



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

**BIOAKTÍV PEPTIDEK ELŐÁLLÍTÁSA TEJFEHÉRJE-KONCENTRÁTUMBÓL
MEMBRÁNSZŰRÉS, ENZIMES HIDROLÍZIS ÉS MIKROBIÁLIS FERMENTÁCIÓ
KOMBINÁLT ALKALMAZÁSÁVAL**

DOI: 10.54598/002360

Csighy Attila

Budapest

2022

A doktori iskola

megnevezése: Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,
Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Simonné Dr. Sarkadi Livia
Egyetemi tanár, DSc
MATE, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet,
Élelmiszerkémiai és Táplálkozástudományi Tanszék

Témavezetők: Dr. Koris András
Egyetemi docens, PhD
MATE, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Élelmiszeripari Műveletek és Folyamattervezés Tanszék

Dr. Arijit Nath
Posztdoktori kutató munkatárs, PhD
MATE, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Élelmiszeripari Műveletek és Folyamattervezés Tanszék

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

.....

A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

1. BEVEZETÉS.....	1
Célkitűzések.....	2
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1 Funkcionális élelmiszerek	5
2.2 Tej történelmi háttere.....	8
2.3 Tej összetétele.....	9
2.3.1 Víz.....	11
2.3.2 Szénhidrátok	12
2.3.3 Fehérjék.....	12
2.3.3.1 Kazeinek	14
2.3.3.2 Tejsavó.....	15
2.3.4 Zsírok	17
2.3.5 Ásványi anyagok a tejben	19
2.3.6 Vitaminok a tejben	21
2.4 Tej fogyasztás élettani hatása	22
2.5 Allergenitás, élelmiszer allergia	22
2.5.1 Élelmiszer allergének általános jellemzése.....	23
2.5.2 Tej allergén fehérjéi	24
2.6 Bioaktív peptidek.....	27
2.6.1 Bioaktív peptidek előállítása - Enzimes hidrolízis.....	30
2.6.2 Bioaktív peptidek előállítása - Fermentáció	31
2.7 Membránszűrés.....	32
2.7.1 Membránszűrés történelme	32
2.7.2 A membránszűrés alapfogalmai.....	33
2.7.3 Membránszűrés jellemző mutatói	36
2.7.4 Nanoszűrés modellezése	38
2.8 Statikus keverés alapfogalmai	41

2.9	Membránműveletek tejipari alkalmazás	43
2.10	Enzimes hidrolízis.....	45
2.10.1	Enzimkinetika	45
2.10.2	Proteáz enzimek.....	46
2.10.3	Tripszin enzim	47
3.	ANYAG ÉS MÓDSZER.....	50
3.1	Alkalmazott UHT (Ultra High Temperature) tej.....	50
3.2	Membránszűrő berendezés	50
3.3	Tejfehérje sűrítmény enzimes hidrolízise.....	55
3.4	Mikrobiális fermentáció	57
3.5	Analitikai vizsgálatok	58
3.5.1	SDS-poliakrilamid gélelektroforézis.....	58
3.5.2	Antioxidáns tartalom meghatározása	60
3.5.2.1	Összes antioxidáns kapacitás meghatározása FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma - Vasredukálóképesség) módszerrel	61
3.5.2.2	Gyökfogó kapacitás mérése DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl - Gyökfogó kapacitás) módszer alkalmazásával.....	61
3.5.3	Az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) gátlás aktivitásának vizsgálata.....	62
3.5.4	Enzimaktivitás vizsgálata.....	63
3.5.5	Mikrobiológiai aktivitás vizsgálata.....	64
3.5.6	Fehérje koncentráció meghatározása	65
3.5.7	Öntött gélen elválasztott fehérjék immunblottja.....	65
3.6	Statisztikai vizsgálatok.....	66
3.6.1	Fluxus és fajlagos energiaszükséglet statisztikai vizsgálata.....	66
3.6.2	Fehérjetartalom vizsgálata.....	67
3.6.3	Antioxidáns-tartalom vizsgálata.....	67
3.6.4	ACE-gátlás vizsgálata	67
3.6.5	Mikrobiológiai gátlás vizsgálata	68
3.6.6	2 ^P -n teljes faktoros kísérletterv	68
4.	EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSŰK.....	70
4.1	Tejfehérjesűrítmény előállítása membránszűrés alkalmazásával	70
4.2	Permeátum fluxus 2 ^P -n kísérletterv alkalmazásával.....	80

4.3	Fehérjekoncentráció meghatározása.....	88
4.4	Antioxidánskapacitás meghatározása	90
4.5	A tej-sűrítvények fehérje-eloszlásában bekövetkező változások nyomonkövetése a különböző koncentrációban használt tripszines hidrolízis hatására	94
4.6	Angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) gátlás aktivitásának vizsgálata	97
4.7	Mikrobiológiai aktivitás vizsgálata enzimes hidrolízissel előállított minták esetében 103	
5.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	108
6.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK – TÉZISEK.....	110
7.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	114
8.	SUMMARY	116
	MELLÉKLETEK.....	119
	M1. Irodalomjegyzék.....	119
	M2. Géplista – Berendezések.....	133
	M3. Post Hoc teszt - Táblázatok.....	134
	M4. Alkalmazott vegyszerek.....	146
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	148

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

a, n	Oldott anyag tulajdonságaitól és hőmérsékletétől függő állandók [-]
A	A membrán szűrőfelülete [m ²]
AU	Arbitrary unit – enzimaktivitás (Fluoreszcencia intenzitás) [AU/(s•μg)]
C _b	Az oldott anyag koncentrációja a főtömegben [g/dm ³]
C _P	A koncentráció a permeátumban [g/L] vagy [mol/m ³]
C _R	A koncentráció a retentátumban [g/L] vagy [mol/m ³]
DH	Hidrolízis fok – (Degree of hydrolysis) [-]
E	Enzim [-]
E _t	Teljes enzimkoncentráció [-]
ES	Intermedier komplex [-]
E _s	Fajlagos energiafogyasztás [kwh/m ³]
d	Kapilláris membrán átmerője [m]
GMP	Glikomakropeptid
IC ₅₀	Inhibitor-koncentráció [mg/mL]
J	Szűrletfluxus [L/m ² h]
J _P	Permeátum szűrletfluxusa [L/m ² h]
k	Az anyagátadási együttható [m/s]
K _s	Michaelis Menten állandó [-]
LAB	Tejsavbaktériumok – Lactic acid bacteria [-]
MPC	Tejfehérje koncentrátum /Milk protein concentrate
NF	Nanoszűrés
N1	Alacsony enzimkoncentráció [g/L]
N2	Közepes enzimkoncentráció [g/L]
N3	Magas enzimkoncentráció [g/L]
OD	Optikai denzitás [-]
P	Termék [-]
p ₀	Szűrlet nyomása [Pa, bar]

p_{BE}	A sűrítmény nyomása a modulba való belépéskor [Pa, bar]
p_{KI}	A sűrítmény nyomása a modulból való kilépéskor [Pa, bar]
R	A visszatartás [%]
RFR	Recirkulációs térfogatáram [L/h]
R_G	Gélréteg ellenállása [1/m]
R_H	Határréteg ellenállása [1/m]
R_M	Membrán ellenállása [1/m]
R_P	Polarizációs réteg ellenállása [1/m]
S	Szubsztrát [-]
t	A szűrés ideje [h]
TEK	Telepképző egység [TEK/mL]
TMP	Transzmembrán-nyomáskülönbség [Pa, bar]
v_{Max}	Adott enzimkoncentráció esetén elérhető maximális reakciósebesség [-]
VCR	Térfogatra nézett besűrítési arány [-]
V_F	A kiindulási elegy térfogata [L]
V_P	A permeátum térfogata [L]
WPC	Savófehérje koncentrátum/ Whey Protein Concentrate [-]
WPI	Savófehérje izolátum/ Whey Protein Isolates [-]
V_R	Retentátum térfogata [L]
$\Delta\pi$	Ozmotikus nyomáskülönbség [Pa]
π_b	Membrán belső falánál mért nyomás [Pa]
π_p	Szűrletben mért nyomás [Pa]
η	Dinamikai viszkozitás [Pa·s]

