert az ízekért felelős cukrok, savak és aromák ebben az italban kisebb mennyiségben vannak jelen. A leggyümölcsösebb minta az áfonyás volt, ezt követte a narancs és az alma. Az eredmény alapján a gyümölcsös és cukros mintákat el tudták egymástól különíteni a bírálók. A legbuborékosabbnak az almás, illetve narancsos mintákat ítélték a bírálók. Az első fermentálás és az áfonyás mintákban kevésbé volt buborék. Az áfonyás minta párhuzamosok és ismétlések esetén sem tartalmazott több buborékot, amiből arra következtek, hogy a minta alacsony pH-ja gátolja a szén-dioxid képző mikrobák, pl. a *Saccharomyces cerevisiae* működését. Utóíze az áfonyás mintának volt a leginkább, illetve a narancsos mintának. Az áfonyás minta utóízét 13-an kellemesnek vélték, 4-en nem érezték különösebb utóízt és 3-an kellemetlennek tartották a megjelenő utóízt. A többi minta esetében kevésbé érzékelték utóízt.

Összességében a bírálóknak az almás minta ízlett a legjobban (**2. ábra**), ugyanakkor a kedveltséget tekintve nem sokkal maradt le a másik 2 gyümölcsös minta sem. Az 1. fermentációs és a cukros minta jóval kevésbé nyerte el a bírálók tetszését, így mindenképpen érdemes tovább folytatni a kutatást a különböző gyümölcslevek alkalmazásával a vízkefir kultúrában.

Következtetések, javaslatok

Az egészséges bélrendszer működéséhez a változatos és kiegyensúlyozott táplálkozás részeként érdemes minél több rostban gazdag zöldséget, hüvelyeseket és gyümölcsöket fogyasztani, mindemellett, hogy a jótékony tejsavbaktériumok valamint probiotikus mikrobák pótlását is szem előtt tartjuk. A munkánk



2. ábra: A vízkefir minták kedveltsége

során fejlesztett ital alternatívaként szolgálhat a tejérzékenyek, vegánok, illetve azok számára, akik nem szeretik a savanyú tejtermékek fogyasztását mindemellett akár egészségesebb alternatívája lehet a szénsavas üdítőitaloknak is.

Köszönetnyilvánítás

A munka az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-21-22 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

Irodalomjegyzék

- Angelescu, I.R., Zamfir, M., Stancu, M.M., Grosu-Tudor, S.S. (2019): Identification and probiotic properties of lactobacilli isolated from two different fermented beverages. *Annals of Microbiology*, 69:1557-1565. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01540-0>
- Côté, G.L., Skory, C.D., Unser, S.M., Rich, J.O. (2013): The production of glucans via glucansucrases from *Lactobacillus satsumensis* isolated from a fermented beverage starter culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16):7265-7273. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4606-y>
- Davidovic, Z.S., Miljkovic, G.M., Antonovic, G.D., Rajlic-Stojanovic, D.M., Dimitrijevic-Brankovic, I.S. (2015): Water kefir grain as a source of potent dextran producing lactic acid bacteria. *Hemijaska Industrija*, 69(6):595-604. <https://doi.org/10.2298/hemind140925083d>
- Fels, L., Jakob, F., Vogel, R.F., Wefers, D. (2018): Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydrate Polymers*, 189:296-303. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.037>
- Fiorda, F.A., de Melo-Pereira, G.V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S.K., Pagnoncelli, M.G.B., de Souza Vandenberghe, L.P., Soccol, C.R. (2017): Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. *Food Microbiology*, 66:86-95. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.004>
- Horváth, B., Peles, F., Szél, A., Sipos, R., Erős, Á., Albert, E., Micsinai, A. (2020): Molecular typing of foodborne coagulase-positive *Staphylococcus* isolates identified by MALDI-TOF MS. *Acta Alimentaria*, 49(3):307-313. <https://doi.org/10.1556/066.2020.49.3.9>
- Laureys, D., De Vuyst, L. (2014): Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80:2564-2572. <https://doi.org/10.1128/aem.03978-13>
- Laureys, D., Aerts, M., Vandamme, P., De Vuyst, L. (2018): Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. *Food Microbiol.*

- 73:351–361. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.007>
- Laureys, D., De Vuyst, L. (2017): The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. *J. Appl. Microbiol.*, 122:719–732. <https://doi.org/10.1111/jam.13370>
- Lisdianty, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., Komagata, K. (2000): Systematic study of the genus *Acetobacter* with descriptions of *Acetobacter indonesiensis* sp. nov., *Acetobacter tropicalis* sp. nov., *Acetobacter orleanensis* (Henneberg 1906) comb. nov., *Acetobacter lovaniensis* (Frateur 1950) comb. nov., and *Acetobacter estunensis* (Carr 1958) comb. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 46:147–65. <https://doi.org/10.2323/jgam.46.147>
- Lynch, K.M., Wilkinson, S., Daenen, L., Arendt, E.K. (2021): An update on water kefir: Microbiology, composition and production. *International Journal of Food Microbiology*, 345:109128. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128>
- Prado, M.R., Blandon, L.M., Vandenberghe, L.P., Rodrigues, C., Castro, G.R., Thomaz-Soccol, V., Soccol, C.R. (2015): Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology*, 6:1177. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01177>
- Sengun, I.Y., Karabiyikli, S. (2011): Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22:647–56. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.008>
- Waldherr, F.W., Doll, V.M., Meißner, D., Vogel, R.F. (2010): Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. *Food Microbiol.*, 27:672–678. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.013>
- Watson, D.C. (1993): Yeasts in distilled alcoholic-beverage production, in: *The Yeasts*. Elsevier, pp. 215–244. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-092543-1.50016-3>
- Zanirati, D.F., Abatemarco, M., de Sandes, S.H.C., Nicoli, J.R., Nunes, A.C., Neumann, E., Abatemarco Jr.M., de Cicco Sandes, S.H., Nicoli, J.R., Nunes, A.C., Neumann, E. (2015): Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe* 32:70–76. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.12.007>
- Zeynep, B., Guzel-Seydim, Z.B., Gökırmaklı, Ç., Greene, A.K. (2021): A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 113:42–53. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.041>

Development of a drink fermented by water kefir culture

Lippai L., Mednyánszky Zs., Kocsis T., Kiskó G.