1. BEVEZETÉS

A 21. századi társadalomban, az élelmiszeripar számos jelentős változáson esett át. Az ipari, gyártási technológiák fejlődésével egyidejűleg az élelmiszeripari termékek is változtak. Az élelmiszerek igazodva a növekvő fogyasztói társadalomhoz, többféle formában jelentek meg. Korunkban a táplálkozás, az élelmiszerfogyasztás már nem csak a szükségletek kielégítését jelenti, illetve a cél már túlmutat a szervezetünk működéséhez szükséges alapvető energia biztosításán. A 21. századi fogyasztó egyre nagyobb figyelmet fordít a tudatos és egészséges táplálkozásra. Bizonyított, hogy a helytelen táplálkozás hozzájárul bizonyos betegségek kialakulásához. Egészséges táplálkozással hosszabb és egészségesebb életet élhetünk.

Jelen korunkban nem csak a helytelen táplálkozás növelheti bizonyos betegségek kialakulásának esélyét. A 21. században jelentősen megnőtt az embereket érő stresszhatás mértéke. A felgyorsult életből és a dinamikus életvitelből hosszútávon számos negatív következmény származtatható. Az életvitelből, életmódból származó stressz következményeként inszomnia és depresszió alakulhat ki. A depresszió hosszútávú hatása számos metabolikus zavart idéz elő a szervezetben. Ilyen metabolikus zavarok közé tartozik az elhízás, magas vérnyomás és a szív és érrendszeri megbetegedések. A metabolikus zavarok hosszútávú jelenléte növeli a szabad gyökök kialakulásának a kockázatát, melyek számos krónikus betegség kialakulásában jelentős szerepet játszanak (daganatos betegségekben, immunrendszerrel kapcsolatos elváltozásokban). A szabad gyökök – antioxidáns egyensúly eltolódása kockázatot rejt magában. Az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) az endothelsejtek által termelt, a vérnyomás szabályozásában részt vevő enzim, mely enzim jelenlétében az angiotenzin I angiotenzin II-vé alakul, melynek hatására nő a vérnyomás. Stresszhatás következtében az angiotenzin II fokozza a szabadgyökök termelődését.

Az említett metabolikus stresszhatás következtében kialakuló megbetegedések, eltolódott szabad gyökök – antioxidáns egyensúly helyreállítható, illetve számos, a szabadgyökök által indukált megbetegedés csökkenthető bioaktív peptidok fogyasztásával. Ezen bioaktív peptidok különböző élelmiszerek enzimes hidrolízise, fermentációja révén is előállíthatók. A bioaktív peptidok egyik legmeghatározóbb forrása a tej. Ezen peptidok előállításánál figyelembe kell venni az egyes allergiát okozó anyagok jelenlétét.

Ugyanis, ha valaki allergiás az adott élelmiszere, akkor a belőle előállított bioaktív peptid is kiválthatja a kóros immunválaszt, melynek elkerülése létfontosságú.

Korunk népbetegsége az allergia, melynek számos típusa és fajtája ismert. Az allergia az immunrendszer túlérzékenységi reakciója egy adott komponensre. Az Amerikai Gasztróenterológiai Egyesület szerint a leggyakoribb élelmiszerintoleranciákat a búza és egyéb, glutént tartalmazó gabonafélék, a tehéntej és a belőle készült tejtermékek, valamint a kukorica alapú termékek okozzák. A tej allergia, a tejben lévő fehérjékre adott ellenreakció. A fehérjék allergénitása nagymértékben függ a fehérjék összetételéből és azok felépítéséből.

A bioaktív peptidek előállításának egyik kulcs technológiája a hidrolízis. A savas vagy enzimes hidrolízis hatására, a fehérjeláncok specifikusan, az adott enzimre jellemzően felhasadnak, melynek hatására térbeli konformációjuk megváltozik, molekulatömegük csökken. A fehérjék molekulatömegének csökkenésével, csökken az adott fehérje allergénitása. A hipoallergén peptidek előállítása egy új piaci szegmenst nyithat meg a fogyasztók számára.

Kutató munkám során célom olyan bioaktív peptidek előállítása (membránszűrés, enzimes hidrolízis és fermentáció újdonságnak számító, komplex alkalmazásával), melyek növelt antioxidáns tartalmukkal, angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) gátló hatással, antimikrobiális és hipoallergén tulajdonsággal rendelkeznek. Az élelmiszeripar és a biotechnológia terén is számos lehetőség kínálkozik a bioaktív peptidek alkalmazására. Az így előállított bioaktív peptidek természetes adalékanyagként növelhetik más termékek funkcionális tulajdonságait, alkalmazásukkal bizonyos megbetegedések kockázatának esélye csökkenthető.

Célkitűzések

A 21. században a változó életvitelből adódóan több, az egészségre is ártalmas kihívással kell megbirkóznia az embereknek, melyek közül a leggyakoribb probléma a stressz. A stresszhatás növekvő mértéke számos metabolikus szindrómának a kialakulásához vezet. A metabolikus szindróma olyan biokémiai, fiziológiai és klinikai rendellenességek csoportja, amely számos egészségügyi kockázatot, mint például szív- és érrendszeri betegségek, elhízás, cukorbetegség kialakulásának esélyét növelik.

Kutatási munkám során célom bioaktív peptidek előállítása tehéntejből membránszűrés, enzimes hidrolízis és fermentáció (tejsavas) kombinált alkalmazásával. A tripszinnel végzett enzimes hidrolízis során a fehérjék immunreaktivitásának csökkenését várom, mely a hidrolízis során bekövetkező molekulatömeg csökkenése következtében lép fel.

Az előállított bioaktív peptidek magas vérnyomás kialakulása elleni, antimikrobás, antioxidáns, immunrendszer-erősítő és fájdalomcsillapító hatással rendelkeznek.

A bioaktív peptidek előállításánál, az alábbi célokat tűztem ki a kutatásom során:

- Szakirodalmi források áttekintése a bioaktív peptidek előállításának technológiájáról, illetve a szervezetre gyakorolt pozitív élettani hatásairól.
- Az optimális membránszűrési paraméterek meghatározása laboratóriumi körülmények között 2^p -n kísérletterv szerint az elérhető legnagyobb fluxus érték és energetikai hatékonyság, mint független változók vizsgálata szempontjából.
- Statisztikai próbák elvégzése SPSS 25.0 programmal, továbbá az egyes analitikai vizsgálatok során kapott eredmények összehasonlítása Tukey-féle Post Hoc teszt alkalmazásával. A Post Hoc teszt során vizsgálom továbbá az egyes csoportok közötti szignifikáns kapcsolatok meglétét.
- A különböző enzimkoncentrációk beállításokon végzett hidrolízis hatásának vizsgálata a tejfehérjék allergénitására.
- A membránszűrés során előállított nanoszűrt tejfehérjesűrítmény enzimes hidrolízisét követően a peptidek (dipeptid, tripeptid, oligopeptid) eloszlásában bekövetkező változások nyomonkövetése.
- Az előállított tejfehérjesűrítmény és hidrolizátum fermentációja *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* és *Streptococcus thermophilus* starter kultúrával glükóz hozzáadása mellett.
- Analitikai vizsgálatok elvégzése
 - A vizsgálatok alapanyagaként szolgáló UHT tej, tejfehérjesűrítmény és különböző enzimkoncentráción kezelt fermentált minták antioxidáns tartalmának vizsgálata FRAP és DPPH módszerrel.
 - Nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) vizsgálat elvégzése a fehérjeeloszlásban bekövetkező változások nyomonkövetése érdekében.
 - A vizsgálatok alapanyagaként szolgáló UHT tej, tejfehérjesűrítmény és különböző enzimkoncentráción kezelt fermentált minták esetében a fehérjekoncentráció meghatározása Bradford módszerrel.
 - Öntött gélen elválasztott fehérjék immunblottjának elvégzése és az előállított fehérjék allergénitálásának vizsgálata.

- Angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) gátló hatásának vizsgálata spektrofotometriás módszerrel az előállított bioaktív peptidek esetében, továbbá a K_S és V_{MAX} értékek meghatározása nem lineáris regresszió alkalmazásával.
- Az UHT tej, illetve az enzimkezelt minták antimikrobás hatásának vizsgálata *Bacillus cereus* és *Staphylococcus aureus* törzsekkel szemben.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Funkcionális élelmiszerek

A 20. század elején, az élelmiszerek tápanyag összetétele és azok egészségre gyakorolt hatása merőben eltérő trendet mutatott a jelen korhoz képest. A korai időkben az élelmiszereknek, azok tápanyag összetételének a célja az alapvető anyagcsere és működési mechanizmusok kielégítése volt. A II. Világháború után, az egyes országokban tapasztalt gazdasági növekedés hatására az élelmiszerfogyasztás hedonista módon változott. Az akkori táplálkozástudományi szakértők felismerték, hogy bizonyos élelmiszerek túlzott mértékű fogyasztása számos egészségügyi problémához vezet.

A 21. századra jelentős változáson ment keresztül az élelmiszeripar és a táplálkozástudomány. Előtérbe kerültek az olyan élelmiszerek iránti igények, melyek már nemcsak a tápanyagbevitelt helyezték prioritásba. A mai korban egyre fontosabbá vált az egészség megőrzése, illetve az olyan összetevővel rendelkező élelmiszerek fogyasztása, melyek bizonyos betegségek kialakulásának a kockázatát csökkentik. Számos kutatás foglalkozik a mai napig is az egészségmegőrző vagy azt támogató élelmiszerek más néven „Funkcionális élelmiszerek” területének a fejlesztésével. Jó példa volt erre a sajtfeldolgozás során keletkező savó, mely sokáig hulladékként kezelés nélkül került elvezetésre. A 21. század elején felfedezték a savóban rejlő lehetőségeket, ugyanis számos bioaktív peptidet és fehérjét tartalmaz, mely egészségvédő hatásuk révén nagymértékben hozzájárulnak az új élelmiszerek kifejlesztéséhez [NAIK, 2012].

A betegségek megelőzése, az egészség fenntartása sokkal fontosabbá vált ,mint a már kialakult betegség kezelése. Továbbá azzal hogy a betegségek megelőzése vált a fő irányvonallá, csökkenthetőek az egészségügyi költségek [DOYON és LABRECQUE, 2008].

A funkcionális élelmiszereknek számos definíciója került meghatározásra az évek alatt. Minden fogalmi meghatározás egyezik abban, hogy a funkcionális élelmiszerek olyan termékek, melyekben egy vagy több olyan összetevő/komponens található, melyek esetében tudományosan bizonyított, hogy az egészségre pozitív hatást fejtenek ki, illetve csökkentik bizonyos betegségek kialakulásának kockázatát [DUDEJA és GUPTA, 2017].

Mivel ezeket az összetevőket természetes alapanyagokból kell előállítani, ebből adódóan számos kutatási tevékenység folyik a funkcionális összetevők új generációjának azonosítása, előállítása és hatékonyságának felismerése érdekében. Ez a kutatási tevékenység biológiai technológiákat alkalmazhat módosított vagy új összetevők előállítására [GUINÉ et al., 2020]. A funkcionális élelmiszereknek három további feltételnek is meg kell felelniük, melyek a következők: a funkcionális élelmiszer dúsított összetevője természetes alapanyagból származzon, legyen fogyasztható a napi étrend részeként vagy annak kiegészítéseként, illetve fogyasztásuk pozitív hatást fejtsen ki egy bizonyos biológiai funkcióra [RINCÓN-LEÓN, 2003].

Funkcionális élelmiszerré ötféleképpen válhat egy élelmiszer, melynek egyik módja az, ha csökkentjük vagy eltávolítjuk azon komponenst, melyről ismert vagy bizonyított hogy fogyasztásakor káros hatást vált ki (allergén fehérje). Funkcionális élelmiszereknek hívhatjuk azon élelmiszerek csoportját is, melyben egy már meglévő komponensnek a mennyiségét növeljük (ásványi anyagok, vitaminok). Szintén funkcionálissá tehető az adott termék, ha egy olyan komponenst adnak hozzá, amely alapvetően nem tartozik az összetevők közé (makrotápanyag, mikrotápanyag), azonban jótékony hatása bizonyított. Helyettesíthető továbbá azon összetevő, melynek napi bevitele túlzottan magas egy olyan komponensre melynek az ajánlott napi bevitele nem éri el az előírt értéket. Az ötödik mód esetében, valamely összetevő biológiai hozzáférhetőségének vagy stabilitásának növelése a cél, az adott termék betegségkockázati potenciáljának csökkentésének az érdekében. Az alábbi pontokra további példák láthatóak az 1. táblázatban [HENRY, 2010].

1. táblázat: Funkcionális élelmiszerek csoportjai [HENRY, 2010]

Kategória	Élelmiszeripari példa
Alap élelmiszer	Sárgarépa (β -karotin tartalom)
Feldolgozott élelmiszer	Magas zab és korpa tartalmú gabonafélék
Hozzáadott értékkel rendelkező élelmiszerek	Kálciummal dúsított gyümölcslevek
Módosított élelmiszerek	Paradicsom növelt likopin tartalommal

MATHUR és SHAHANI 1979-es kutatói munkája során bebizonyította, hogy a csecsemők számára készült tápszerek, melyek tehéntejből készülnek jelentős mértékben befolyásolják a csecsemők szervi funkciót. Az újszülöttek fejletlen szervi funkciókkal születnek, ami különösen igaz a vesékre és a belekre, így a szervezetük az első három hónapban különleges táplálkozási igényeket követel. A tehéntejjel való táplálás túlzottan megváltoztatja a csecsemőkben a bél fiziológiáját, melynek negatív hatása ellensúlyozható. Abban az esetben ha a csecsemőtápszerekbe bizonyos mennyiségű savót kevernek (60 : 40 – kazein : savó), az így előállított termék már megegyező összetételűvé válik az anyatejhez.