Abstract

Water kefir is a poorly known fermented product, which is a fermented juice of the Japanese water crystals. The microbiological characteristics of water kefir are highly dependent on its origin, the conditions of preservation and fermentation. The aim of this work was to develop a flavoured water kefir drink by investigating its microbiological composition and organoleptic parameters. The composition of the microbiota was investigated using a MALDI -TOF MS apparatus following conventional cultural assays. During the sensory tests, 20 layman judges graded the unflavoured product from the first fermentation and the flavoured water kefir samples of the second fermentation. Both unflavoured and flavoured water kefir drinks were dominated by lactic acid bacteria, acetic acid bacteria and yeasts. The acetic acid and lactic acid bacteria species identified were *Acinobacter indonesiensis* and *Gluconobacter oxidans* subsp. *oxydans*, as well as *Lactobacillus ghanensis* and *Lactobacillus satsumensis*. In addition, 3 yeast species, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia fermentans* and *Wickerhamomyces anomalus* were identified. In the sensory tests, the judges favoured samples with a fruity flavour. The developed beverage could serve as an alternative for certain consumer groups (e.g. dairy intolerant, vegans), as well as a healthier substitute for carbonated soft drinks.

Keywords: water kefir, fermented drink

Kilin Ákos, Urbán Imola, Rezessyné Szabó Judit, Klosz Katalin,
Nguyen Duc Quang

Probiotikus *Lactobacillus* törzsek hidrogén-peroxid szintézisének tanulmányozása

A szerzők elérhetősége

Kilin Ákos | kutatási munkatárs | levelező szerző
kilin.akos@stud.uni-mate.hu

Urbán Imola | hallgató
imolaun@gmail.com

Rezessyné Szabó Judit | egyetemi magántanár
rezessyne.szabo.judit@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0003-3465-227X>

Klosz Katalin | egyetemi tanársegéd
klosz.katalin@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0001-8668-7509>

Nguyen Duc Quang | egyetemi tanár
nguyen.duc.quang@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0002-8548-4854>

A szerzők munkahelye

MATE ÉTTI Biomérnök és Erjedéssipari Tehnológia Tanszék
Munkahely címe: 1118 Budapest, Villányi út 29-45.



Összefoglalás

A kutatómunka során nyolc probiotikus *Lactobacillus* törzs szaporodási tulajdonsága, illetve azok hidrogén-peroxid termelésének nyomonkövetése került meghatározásra. Az ígéretesnek tűnő törzsek termelőképességének fokozása a környezeti tényezők (törzsfenntartáshoz alkalmazott tápközeg megválasztása, aerob szakaszban alkalmazandó hőmérséklet optimalizálása, levegőztetés, valamint a szénhidrát ellátottság) változtatásával történt. A *L. crispatus* LCR01 törzs bizonyult a legjobb H₂O₂ termelőnek függetlenül a termelő szakaszban alkalmazott szénhidrát minőségétől. A hidrogén-peroxid szintetizáló képesség alapján ezt a *L. helveticus* R-52, és a *L. fermentum* HA-179 törzsek követték. Az alkalmazott szubsztrátumok közül a maltóz bizonyult a legjobb szénhidrát forrásnak, tenyésztőközegként pedig a LAPTg. A környezeti paramétereket tekintve pedig a 37 °C és rázatott körülmény (250 perc⁻¹).

Bevezetés

Az evolúció során évmilliók alatt az állati és emberi szervezetben milliárdnyi mikroorganizmus telepedett meg. Az emberi mikrobiális közösséget (ökoszisztémát) a nagyszámban egymással kapcsolatban lévő és élő mikroorganizmus hálózat sűrű populációja adja, amely megtalálható az orrban, szájban, torokban, vastagbélben, bőrön, húgycsőben és a vaginában (Goldstein et al., 2015; Crucitti, 2017). A *Lactobacillus* nemzetség az egyik legjelentősebb és legnagyobb fajszámú nemzetsége a tejsavbaktériumoknak. Az élelmiszerek, valamint az emberi és állati szervezetek

Kulcsszavak: *Lactobacillus*, hidrogén-peroxid, optimalizálás

természetes, hasznos mikrobiótájának alkotói és ebből adódóan starter és védő kultúráként is alkalmazható. Bizonyított, hogy egyes fajok probiotikus tulajdonsággal is bírnak, ami jótékony hatást fejt ki a humán szervezetre. Ilyen többek között a koleszterinszint csökkentése, gyomor-bél mikrobiótáinak egészségre gyakorolt pozitív hatása a hasmenés kezelése, az allergia elleni rezisztencia kifejlesztése stb. (Crucitti, 2017). Számos *Lactobacillus* fajt alkalmaznak fermentálásra, ami egyedi ízt és aromát kölcsönöz az élelmiszereknek, továbbá tartósításkor ezek a tejsavbaktériumok olyan anyagokat szintetizálnak (alkohol, CO₂, szerves savak, antimikrobás anyagok stb.), ami a romlást okozó mikrobák, patogének növekedését

gátolja (Kaewnoppa et al., 2013, Kovachev, 2017). A szakirodalomban bőséges információ található a laktobacillusok sav és bakteriocin termeléséről, viszont szűkebb az ismeret a hidrogén-peroxid szintézisükről, noha oxigén jelenlétében a tejsavbaktériumok hidrogén-peroxidot is szintetizálhatnak a flavoprotein-oxidáz, ill. a nikotinamid-adenin-dinukleotid-peroxidáz aktivitásuk által, és mivel kataláz negatívak nem képesek lebontani azt (Zalán et al., 2005; Goldstein et al., 2015). A hidrogén-peroxid antimikrobás hatása jól ismert, ez a vegyület citotoxikus, mivel reaktív gyököket (hidroxil, szuperoxid) generál, melyek erősen oxidatívak. A hidroxil szabadgyökök képzése mellett a hidrogén-peroxid a nyálkahártya-szekrétumokban aktiválhatja a laktoperoxidáz-rendszert, mely hatására hipotiocianát-ionok keletkeznek, melyek a legjelentősebb kórokozó baktériumok, vírusok és gombák ellen is hatásosnak bizonyultak (Denev, 2006). Ezért a kutatómunka célja különböző *Lactobacillus* törzsek H_2O_2 szintézisének vizsgálata, amelynek aktualitása, hogy fontos élettani szerepe lehet mind azon testüregekben, ahol az oxigén jelenlétével és a potenciális patogének megtelepedésével számolhatunk.