A csecsemő tápszerek kifejlesztésénél kiemelten fontos hogy az előállított termék minél jobban hasonlítson az anyatej összetételéhez. A mai tápszerek alapját a tehéntej képezi, melynek összetétele, a benne lévő fehérjéknek az aránya eltér az anyatejétől. Míg az anyatej fehérjetartalma 9 – 11 g/L, a tápszerek esetében ez általában 15 g/L közötti értéket képvisel. A csecsemők esetében a túlzott fehérjebevitel metabolikus zavarok kialakulásához vezethet, többek között növeli a tejfehérje allergia kialakulásának a kockázatát. Hogy, a fehérje allergia mértékét csökkentésük, az előállításra kerülő tápszerek esetében megváltoztatják a fehérjék arányát. A tehéntejből előállított tápszerek β -laktoglobulin tartalma 3 – 4 g/L, míg az anyatejben ez a fehérje nincs jelen. Csecsemők esetében a β -laktoglobulint tartják a tejfehérje allergia kialakulásának fő okaként, ezért ezen komponens csökkentése kiemelten fontos. Az allergénmentes csecsemő tápszerek kifejlesztése során az α -laktalbumin arányát növelik, míg a β -laktoglobulint csökkentik. WAZED és FRAID 2019-es kutatása során a csecsemő tápszerek kombinált hő (HTST) és nagynyomású (HPP) kezelésének köszönhetően sikerült egy növelt α -laktalbumin tartalmú terméket előállítani a kontroll mintákhoz képest. A kontroll minta esetében a 20%-os α -laktalbumin tartalom, a 40 °C-os hőkezelés, 600 MPa nagynyomású kezelés hatására közel 70%-ra nőtt. Kutatásuk során megállapítható hogy a kombinált kezelés előnyösen változtatja meg az allergén fehérje összetételét, mely alapját képezi a jövőbeni allergénmentes tápszerek előállításának [WAZED és FRAID 2019].

Savófehérje koncentrátum és savófehérje izolátumok alkalmazása a joghurt gyártásnál is megfigyelhető, ugyanis alkalmazásukkal javul a termék textúrája, növelve a termék viszkozitását és stabilitását. Emellett a savófehérje koncentrátumok és savófehérje izolátumok alkalmazásával a joghurt állaga krémesebb és lágyabb lesz [KRÓLCZYK et al., 2016].

A probiotikus joghurtok funkcionális tulajdonságai a hagyományos joghurtokéhoz képest magasabb, továbbá étrendkiegészítőként is fogyaszthatóak. A probiotikus kultúrával történő fermentáció hatására, a terméknek nő az eltarthatósági ideje, illetve javulnak az érzékszervi tulajdonságai. A fermentáció további előnye, hogy a probiotikus törzsek hatására (*L. bulgaricus*, *S. thermophilus*) csökken a koleszterinszint, javul az ásványi anyagok felszívódása és csökken a rákos megbetegedések kialakulásának a kockázata [YERLIKAYA, 2014].

2.2 Tej történelmi háttere

Az utolsó jégkorszak/eljegesedési időszak után, az éghajlati körülmények változásával lehetővé vált a mezőgazdasági termelés elterjedése, mellyel együtt az állattenyésztés és állattartás is egyre szélesebb körben terjedt el. Az állattartás eleinte, leginkább az állandó húsellátás célját szolgálta, ez volt az elsődleges szempont a korai időkben.

Megközelítőleg a bronzkor elején történt változást nevezi a kor „másodlagos termékforradalomként”, melyben az állattartás már nem csak húsellátást részesítette előnyben, hanem már előtérbe került a tej, gyapjú és vonóerő szerepe. A tejfogyasztás térhódításával egyidejűleg a táplálkozási szokások is jelentős változáson mentek keresztül. Őseink esetében is akik a Kárpát-Medencében letelepedtek már megfigyelhető volt a tej fogyasztás.

Az ókori Görögországban és Rómában például a savót gyógyászatban is elterjedten alkalmazták, számos erre specializálódott intézmény épült ahová a gyógyulni vágyó ókori görögök és rómaiak is jártak különféle kezelésekre. Azonban a savó mint gyógyászati módszer elterjedésének gátat szabott, a savó gyorsütemű romlása [HOMONNAY és KONCZ, 2005].

A történelem során az egyik legkorábban és egyben legszélesebb körben elterjedt élelemforrás a tej és tejtermékek voltak. A tej történelme rendkívül szerteágazó, számos nép és népcsoportban volt jelent a tej.

A táplálkozás kultúrában jelentős szerepet képviseltek a tej és tejtermékek, számos írásos emlék maradt fenn már a korai időkből a különféle állatok tejének jótékony hatással bíró fogyasztásáról. A tej és tejtermékek termelésének jelentős része az Európai Unióban (163 millió tonna) és Indiában zajlik (200 millió tonna).

Általánosságban elmondható, hogy a tejfogyasztás 85 %-át a tehéntej teszi ki, ez az arány leginkább az elmúlt évszázadok során alakult ki. Az ipari tejtermelés és az abból előállított számos tejtermék jelentős mértékben tehéntejből kerül feldolgozásra, előállításra [SURÁNYI, 2015].