Anyagok és módszerek

Alkalmazott mikroorganizmusok

A kutatómunka során nyolc probiotikus *Lactobacillus* törzs: *Lactobacillus crispatus* LCR01, *Lactobacillus helveticus* R-52, *Lactobacillus fermentum* HA-179, *Lactobacillus reuteri* HA188, *Lactobacillus salivarius* HA118, *Lactobacillus casei* 01, *Lactobacillus plantarum* 299V, *Lactobacillus acidophilus* La5 hidrogén-peroxid szintézis nyomónkövetése történt. A törzseket a Probiotal, a Lallemand Health Solutions és a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (NCAIM, Budapest) biztosította.

A baktériumok törzsfenntartása

A laktobacillusok tenyésztése 37 °C-on, 24 órás inkubációs idő mellett LAPTg (pepton 15 g/l, tripton 10 g/l, glükóz 10 g/l, élesztőkivonat 10 g/l, tween80 1 ml) vagy MRS (pepton 10 g/l, húskivonat 8 g/l, élesztőkivonat 4 g/l, glükóz 20 g/l, tween80 1 ml, K_2HPO_4 2 g/l, Na-acetát $\cdot 3H_2O$ 5 g/l, triammónium citrát 2 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g/l, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0,05 g/l) táplevesben történt. A fermentáció friss 24 órás kémcsőtenyészettel 1 v/v %-nyi mennyiséggel indult.

A laktobacillusok előszelekciója hidrogén-peroxid szintézis kvalitatív kimutatásával

Friss, 24 órás tenyészetek szélesztése különböző összetételű (LAPTg, MRS) agarral kiegészített szilárd tápközegre. A tápközegre peroxidáz enzim mellett,

kromogén reagensként 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) szolgált, így a zöldeskék elszíneződés detektálhatóvá tette a H_2O_2 termelést (Rabe & Hillier, 2002).

A hidrogén-peroxid termelés mennyiségi meghatározása

(Villegas & Gilliland, 2006; Zalán et al., 2005 nyomán)

A felszaporított *Lactobacillus* törzseket tartalmazó 40 ml tenyészlezből a sejtek összegyűjtése centrifugálással (10000 rpm, 4 °C, 10 perc) történt. Ezt követte a kinyert biomassza kétszeri átmosása 40-40 ml fiziológiás sóoldattal, majd a sejtek felszuszpendálása 40 ml vizsgálati közegben.

Az alkalmazott vizsgálati közegek: 0,5 M nátrium-foszfát puffer (pH=6,5) valamint 1(m/v)% szénhidrátot tartalmazó pufferolt közegek. A vizsgálatokba bevont szénhidrátok: glükóz, galaktóz, laktóz, maltóz és szacharóz.

Az előállított sejtuszpenziókat különböző környezeti paraméterek között tartva folyamatos mintavételezés mellett meghatározásra került a szintetizált hidrogén-peroxid mennyisége.

A H_2O_2 koncentráció meghatározása során használt peroxidáz enzim módszer lényege, hogy peroxidáz (POD) enzim katalizálja H_2O_2 -ről az elektronok átvitelét a kromogén 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) reagensre. A H_2O_2 mennyiséggel arányos abszorbancia érték 414 nm-en spektrofotométerrel határozható meg (Chin és Cortes, 1982). Az abszorbancia értékek és a hidrogén-peroxid mennyiségek közötti összefüggést az előzetesen felállított kalibrációs egyenes meredekségéből (1,4504) állapítható meg:

$$H_2O_2 \left[\frac{\mu g}{ml} \right] = \left[\frac{\text{Abszorbancia}_{[414 \text{ nm}]}}{1,4504} \right] * \text{hígítás}$$

Eredmények és értékelésük

Az előszelekció során egyértelműen kiderült, hogy a vizsgált törzsek hidrogén-peroxid termelését befolyásolta a törzsfenntartásra alkalmazott tápközeg összetétele. Megállapítható, hogy a LAPTg tápközeg sokkal előnyösebb a hidrogén-peroxid termelés szempontjából, mint az MRS tápközeg. Ennek magyarázata feltételezhetően az, hogy a LAPTg feleannyi glükózt tartalmaz, mint az MRS, ugyanakkor a szerves nitrogén források koncentrációja jelentősen nagyobb és szervesen sókat sem tartalmaz.

Az alkalmazott nyolc probiotikus *Lactobacillus* törzs hidrogén-peroxid kvalitatív kimutatása kromogén reagenst és peroxidáz enzimet tartalmazó LAPTg és MRS szilárd tápközegen történt. Az törzsek tenyésztése

48 órán át 37 °C-on anaerob körülmények között zajlott, majd levegővel való expozíció eredményeként kialakuló zöldes elszíneződés utalt a hidrogén-peroxid szintézisre. Az így kapott eredmény az **1. táblázatban** összefoglalva található.

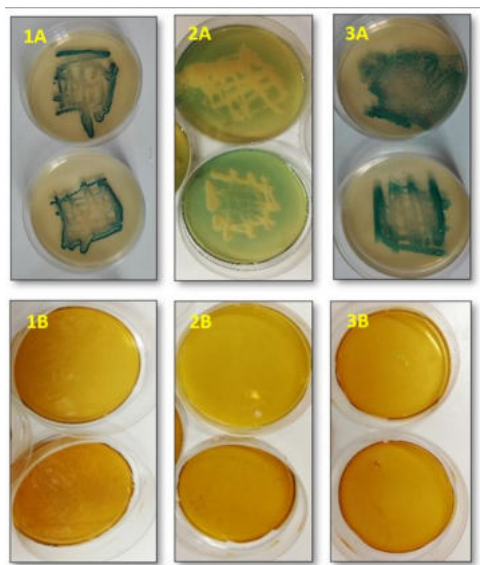
1. táblázat: Az alkalmazott *Lactobacillus* törzsek hidrogén-peroxid szintézisének kvalitatív kimutatása

<i>Lactobacillus</i> törzsek	Tápközeg	
	LAPTg	MRS
<i>L. casei</i> 01	+	+
<i>L. plantarum</i> 299V	+	-
<i>L. acidophilus</i> La5	-	-
<i>L. fermentum</i> HAI79	+	-
<i>L. helveticus</i> R52	+	-
<i>L. reuteri</i> HAI88	+	-
<i>L. salivarius</i> HAI18	-	-
<i>L. crispatus</i> LCR01	+	-

Jelmagyarázat: + kimutatható a hidrogén-peroxid termelés; - nem detektálható hidrogén-peroxid termelés

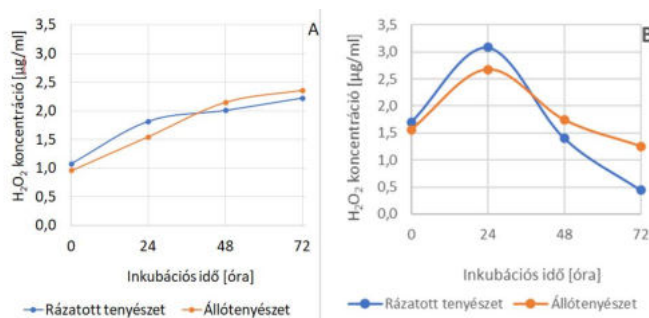
A legintenzívebb színváltozást adó hidrogén-peroxid termelő törzsnek (**1. ábra**) a *L. fermentum* HAI79, *L. helveticus* R52 és *L. crispatus* LCR01 mutatkoztak, ugyanakkor ezen törzsek esetében nem sikerült hidrogén-peroxid szintézist kimutatni MRS táptalajon. Az így kapott eredmények birtokában, a továbbiakban a LAPTg tápközegben előnevelt *Lactobacillus* törzsek H₂O₂ szintézisének részletes vizsgálatával folytatódott.

Az előszelekciónál a legjobbnak ítélt hidrogén-peroxid termelő törzs – a *Lactobacillus crispatus* LCR01 – alkalmazásával került a hidrogén-peroxid szintézis optimális körülményeinek meghatározására. A hidrogén-peroxid szintézis szempontjából kedvező hőmérséklet összehasonlítása 5 °C-on, amelyen e vegyület bomlása visszaszorítható, valamint a terápiás célt szem előtt



1. ábra: A kiválasztott *Lactobacillus* törzsek hidrogén-peroxid szintézisének kimutatása LAPTg (A) és MRS (B) tápközegeken (1. *L. fermentum* HAI79, 2. *L. helveticus* R52, 3. *L. crispatus* LCR01)

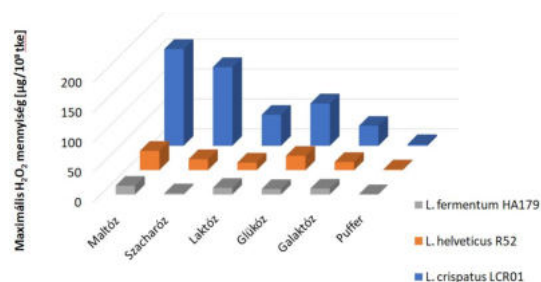
tartva 37 °C-on. Az oxigénellátás szükségessége álló és rázatott körülmények (250 perc⁻¹) alkalmazásával került felmérésre (**2. ábra**).



2. ábra: A *L. crispatus* LCR01 hidrogén-peroxid szintézise különböző környezeti feltételek mellett pH=6,5 nátrium-foszfát pufferben (rázatás fordulatszáma: 250 perc⁻¹)
A: 5 °C, B: 37 °C

Megállapítható, hogy 5 °C-on kapott eredmények még a 72 órás vizsgálati időtartamon belül is elmaradtak a 37 °C-on mért maximális értéktől, amely a vizsgálat 24. órájában tapasztalható. Továbbá megállapítható az is, hogy míg kezdetben a rázatás pozitív hatást gyakorolt a hidrogén-peroxid szintézisére, addig 48 órás inkubálás során már tapasztalható a hidrogén-peroxid lebomlást fokozó hatása. A fentiek alapján a további kísérletek 37 °C-on, rázatott körülmények (250 perc⁻¹) beállítása mellett folytatódtak.

A különböző szénhidrátok – glükóz, galaktóz, laktóz, maltóz és szacharóz – hatását vizsgálva a hidrogén-peroxid szintézisre megállapítható, hogy a hidrogén-peroxid termelő törzsek szénhidrátok jelenlétében nagyságrendekkel magasabb termelési szintet mutattak a Na-foszfát pufferben szintetizált hidrogén-peroxid mennyiségnél (**3. ábra**). A *L. crispatus* LCR01 törzs bizonyult a legjobb hidrogén-peroxid termelőnek függetlenül az alkalmazott szénhidrát minőségétől. Továbbá a maltóz bizonyult a legjobb hidrogén-peroxid szintézist támogató szénhidrát-forrásnak a szelektált törzseknel. A *L. crispatus* LCR01 által szintetizált mennyiségekhez – maltóz 162 µg/10⁸ tke, szacharóz 132 µg/10⁸ tke, laktóz 28 µg/10⁸ tke, glükóz 71 µg/10⁸ tke, galaktóz 18 µg/10⁸ tke és Na-foszfát puffer 3 µg/10⁸ tke jelenlétében – viszonyítva a *L. helveticus* R52 törzs által szintetizált H₂O₂ mennyiség tizennygy és negyvenegy



3. ábra: A vizsgált *Lactobacillus* törzsek által szintetizált maximális H₂O₂ mennyiségek különböző szénhidrátok jelenlétében (37 °C, 250 perc⁻¹)

százalék között változott. Az egyik legnagyobb eltérés a szacharóz esetén tapasztalható, hiszen csak 14%-a volt a *L. crispatus* LCR01 által termelt mennyiségnek. A *L. fermentum* HA179 törzs esetén még kisebb értékek tapasztalhatóak, ami szacharóz esetében csupán 1,4%-a, laktóz és galaktóz esetében 21 és 30%-a volt a *L. crispatus* LCR01 által szintetizált mennyiségeknek.