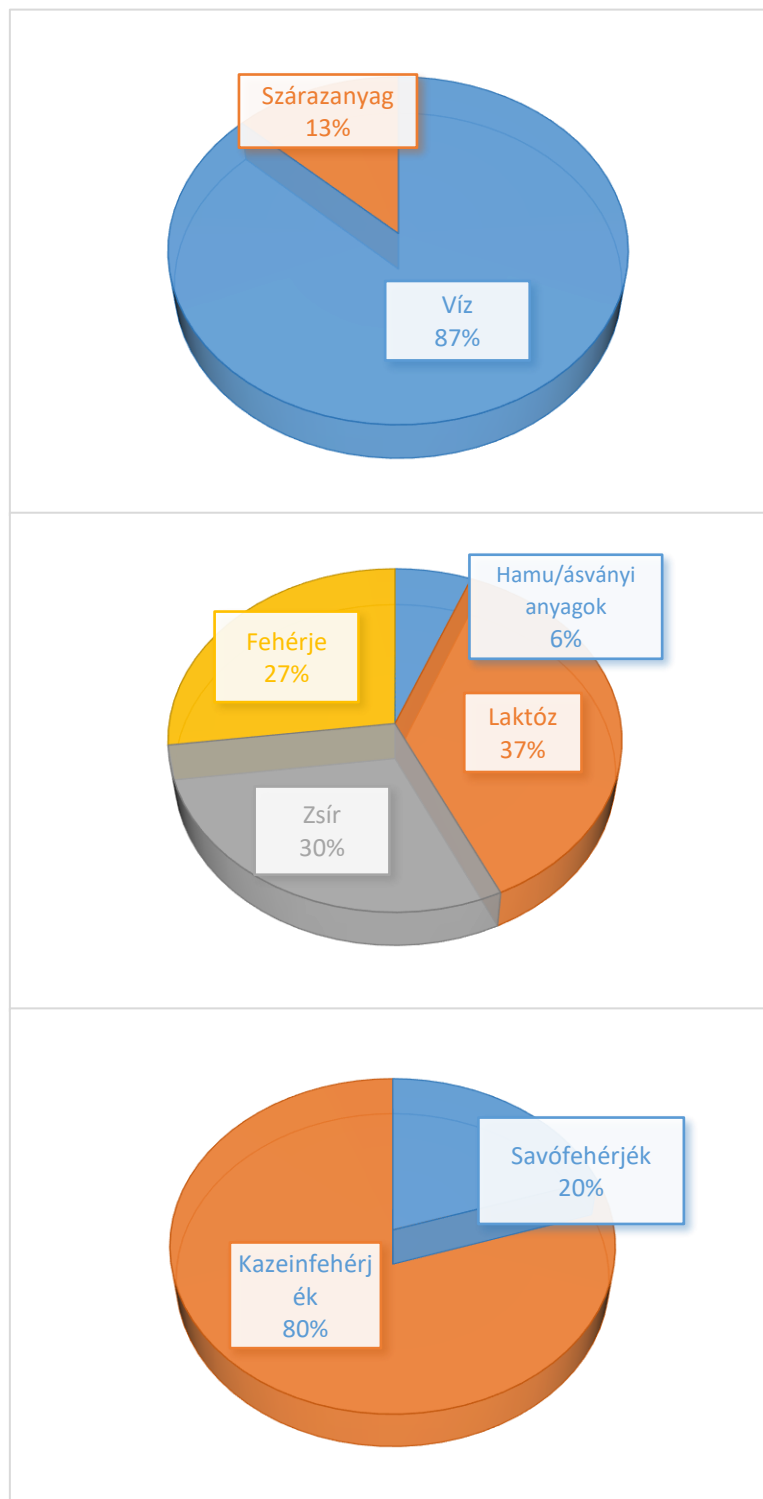
2.3 Tej összetétele

Doktori munkám során tehéntejjel dolgoztam. Az alábbi fejezetben a tej összetételét, illetve az egyes összetevők mennyiségét és arányát, továbbá ezen komponensek jelentőségét mutatom be. Általánosan, a mindennapi életben tejen csak a tehéntejet értjük. Tejtípustól függően az egyes komponensek mennyisége változhat. A tej kedvező arányban tartalmazza a különböző bioaktív komponenseket, fehérjéket, szénhidrátokat, zsírokat és különféle vitaminokat, illetve ásványi anyagokat. A tejben ezen összetevők aránya kis mértékben ugyan, de változhat. A különféle háziállatok tejének az összetételét a 2. táblázat, a tej összetételét az 1. ábra mutatja be [ANTAL, 2013].

Az állati eredetű élelmiszerek fogyasztása kiemelten fontos, mivel ezen termékcsoportokban találhatóak meg az emberi szervezet számára nélkülözhetetlen esszenciális aminosavak és egyéb más összetevők [JENNESS, 1988].

2. táblázat: Különböző állatok tejének összetétele [%] [BIRÓ, 2014]

Állatfaj	Tejzsír [%]	Fehérje [%]	Tejcukor [%]	Hamu [%]	Szárazanyag [%]
Tehén	3,9	3,5	4,7	0,7	12,8
Bivaly	8,0	4,2	4,9	0,8	17,8
Kecske	3,9	3,6	4,7	0,8	13,0
Juh	6,9	6,0	4,9	0,9	18,7
Kanca	1,2	2,0	5,8	0,4	9,4
Koca	5,6	6,3	4,2	1,1	17,1
Majom	3,9	2,1	5,9	0,3	12,2
Anyatej	3,7	1,8	6,8	0,3	12,6



1. ábra: A tej összetétele, víz - szárazanyag tartalom (A), bioaktív komponensek (B) és kazein - savófehérjék megoszlása alapján (C) [ANTAL, 2013]

A tej összetételét, az egyes komponensek szerint több csoportra oszthatjuk fel. Ahogyan az 1-es ábrán (A) látható, a tej 87 %-a víz, 13 %-a szárazanyag, ezen belül a tej összetételét feloszthatjuk a benne található bioaktív komponensek szerint (B), mely esetben a fehérjék, laktóz, zsír és hamu aránya 27, - 37, - 30,- és 6%. A fehérjéket további két nagyobb csoportra oszthatjuk fel (C), melynek jelentős részét, mintegy 80%-át kazeinek (α -, β -, γ - és κ -frakciók) és 20%-át savófehérjék (α -laktalbuminok, β -laktoglobulinok, immunglobulinok) alkotják. A tejben található oldott anyagok összetételének %-os értékei szárazanyag tartalomra vonatkoztatva kerültek bemutatásra.

2.3.1 Víz

A tej esetében attól függően hogy melyik állatfajtól származik, a tej víztartalma 70-90% közötti értékre tehető. Ezt a vízmennyiséget a tejmirigy szekréciós sejtjei által szintetizált laktózmennyiség szabályozza.

A tejtermékekben a víz különféle módokon képes kötődni, a víz kötési módjai közül megkülönböztetünk, mechanikai, kémiai és fiziko-kémiai kötési formát. Mechanikailag kötött víz esetében, a víz kapilláris nedvességként vagy egyszerűen nedvesítési vízként van jelen. Ezek közül a leggyengébb kötési forma a nedvesítési víz, ahol a vízmolekulák adhéziós kötéssel kapcsolódnak. A kémiai kötés az egyik legerősebb kötési forma, ugyanis ebben az esetben víz a hidratált anyaghoz fővegyértékkel vagy mellévegyértékkel kapcsolódik.

A fiziko-kémiai kötött víz fordul elő leggyakrabban a három kötési forma közül. Ebben az esetben a víz mennyisége a körülmények változásától függően változhatnak, mely szerint a víz, a szárazanyaghoz ozmózis vagy pedig adhéziós kötéssel kapcsolódhat.

Az élelmiszeripari technológiákban általában elegendő, ha szabad és a kötött víz mennyiségét ismerjük. A tejtermékeknek a víztartalmát, a vízaktivitással fejezik ki, mely adott hőmérsékleten mért egyensúlyi relatív páratartalom része.

A vízaktivitás értéke 0 és 1 közötti érték lehet. A vízaktivitás értéke annál kisebb minél nagyobb a kötött víz aránya az adott élelmiszerben [CSAPÓ és CSAPÓNÉ, 2002].

2.3.2 Szénhidrátok

A tej szénhidrát-tartalma a legtöbb élelmiszerhez képest elenyészően kicsinek számít, ugyanis a tej szénhidrát-tartalma az összes energiának mindösszesen csak a 30%-át teszi ki.

A tejcukor (laktóz) lebontását a laktáz enzim végzi, melynek megfelelő aktivitása esetén kedvező hatást fejt ki a gyomor és bélrendszerre. A tejfogyasztás térhódítása szoros kapcsolatban állt a laktóz emészthetőségével, ugyanis a laktáz enzim hiányában, a szervezet nem képes lebontani a laktózt, melynek hatására zavar támad az emésztési folyamatban. A tejcukornak és a laktáz enzimnek rendkívül fontos szerepe van csecsemőkorban, ugyanis segítségével alakul ki a bélrendszer megfelelő mikroflórája, a megtelepedő tejsavbaktériumoknak köszönhetően. SLAVIN és CARLSON (2014)-es kutatása alapján látható, hogy a napi kalóriabevitel 55 – 60 %-át különféle szénhidrátoknak javasolt alkotnia. A tej fő szénhidrátforrása a laktóz, egy D-galaktóz és egy D-glükóz molekulából épül fel mely rendelkezik egy béta-galaktozid 1,4-kötéssel (amelyet a béta-galaktozidáz hidrolizál), ezért ez egy 4-D-glükopiranozil-béta-D-galaktopiranoz. A tejcukor lebomlása során keletkező Galaktóz számos kutatás alapján jótékony hatást fejt ki az agyszövet fejlődésére. A laktóz koncentrációja a tejben 4,6-5%, mely érték csak minimálisan változik például az ellés után [CSAPÓ és CSAPÓNÉ, 2002; COELHO et al., 2015; CHIURAZZI et al., 2021].

A laktóz édesítő hatása sokkal kisebb mint a glükózé, ha a szacharóz édesítő hatását tekintjük 100%-nak akkor a laktózé mindösszesen 27-39% közötti. Tejsavbaktériumok a laktózt szubsztrátként használják fel a fermentáció során, melynek fontos szerepe van az erjesztett termékek előállításában, mint például a joghurtban vagy a különféle sajtokban. A termelt tejsav mennyisége számos tényezőtől függ: a tejsavbaktérium törzsek fajtájától, szubsztrát mennyiségétől, illetve a fermentáció környezeti paramétereitől (hőmérséklet, pH) [MOURAD et al., 2014].

2.3.3 Fehérjék

A tejfehérjék két nagy frakcióra bonthatóak, kazeinekre és savófehérjékre melyeket a következő alfejezetekben – 2.3.3.1, 2.3.3.2 mutatok be. Összetételük és tulajdonságaik alapján különbözőek, azonban kiemelt szerepük van táplálkozás-élettani szempontból a bennük található aminosavak lévén. A fehérjék az élőszővetek építőkövei. A tehéntej átlagos fehérjetartalma 3,4 – 3,5 %, míg a tej valódi fehérjetartalmát, az összes fehérjetartalom és a tej nem-fehérje nitrogén (NPN) különbségéből kapjuk meg, ez az érték átlagosan 3,45 %.

A tej összes nitrogéntartalmának az 5 %-a, nem-fehérje alapú nitrogén, mint például a karbamid, kreatinin és a szabad aminosavak.

A tej nem-fehérje nitrogén, vagy más néven Non-protein Nitrogen (NPN) tartalma, viszonylag tág határok között mozoghat a tejben, ami átlagosan 0,015 - 0,05 % között változik. Ez a viszonylag tág határ, a tej karbamid tartalmának köszönhető, ugyanis a tej karbamid szintje nagymértékben függ a vér karbamid szintjétől.

A tejfehérjék tartalmazzák az emberi szervezet számára nélkülözhetetlen aminosavakat és olyan esszenciális komponenseket, melyeket szervezetünk nem képes önmagában szintetizálni. Ilyen esszenciális aminosavak közé tartozik a lizin, leucin, valin, treonin és metionin. Mennyiségük az egyes tejtípusok között minimális eltérést mutat. A tehéntejben az esszenciális aminosavak közül a lizin és a leucin ($108 \pm 2,30$ mg/g) van jelen a legnagyobb mennyiségben, majd ezt követi a tevetej melyben ($96 \pm 2,20$ mg/g) az aminosav mennyisége. A tejfehérjék összetétele hasonló a tojásfehérjék összetételével, kivéve a metionin és a cisztein mennyiségét, amely lényegesen alacsonyabb [CSAPÓ és CSAPÓNÉ, 2002; RAFIQ et al., 2015].

A tejben található fehérjéket több szempont szerint is lehet kategorizálni, ilyen szempontok az adott fehérje biológiai aktivitása, illetve kémiai és fizikai tulajdonsága/karakterisztikája. A tejfehérjék modern nevezéktanát a 3. táblázat mutatja be.

3. táblázat: Tejfehérjék és azok koncentrációja a tejben (%) [CSAPÓ és CSAPÓNÉ, 2002]

Fehérjefrakció	Variánsok	Százalék a tejfehérjében		Százalék a kazeinben, illetve savófehérjében	
		átlag (%)	szélsőértékek (%)	átlag (%)	szélsőértékek (%)
Kazein		80,4	76–86	100	
α_s -kazein	A, B, C, D	43,5	35–63	54,2	48–60
κ -kazein	A, B	10,7	8–15	13,3	7–21
β -kazein	A1, A2, A3, B, Bz, (B1 ₂), C, D, E	24,2	19–35	30,1	26–40
γ -kazein	A1, A2, A3, B	2,0	1–3	2,5	2–4
Savófehérje		19,7	14–24	100	
Szérumalbumin		0,9	0,5–1,3	4,6	2–8
β -laktoglobulin	A, B, C, D, Dr	9,6	7–14	48,7	44–59
α -laktalbumin	A, B, C	3,7	2–5	18,8	17–22
Globulinok	IgG, IgM, IgA	2,2	1–4	11,2	8–17
Proteáz-pepton	4 frakció	3,3	2–6	16,8	10–19

2.3.3.1 Kazeinek

Ahogy az a táblázatban bemutatott adatokból is látszik, a kazeinek a legnagyobb mennyiségben jelenlévő fehérjecsoport a tejben, aránya mintegy 80 %. Az egyes kazein frakciókat (α_{s1} , α_{s2} , β és κ) különböző molekulatömeg, aminosav-összetétel, foszfortartalom és izo-elektromos pont jellemzi. A kazeinek az egymással való keresztkötések révén, micellákat, aggregátumokat képeznek, melynek aránya a micellán belül állandó értéket képvisel, rendre α_{s1} - 37, α_{s2} - 37, β - 13, κ - 13%. A micellák szerkezetüket tekintve, egy központi hidrofób és egy külső hidrofil részből állnak, mely biztosítja a fehérjék kalcium megkötő képességét. A kazein fehérjék hidratált, negyedleges szerkezettel rendelkeznek, melynek a felhasadása/lebontása különféle proteázok hatására jelentősen csökkenti az adott kazein frakció allergénhatását [CSAPÓ és CSAPÓNÉ, 2002].

Egyre több olyan tanulmány készül, amelyek a tehéntejből származó fehérjék vagy peptidok anyagcserére gyakorolt hatásait értékelik/vizsgálják. Ezen tanulmányok és kutatások fókuszpontjában a fehérjék állnak, melyek képesek a testsúly kontroll fenntartásában a jóllakottság érzésének fokozásával. Ennek a tulajdonságának köszönhetően mérsékelhetőek az

elhízásból adódó negatív egészségügyi hatások. A tejfehérjék az izomfehérje-szintézisek stimulálása révén növelik a váz és az izomzat tömegét. A tejfehérjékből származó peptidek aktív szerepet töltenek be a szervezet vérnyomásának a szabályozásában, az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) termelésének a gátlásával. Az ACE katalizálja az angiotenzin I átalakulását angiotenzin II-vé, melynek hatására az erek összeszűkülnek és növelik a vérnyomást [MCGREGOR és POPPITT, 2013].

A tejfehérjefrakciókat élelmiszeripari technológiáktól, illetve felhasználásuktól függően különböző termékek előállítására használják, azokból különféle fehérje koncentrátumokat állítanak elő. Ilyen koncentrátumok közé tartoznak a tejfehérje koncentrátumok (MPC – Milk Protein Concentrate) és a savófehérje koncentrátumok (WPC – Whey Protein Concentrate). Az MPC, ultraszűrt (UF) főlözött tejből kerül előállításra. Az MPC-ben a tejfehérje natív kazein és tejsavó formájában van jelen, olyan arányban, mint a tejben.

2.3.3.2 Tejsavó

Savónak nevezzük, azt a folyadékot, amelyet az alvadék szilárd fázisától választanak el, színe zöldessárga árnyalatú, semleges illatú, íze enyhén savanykás. Fontos megjegyezni, hogy a sajtgyártás fajtájától függően kétféle savót is megkülönböztetünk egymástól. A sajtgyártás során édes vagy savanyú savó keletkezik. A savanyú vagy édes savónak a kialakulása a sajtgyártás jellegétől függ, pontosabban attól hogy a savó alvadéktól való elválasztása milyen pH értéken történik. Édes tejsavó leginkább a kemény és félkemény sajtok készítésekor keletkeznek, ellenben a savanyú savó akkor keletkezik mikor túró, kazein vagy friss sajt kerül előállításra [SZAKÁLY, 2001].

A 4. táblázatban látható az édes és savanyú tejsavó összetétele illetve komponenseinek az aránya.