Következtetések, javaslatok

A *Lactobacillus crispatus* a női hüvely természetes lakója és az itt található glikogén és bomlás termékei (maltóz, glükóz) szolgálhatnak szubsztrátumként metabolizmusához. A *Lactobacillus helveticus* a szájüregben található, ahol a táplálékok elsődleges lebontási termékei szolgáltatnak szubsztrátumot e baktérium faj számára. A *Lactobacillus fermentum* a könnyen hozzáférhető szénhidrátokban szegény anaerob vastagbélben őshonos, talán ezzel magyarázható gyengébb hidrogén-peroxid szintetizáló képessége.

Összességében megállapítható, hogy a hatékony hidrogén-peroxid szintézist elsődlegesen a törzsek genetikai tulajdonságai határozzák meg, amelyekre hatást gyakorolhat az ökológiai környezet is. Ugyanakkor nagyon fontos tényező a szénhidrátellátottság is.

Gyakorlati alkalmazás szempontjából cél lehet a klór kiváltása hidrogén-peroxiddal mind az élelmiszer-feldolgozásban, mind a fertőtlenítésben.

Köszönetnyilvánítás

A kutatómunka a KFI_16-1-2017-0077 és EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005 projektek anyagi támogatásával készült.

Irodalomjegyzék

- Chin, H.S., Cortes, A., (1982): Determination of hydrogen peroxide: A comparison between the potentiometric titration method and an enzyme catalyzed procedure. Unpublished Draft. National Food Processors Assn., 1950 Sixth Street, Berkeley, CA 94710
- Crucitti, T. (2017): Eve's garden: myths, legends and secrets unmasked. *Research in Microbiology*, 168: 773-781. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.07.004>
- Denev, A.S.(2006): Role of lactobacilli in gastrointestinal ecosystem. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 12:63-114. <https://doi.org/10.1093/ajcn/33.11.2448>
- Goldstein, E.J.C., et al. (2015): *Lactobacillus* species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*, 60, (2):98-107. <https://doi.org/10.1093/cid/civ072>
- Kaewnoppara, S., Dangmanee, N., Kaewnoppara, N., Srichana, T., Chulasiri, M., Settharaksa, S. (2013): *In vitro* probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. *Anaerobe*, 22:6-13. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2013.04.009
- Kovachev, S. (2017): Defence factors of vaginal lactobacilli. *Crit Rev Microbiol.*, 44(1):31-39. <https://doi.org/10.1080/1040841x.2017.1306688>
- Rabe, L.K., Hillier, S.L. (2002). Optimization of media for detection of hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7):3260-3264. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.7.3260-3264.2003>
- Villegas, E., Gilliland, S.E. (2006): Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* I at 5 °C. *Journal of Food Science*, 63(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15857.x>
- Zalán, Zs. et al. (2005): Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technol. Biotechnol.*, 43(3):219-225.

Study of hydrogen peroxide synthesis of probiotic *Lactobacillus* strains

Kilin Á., Urbán I., Rezessyné Szabó J., Klosz K., Nguyen D.Q.

Abstract

During the research work, the reproductive properties of eight probiotic *Lactobacillus* strains were determined, and their of their hydrogen peroxide production was monitored. The productivity of promising strains was increased by changing the environmental factors (choice of nutrient medium used for strain maintenance, optimisation of the temperature used in the aerobic phase, aeration, and carbohydrate supply). The strain *L. crispatus* LCR01 proved to be the best H₂O₂ producer regardless of the quality of the carbohydrate used in the production stage. Based on the ability to synthesize hydrogen peroxide, this was followed by *L. helveticus* R-52 and *L. fermentum* HA-179 strains. Among the substrates used, maltose proved to be the best carbohydrate source, and LAPTg was the culture medium. In terms of environmental parameters, the condition is 37 °C and shaken (250 min⁻¹).

Keywords: *Lactobacillus*, hydrogen peroxide, optimisation

Sipiczki Gizella, Eszterbauer Edina, Nagy Edina Szandra, Kiss Zsuzsanna, Bujna Erika

Yarrowia törzsek pigmenttermelésének vizsgálata

A szerzők elérhetősége

Sipiczki Gizella | PhD-hallgató | levelező szerző
sipiczki.gizella@phd.uni-mate.hu

Eszterbauer Edina | hallgató
edina@eszterbauer.hu

Nagy Edina Szandra | egyetemi adjunktus
nagyedinaszandra@gmail.hu | <https://orcid.org/0000-0002-0527-1702>

Kiss Zsuzsanna | egyetemi adjunktus
kiss.zsuzsanna@uni-mate.hu

Bujna Erika | egyetemi docens
bujna.erika@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0002-5289-5235>

A szerzők munkahelye

MATE ÉTTI Biomérnök és Erjedéssipari Tehológia Tanszék
Munkahely címe: 1118 Budapest, Villányi út 29-45.



Összefoglalás

A *Y. lipolytica* élesztőgomba számos anyagcseretermék mellett képes színanyagok termelésére is, amelyek természetes eredetüknél fogva különböző iparágakban alkalmazhatók szintetikus pigmentek alternatívájaként. Kutatásaink során a *Y. lipolytica* mellett más *Yarrowia* fajokhoz tartozó izolátumokat is vizsgáltunk pigmenttermelés szempontjából, és tápközeg optimalizációs kísérleteket végeztünk a színanyag termelés fokozására. A legjobb pigmenttermelő törzsnek a *Y. lipolytica* t 6/3 bizonyult, a leghatékonyabb tápközeg pedig a tirozinon felül további aminosavakat (glicin, L-glutamin, L-aszparagin) is tartalmazott. A pH hatásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a semlegestől távolodva, akár savas, akár lúgos tartományban, a pigmenttermelés mértéke csökkent. A pH=7 kémhatású pufferelt tápközegben, a desztillált vízzel készíthetőhöz hasonló eredményeket kaptunk, s pigmenttermelés a fermentáció hetedik napján érte el a maximumát. A mangán jelentősen befolyásolja a barna színanyag termelődését, 5 mM alkalmazásával a pigmenttermelés közel ötszörösére emelkedett.