4. Táblázat: Tejsavó összetevői (%) [GÁSPÁR, 2016]

Összetevők	Édes savó	Savanyú savó
Összes szárazanyag [%]	5,4-6,35	5,6-6,7
Tejcukor (laktóz) [%]	4,1-5,0	3,8-4,6
Összes fehérje [%]	0,8-1,0	0,8-1,0
Savófehérjék [%]	0,6-0,7	0,6-0,7
Tejzsír [%]	0,2	0,2
Ásványi anyagok [%]	0,5-0,6	0,50-0,85
Tejsav [%]	nyomokban, max. 0,1	0,8-ig
pH	5,6-6,5	4,35-5,1
Vezetőképesség [mS/cm]	4,7-6,4	8,4

A mellékelt táblázat adataiból jól látszik, hogy a tejsavó összetételének a jelentős részét a tejcukor (laktóz) teszi ki. Laktóz mellett, nyomokban tejzsírt és ásványi anyagokat is tartalmaz, továbbá a savó jelentős vitamin tartalommal rendelkezik. Az édes és savanyú savó összetétele hasonló, megközelítőleg ugyanannyi fehérjét és laktózt tartalmaznak, azonban pH értékük és vezetőképességük eltérő.

Míg az édes savó esetében a pH érték 6 körül mozog, a savanyú savó esetében ez az érték maximum 5,1 lehet. Azonban a savanyú savó vezetőképessége megközelítőleg kétszerese az édes savóénak. A tejsavó számos biológiailag aktív fehérjét és peptidet tartalmaz, melyeknek az egészségre gyakorolt pozitív hatása már számos kutatásban bizonyítást nyert. Az alábbi élettani hatások nyertek bizonyítást számos klinikai vizsgálat és kutatás során: rákellenes hatás, antimikrobiális hatás, fokozott inzulin termelés, vér koleszterin szintjének a szabályozása, illetve memória javító hatás [GÁSPÁR, 2016; PARK és NAM 2015; MOHANTY et al., 2016].

A tehéntej fehérjetartalmának 20 %-át a tejsavófehérjék alkotják. A savófehérje főleg β -laktoglobulint (50 %) és α -laktalbumint tartalmaz, a maradék pedig marhaszérum-albumin, immunglobulinok és proteáz-peptonok csoportja. A savófehérjék legnagyobb mennyiségben a sajt-, túró-, és a kazein előállítás melléktermékeként keletkeznek, melyet az élelmiszeripar számos más termék előállításához felhasznál mint alapanyagot. Ilyen termékek a különféle tejsavóporok, tejsavó koncentrátumok (WPC – Whey Protein Concentrate) és savófehérje izolátumok (WPI – Whey Protein Isolates).

A savó frakció elválasztása után, a savót ultraszűrés és szárítás alkalmazása mellett sűrítik, melynek következtében a végtermék 25-80 %-os savófehérje tartalommal rendelkezik majd [HUFFMAN és HARPER, 1999; KILARA és VAGHELA, 2018].

A magas hőmérsékleten végzett kezelés hatására, a Maillard reakció következtében a tejben lévő fehérjék mérete és térszerkezete is megváltozik. A tejben lévő fehérjék térszerkezetének magas hőmérsékleten történő változását számos kutatás bizonyította, ilyen például RELKIN és MULVIHILL, (1996)-os munkája melyben a tejsavó fehérjék szerkezetét vizsgálták. Megállapítást nyert, hogy amennyiben a hőmérsékletet 80 °C fölé emeljük, a savófehérjék terciér szerkezete felbomlik/felhasad [PENFIELD és CAMPBELL, 1990; RELKIN, és MULVIHILL, 1996]. Gélelektroforézissel (SDS-PAGE) végzett vizsgálatok során szintén megfigyelhető a tejsavó fehérjék (α -laktalbumin, β -laktoglobulin) 80 °C fölötti denaturációja, mely vizsgálat alapján az is látható hogy az α -laktalbumin denaturációja gyorsabb mint a β -laktoglobuliné. A tejsavófehérjék hőérzékenységét elősegíti hogy a köztük lévő diszulfid híd kötések gyengének tekinthetők, könnyen felhasadnak magas hőmérséklet hatására [LEE és HONG, 2003].

A tejsavófehérjék azon csoportja, melyek rendelkeznek a tiolokra jellemző szulfhidrilcsoporttal (R - SH) képesek más fehérjékhez kovalens kötéssel kapcsolódni, ebből adódóan a szarvasmarha szérum albumin és β -laktoglobulin, valamint a kazeinek a hőkezelés hatására összekapcsolódhatnak. Azonban az α -laktalbumin nem tartalmaz -SH csoportot, ennek következtében csak β -laktoglobulin jelenlétében képes micella komplexek kialakítására [DALGLEISH, 1990; SAWYER, 1969; MORR, és HA, 1993].

2.3.4 Zsírok

A tej zsírtartalma képezi az energiatartalom 48%-át. A kecske- és tehéntejben alacsony az emberi anyagcseréhez szükséges többszörösen telítetlen zsírsavtartalom. A tejben lévő zsír emulzió formájában van jelen. A tej zsírtartalmának koncentrációja jelentősen eltérhet a faj, illetve az állat által fogyasztott takarmány összetételéből adódóan. A telítetlen zsírsavak legalább egy kettős kötést tartalmaznak. Megkülönböztetünk cisz és transz-zsírsavakat.

Táplálékunkban a legtöbb telítetlen zsírsav cisz formában van jelen, míg a transz-zsírsavak koncentrációja kisebb. A tej homogenizálása során a zsírgömbök száma növekszik, és átmérőjük jelentősen csökken (kevesebb, mint 1 mikron). Ezért az aktív felület körülbelül 20-szoros mértékben növekszik.

A homogenizálás megakadályozza a zsírcseppek újbóli összeolvadását (tartós tejben) és elősegíti a zsírok könnyebb emésztését. A tejszír fontos szerepet játszik az étrendben is, energiabevitel alapján 9 kcal / g lipid értékű [MOURAD et al. 2014].

A tejszír nélkülözhetetlen vitaminokat biztosít a test számára, ilyen például az A és D vitamin. Az A-vitamin nélkülözhetetlen az epitélium (hámszövet) szempontjából, ezért fontos szerepet játszik a szaporodásban, a látásban, míg a D-vitamin elengedhetetlen a normál csontszerkezet fenntartásához és az immunrendszer működéséhez. A lipidek magas energiatartalma mellett fontos számotartani a telített zsírsavak és a koleszterin mennyiségét, melyek túlzott mértékű fogyasztása számos szív- és érrendszeri megbetegedés okozója lehet. A zsír nagyon fontos érzékszervi szerepet tölt be az ízlelés során; krémszerű textúrát ad, sima és bársonyos érzetet kelt, másrészt sok íz a zsírral társul. Az egyszerű lipidek főleg trigliceridekből (98%), kis mennyiségekben szteroidokból és cerebrozidokból állnak. A gliceridek (semleges lipidek) trigliceridekből (98%), digliceridekből és monogliceridekből állnak. Gravimetrikusan a glicerid-zsírsavak teszik ki a zsír csaknem 90%-át. A zsírsavak eredete kettős: a 4-12 szénatomos zsírsavakat az emlőmirigy szintetizálja vér prekursorokból, a 18 és nagyobb szénatomos zsírsavak közvetlenül gyűjtődnek a vérplazmában, és a 14-16 szénatomos származékokat a tőgy de novo szintéziséből vagy a véráramba töltött anyagból nyerik. Az összetett lipidek komplexek, fő alkotóelemük a foszfor és/vagy nitrogén.