Kulcsszavak: *Yarrowia lipolytica*, pigmenttermelés, tápközeg optimalizálás

Bevezetés

A pigmentek minden élő anyagban megtalálhatók, vonzó színeket biztosítanak, és alapvető szerepet játszanak az organizmusok fejlődésében. Fellelhetőek levelekben, gyümölcsökben, zöldegekben és virágokban egyaránt, valamint a bőrben és a szemben is (Delgado-Vargas et al., 2010). Számos mikroorganizmus, például baktériumok, penészgombák és élesztők is képesek nagyszámú pigmentet

szintetizálni, s manapság egyre szélesebb körben terjed el alkalmazásuk a különféle iparágakban, ideértve az élelmiszeripart, a gyógyszeripart, a textilipart és a kozmetikai ipart (Kumar et al., 2015).

Az élelmiszeriparban számos mikroba eredetű pigment játszik szerepet az étel színezésében, mely kifejezetten fontos szerepet tölt be a táplálkozásunk során, hiszen jelzi az élelmiszer frissességét, minőségét, de utalhat akár a beltartalmi értékére is, ezért nagyban befolyásolja a piac alakulását és a fogyasztók döntéseit (Dufossé, 2006; Sen et al., 2019).

A mikroorganizmusok által termelt színyanyagok alkalmazása mind gazdasági, mind egészségügyi szempontokat tekintve is kedvezőbb, mint a szintetikus pigmenteké. A növényekből történő kinyeréshez képest is vannak előnyei, egyszerűen termelhetők, nem okoz problémát a nyersanyaghiány és az idényszerűség, továbbá a növényekből származó pigmentek instabilak, hőre és fényre érzékenyek, alacsony a vízdoldhatóságuk (Nigam és Luke, 2016). A színyanyagot termelő mikroorganizmusok nem toxikusak és nem patogének, így emberi fogyasztásra alkalmasak (Nigam és Luke, 2016).

A melaninok is a széles felhasználási potenciállal rendelkező színyanyagok közé tartoznak, amelyek védelmet nyújtanak a szervezetnek a káros környezeti hatásokkal – köztük a magas UV sugárzással – szemben, megkötik a szabadgyököket, antioxidáns hatásúak és a nehézfémek toxikus hatásaitól is képesek megvédeni a szervezetet (Hearing, 2005). Fenolos és/vagy indolos vegyületek oxidatív polimerizációja révén keletkeznek, negatívan töltött, hidrofób pigmentek, amelyek nagy molekulásúllyal rendelkeznek (Nosanchuk, 2015; El-Ahmady et al., 2017). Bioszintézis útjuk alapján a melaninok három csoportba sorolhatók: eumelaninok, feomelaninok és allomelaninok. Ez utóbbiak közé tartoznak a piomelaninok, mely termelésére a *Yarrowia lipolytica* élesztő is képes (Tahar et al., 2019). A piomelaninok szintézise tirozinnál homogentizinsav intermedieren keresztül történik (El-Ahmady et al., 2017; Tahar et al., 2019). Mindezek alapján kutatásaink során célul tűztük ki tirozin tartalmú tápközegekben különböző *Yarrowia* fajok pigment termelésének vizsgálatát és fokozását tápközeg optimálási kísérleteken keresztül.

Anyagok és módszerek

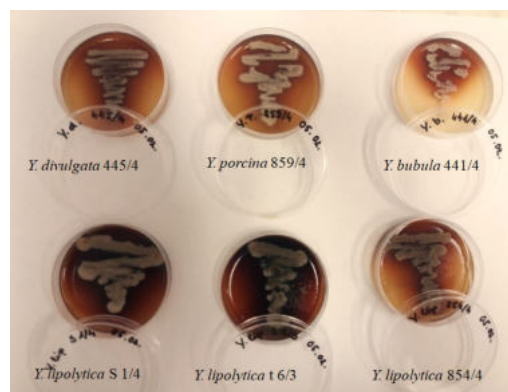
Kutató munkánk során a következő 6 *Yarrowia* nemzetségből származó törzset használtuk, melyet Nagy (2015) élelmiszerekből izolált: *Y. bubula* 441/4, *Y. divulgata* 445/4, *Y. porcina* 859/4, *Y. lipolytica* 854/4, *Y. lipolytica* s 1/4, *Y. lipolytica* t 6/3. A törzseket maláta tartalmú ferdeagaron tartottuk fent. A pigment fermentációhoz használt alap tápközeg összetétele: KH_2PO_4 (4 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,5 g/l), $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,106 g/l), melyet a kísérleti tervnek megfelelően egészítettünk ki tirozinnal, tejsavval és további aminosavakkal. A pigment termelés vizsgálata során 160–160 ml fermentációs tápközegot oltottunk be 5% inokulum tenyésztettel és 28 °C-on 130 rpm-en legalább 10 napon keresztül inkubáltuk. A fermentáció során meghatározott időközönként mintát vettünk. Megfelelő hígítást követően 600 nm-es hullámhosszon mértük a minták optikai denzitását a szaporodás követe

mért abszorbancia értékek meghatározása alapján végeztük Unicam Helios Alfa spektrofotométerrel. A tápközeg kémhatásának alakulását is nyomon követtük a fermentáció során. A pufferelt tápközegeknél a kívánt pH értéket (pH=5 – pH=8,0) Sørensen puffer segítségével állítottuk be.

Eredmények és értékelésük

Hat darab *Yarrowia* törzset screeneltünk pigment termelésre Carreira és Loureiro (1998) által *Y. lipolytica* elkülönítéséhez alkalmazott tirozin tartalmú tápagaron. Az agaron kinőtt telepek körül látható barna elszíneződés utalt a törzsek pigment termelő képességére, melyet a leoltást követően 1 hét múlva értékeltünk.

Mindegyik vizsgált törzs esetén megfigyelhető volt a barna színű elszíneződés (**1. ábra**), bár a különböző törzsek különböző mértékben termeltek pigmentet. A legnagyobb mértékű színváltozást a *Y. lipolytica* törzsek esetén tapasztaltuk, míg a barna szín megjelenése a *Y. bubula* esetén volt a legkevésbé intenzív. A megjelölt szín alapján a *Y. porcina* és *Y. divulgata* törzseknél hasonló mértékű pigment szintézisre következtítettünk. Eredményeink alapján a legjobb termelőnek a *Yarrowia lipolytica* t 6/3 törzs bizonyult. E törzs mellett, a pigment termelés optimalizására irányuló további vizsgálatainkat a szakirodalomban kevésbé tanulmányozott *Y. divulgata* és *Y. porcina* törzsekre is kiterjesztettük.



1. ábra: A *Yarrowia* törzsek pigment termelésre való screenelésének eredménye

Szubmerz, rázott lombikos fermentációk során végeztünk tápközeg optimálási kísérletet, melyhez a fermentációs tápközegot az **1. táblázatnak** megfelelően egészítettük ki. Ezek alapján kívántuk meghatározni, hogy a tirozin mellett egyéb aminosavakat is tartalmazó tápközeggel, illetve tejsav kiegészítéssel fokozható-e a pigment termelés a vizsgált törzsek esetén.

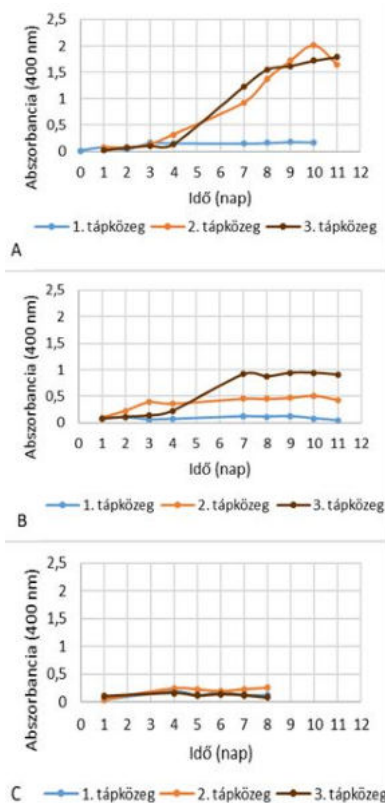
A legjobb pigment termelő törzs kiválasztása a 400 nm-en mért abszorbancia értékek alapján történt. A *Y.*

1. táblázat: A pigmenttermelés vizsgálatára készített tápközegek összetétele

	tirozin	glicin	L-glutamin	L-aszparagin	tejsav
1 tápközeg	0,27 g/l	-	-	-	-
2 tápközeg	0,27 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	-
3 tápközeg	0,27 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	5,46 g/l

lipolytica törzs 2,02-es értéket mutatott (**2/A ábra**) a fermentáció 10. napján, a *Y. porcina* és a *Y. divulgata* törzsek egyik tápközegben sem értek el 1,0-nál nagyobb abszorbancia értéket (**2/B és 2/C ábrák**). A három különböző tápközeg vizsgálata során a 2. tápközeg bizonyult a leghatékonyabbnak, mely a tirozin mellett glicint, L-glutamint és L-aszparagint is tartalmazott. A csak tirozin kiegészítést tartalmazó tápközeg egyik törzs esetében sem volt hatékony. A tejsav alkalmazása Joshi (2003) eredményei alapján pigmenttermelést fokozó hatással bírt, melyet a *Y. porcina* törzs esetében tapasztaltunk csak. E törzsnél a pigmenttermelés megduplázódott tejsav jelenlétében a fermentációt 7 napját követően, míg a vizsgált *Y. lipolytica* törzs esetében hasonló eredményeket kaptunk tejsav kiegészítés nélkül is.

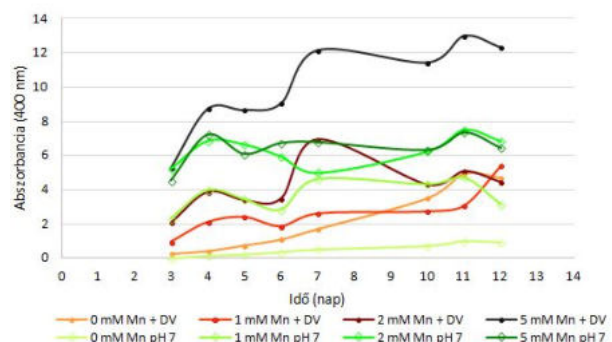
A pigmenttermelés további fokozását a szubmerz tenyészetben is legjobb termelőnek bizonyult *Y. lipolytica* t 6/3 törzs esetén végeztük el, melyhez az aminosavakkal kiegészített tápközéget alkalmaztunk.



2. ábra: Abszorbancia értékek alakulása különböző tápközegekben *Yarrowia* törzsekkel végzett pigmentfermentáció során (A: *Y. lipolytica* t 6/3, B: *Y. porcina* 859/4, C: *Y. divulgata* 445/4) (1. tápközeg: alap + tirozin 2. tápközeg: alap + tirozin + aminosavak, 3. tápközeg: 2. tápközeg + tejsav)

Vizsgáltuk a tápközeg kiindulási pH-jának hatását pH=5-8 tartományban mind a növekedésre, mind a pigment termelés alakulására. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a mikroba növekedését a pH nem befolyásolja jelentősen a vizsgált tartományban. A pigment termelés a pufferelt tápközegek közül a pH=7 értékűben volt a legjobb, ettől akár savas, akár lúgos irányba való eltérés, a pigmentszintézist hasonló mértékben csökkentette. A vízzel készített kontroll tápközegben a pufferelthez (pH=7) hasonlóan nagy abszorbancia értékeket mértünk, azonban a pigment-szintézis ennél a tápközegnél lassabban indult el. Míg az 5. napon közel 1,5-szer nagyobb az abszorbancia a pufferelt tápközegben, a 7. naptól kezdődően az értékek megegyeznek, és növekvő tendenciát mutatnak. Összességében egy 7 napos fermentáció során nem szükséges a pufferelt tápközeg alkalmazása.

Szakirodalmi adatok alapján (Carreira és Loureiro, 1998) a mangán jelenléte (1 mM) befolyásolja a *Y. lipolytica* pigment termelését, azonban a különböző koncentrációk hatását nem vizsgálták a képződött színanyag tekintetében. Erre kerestük a választ a következő kísérletben, mind desztillált vízzel készített, mind pufferelt (pH=7) tápközegben 0, 1, 2 és 5 mM koncentrációban alkalmazva a mangánt. Megállapítottuk, hogy a legnagyobb mértékű pigmenttermelés 5 mM mangán jelenlétében volt, mind a pufferelt, mind a vízzel készített tápközeg esetén (**3. ábra**). Mangán jelenléte nélkül mind a szaporodás, mind a pigmenttermelés később indult be és elhúzódott. A pufferelt tápközeg esetén a mangán koncentráció növelésével arányosan nőtt a színanyag mennyisége is, de kevésbé bizonyult hatékonynak a vízzel készített tápközeghez képest. A mangán koncentráció ötszörösére való növelésével, a mért abszorbancia értékek is kb. ötszörös értéket mutattak.



3. ábra: Mangán koncentráció hatásának vizsgálata a *Y. lipolytica* t 6/3 pigmenttermelésére vizes és pufferelt tápközegben

Következtetések, javaslatok

A *Yarrowia* nemzetség különböző törzseivel végzett pigmentfermentációk alapján megállapítottuk, hogy a

Y. lipolytica t 6/3 termeli legnagyobb mennyiségben a barna színanyagot. A tápközeg optimalizálás során vizsgált csak tirozin kiegészítést tartalmazó tápközeg egyik törzs esetében sem bizonyult hatékonynak, azonban további aminosavak alkalmazásával a pigment termelés fokozódott. A pufferelt tápközegek közül a pH=7-es beállítás volt a legeredményesebb, azonban vízzel készített tápközegben is 7 napos fermentációval azonos eredmények érhetők el. A mangán koncentráció hatásának vizsgálata során az 5 mM mangán kiegészítéssel, az 1 mM-os kontroll tápközeg abszorbancia értékéhez képest kb. ötszörös értéket sikerült elérni. A vizsgálat megerősítette továbbá, hogy szükségtelen a kiindulási tápközeg pufferelése, vízzel készített, 5 mM mangánt tartalmazó tápközegben közel kétszer akkora abszorbancia értékeket mértünk, mint a pufferelt (pH=7) közegben.

Összességében megállapítható, hogy a *Y. lipolytica* t 6/3 képes pigment előállítására, amely a különböző iparágakban alkalmazható, mint természetes eredetű színanyag. Mivel a mangán koncentrációjának változtatása nagy hatással van a barna színanyag szintézisére további vizsgálatok végzése javasolható kísérlettervezéssel. Faktorként a mangán mellett, a szintézisben fontos szerepet játszó tirozin koncentrációja, valamint ezek együttes hatásának a vizsgálata is eredményes lehet az optimalizációs folyamatok során. A *Yarrowia*-k által termelt pigment pontos meghatározását HPLC-MS analízis segítségével tervezzük elvégezni.

Irodalomjegyzék

- Carreira, A., Loureiro, V. (1998): A differential medium to detect *Yarrowia lipolytica* within 24 hours. *J. Food Mycol.* 1:3-12.
- Dufossé, L. (2006): Food grade pigments. *Food Technol.*

- Biotechnol.*, 44(3):313-321.
- El-Naggar, N.A., El-Ewasy, S. (2017): Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. *Scientific Reports*, 14(7):42129. <https://doi.org/10.1038/srep42129>
- Hearing, V.J. (2005): Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *J. Dermatol. Sci.*, 37(1):3-14. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2004.08.014>
- Joshi, V.K., Attri, D., Bala, A., Bhushan, S. (2003): Microbial pigments. *Ind. J. Biotechnol.*, 2:362-369.
- Kumar, A., Vishwakarma, H.S., Singh, J., Dwivedi, S., Kumar, M. (2015): Microbial pigments: production and their applications in various industries. *Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.*, 5(1):203-212.
- Nagy, E. (2015): Élelmiszeromlást okozó *Yarrowia* csoport biodiverzitása különböző élelmiszerekben. Doktori értekezés, Budapest
- Nigam, P.S., Luke, J.S. (2016): Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties. *Curr. Op. Food Sci.*, 7:93-100. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.004>
- Nosanchuk, J.D., Stark, R.E., Casadevall, A. (2015): Fungal melanin: what do we know about structure? *Front. Microbiol.*, 6:1463. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01463>
- Sen, T., Barrow, C.J., Deshmukh, S.K. (2019): Microbial pigments in the food industry—Challenges and the way forward. *Front. Nutr.*, 6:1-36. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00007>
- Tahar, B.I., Kus-Liškiewicz, M., Lara, Y., Javaux, E., Fickers, P. (2019): Characterization of a nontoxic pyomelanin pigment produced by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Progress*, e2912. <https://doi.org/10.1002/btpr.2912>

Study of pigment production of *Yarrowia* strains

Sipiczki G., Eszterbauer E., Nagy E.Sz., Kiss Zs., Bujna E

Abstract

In addition to many metabolic products, the yeast *Y. lipolytica* is also capable of producing dyes, which, due to their natural origin, can be used in various industries as an alternative to synthetic pigments. In the course of our research, in addition to *Y. lipolytica*, isolates belonging to other *Yarrowia* species were examined in terms of pigment production, and nutrient optimization experiments were carried out to increase pigment production. *Y. lipolytica* t 6/3 proved to be the best pigment-producing strain, and the most effective medium contained additional amino acids (glycine, L- glutamine, L- asparagine) in addition to tyrosine. During the examination of the effect of pH, we found that moving away from neutral, whether in an acidic or alkaline range, the level of pigment production decreased. In the pH=7 buffered medium, similar results were obtained to those prepared with distilled water, and pigment production reached its maximum on the seventh day of fermentation. Manganese significantly affects the production of the brown pigment, with the application of 5 mM, the pigment production increased almost fivefold.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*, pigment production, nutrient medium optimisation