Az összetett lipidek közül a legfontosabbak a foszfolipidek, amelyek a zsírnak 1% -át teszik ki (0,3–0,5 g/l), emellett a zsírgömbök és az emulziós stabilizátorok alkotóeleme. Hidrofil és lipofil tulajdonságai lehetővé teszik számukra hidak kialakítását a hidrofób és a hidrofil fázisok között. Három fő foszfolipid csoportot különíthetünk el: lecitin, cefalin és szfingomielin. A foszfolipideket alkotó zsírsavak körülbelül 85% -a hosszú láncú zsírsavakból áll. Egyéb, kisebb mennyiségben jelen lévő komplex lipidek a gangliozidok, glikolipidek és glikoszfingolipidek. A tejszír összetétele (5. táblázat) nagyban függ a fajtól és annak táplálkozási szokásaitól. A zsír a tejben kisméretű emulgeált zsírgolyócskák formájában van jelen. Vízen szuszpendálva, a zsír trigliceridekből és zsírsavakból áll, melyek gömb alakúak, átmérőjük változó [MOURAD et al., 2014; STENDER et al., 1995].

5. táblázat: A tehéntej lipid összetétele és lokalizációja g/100g zsírra vonatkoztatva [CSAPÓ és CSAPÓNÉ, 2002]

Lipid összetétel	Arány	Elhelyezkedés
Trigliceridek	96 – 99	zsírgömbök
Digliceridek	0,3-1,60	zsírgömbök
Monogliceridek	0,002-0,10	zsírgömbök
Foszfogliceridek	0,2-1,00	zsírgömb membrán és szérum
Cerebrozidok	0,01-0,07	zsírgömb membrán
Szterinek	0,2-0,40	zsírgömbök és szérum
Szabadzsírsavak	0,1-0,40	zsírgömb membrán és szérum
Szénhidrátok	nyomokban	zsírgömb membrán

2.3.5 Ásványi anyagok a tejben

A tejben található makro és mikro elemek kiegyensúlyozott összetételük és könnyű felszívódásuk következtében rendkívül fontos szerepet töltenek be táplálkozás egészségügyi szempontból. A leggyakrabban előforduló makro és mikro elemek mennyiségét a 6. táblázat foglalja össze. Az ásványi anyagok mennyisége számos tényezőtől függ, melyek a következők: laktáció szakasza, az állat fajtájától (szarvasmarha, teve, kecske, juh), egyediségétől, a talaj és a takarmány sótartalmától. A tejben található makro elemek közül, a Ca és a P kiemelten fontos az újszülöttek megfelelő fejlődéséhez, csontszerkezetük kialakításához. Ezen makro elemek mennyisége változó. A Ca legnagyobb mennyiségben a juhtejben (195 – 200 mg/100g), majd a kecsketejben (132 mg/100g) található. P esetében, a kecsketejben 181 mg/100g, míg a juhtejben 136 – 140 mg/100g található [Barłowska et al., 2011].

6. táblázat: Makro és mikro elemek mennyisége a tejben [BIRÓ, 2014]

Különböző elemek mennyisége a tejben			
Mikro elemek (mg/liter)		Makro elemek (g/liter)	
vas	0,06 - 1	kálium	1,0 - 2,0
mangán	0,01 - 0,28	nátrium	0,3 - 0,7
cink	1,50 - 7,0	kálcium	0,9 - 1,4
kobalt	0,0001 - 0,002	klór	0,8 - 1,4
réz	0,01 - 0,70	foszfor	0,7 - 1,2
jód	0,005 - 0,40	kén	0,2 - 0,4
fluor	0,01 - 0,35	magnézium	0,05 - 0,24

Jól látható hogy a tejben található makro és mikro elemek mennyisége rendkívül összetett, mégis legnagyobb mennyiségben cinket és káliumot tartalmaz.

Az elemek jellegüktől függően különböző módon oszlanak el a tej vizes és micellás fázisaiban. A makroelemek K, Na és Cl ionok lényegében vizes fázisban vannak, míg a Ca, P és Mg kazein micellákhoz kötődik [GAUCHERON, 2011].

A nátriumnak és a káliumnak körülbelül 5-6-a % fehérjéhez kapcsolódva van jelen, kálcium és a foszfor részben kolloidális formában, illetve nagyobb részt kötött formában fordul elő. A tejelválasztás zavarai már nagyon hamar megjelennek az ásványi anyagok összetételében, ugyanis a Ca-tartalom esetében csökkenés figyelhető meg, mely hatással van az oltós alvasztás folyamatára [BIRÓ, 2014].

Az ásványi anyagok szerkezeti, biokémiai és táplálkozási tulajdonságainak köszönhetően, az ember mentális és fizikai egészsége hosszútávon megőrizhető, általuk biztosított az emberi szervezet, és metabolizmus megfelelő működése. Továbbá számos biológiai reakció katalizátoraként vesznek részt az emberi szervezetben, mint például az izmok összehúzódása, az idegimpulzusok továbbítása, illetve tápanyagok táplálékból történő felszívódása [VAHČIĆ et al., 2010)].

2.3.6 Vitaminok a tejben

A tejben az általunk ismert vitaminok jelentős része megtalálható (7. táblázat), azonban ezen vitaminok koncentrációja jelentős szórást mutat, a vitaminok mennyiségét a tejben nagymértékben befolyásolja az állat táplálkozása, illetve a metabolikus folyamatok. Továbbá a vitaminok rendkívül érzékenyek a fizikai hatásokra (fény, hőmérséklet, oxigén tartalom). Az aszkorbinsav a vitaminok közül nagy mennyiségben van jelen a friss tejben, azonban a levegővel való érintkezés után továbbá a tej kezelésekként alkalmazott pasztörözési eljárás során elbomlik [SCHRÖDER, 1982; GAUCHERON, 2011].

7. táblázat: A tehéntej vitamin tartalma [CLAEYS et al., 2014]

Vitamin	Mértékegység ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)
Tiamin (B1)	28-90
Riboflavin (B2)	116-202
Niacin (B3)	50-120
Pantoténsav (B5)	260-490
Piridoxin (B6)	30-70
Biotin (B7)	2-4
Folsav (B9)	1-18
Kobalamin (B12)	0,27-0,7
Aszkorbinsav (C)	300-2300
A vitamin	17-50
Kolekalciferol (D3)	0,3
Tokoferol (E)	20-180
Fillokinon (K)	1,1-3,2

CLAEYS és munkatársai 2014-es kutatása szerint a vitaminok hőmérséklet érzékenysége eltérő a különböző állatfajok esetén, így például a tehéntej esetén minimális a B6, B3, B5, B7, A, D, E vitaminok vesztesége a feldolgozás során. GUNESER és KARAGUL (2012)-es kutatása bizonyította, hogy a C-vitamin rendkívül könnyen bomlik hőkezelés hatására, azonban itt is eltérések tapasztalhatóak a különböző fajok esetében. A tevétej esetében például nagyobb a C-vitamin veszteség a feldolgozás során mint a tehéntej esetében, azonban bivaly/bövény tejének esetében kisebb veszteség tapasztalható, összehasonlítva a tehéntejjel [CLAEYS et al., 2014].

2.4 Tej fogyasztás élettani hatása

A fiatal emlősök számára, ahogyan az emberi csecsemők esetében is, a tej hosszú ideig az egyetlen tápanyagforrás, tartalmazza mindazon komponenseket melyre a fiatal emlősnek szüksége van a kiegyensúlyozott növekedéshez, fejlődéshez. Az élet későbbi szakaszában már nem nélkülözhetetlen táplálék, azonban szerepe továbbra sem elhanyagolható. A tej rendkívül gazdag biológiailag aktív komponensekben, mind mennyiségi és minőségi szempontokat figyelembe véve. Az emberi táplálkozás alapkövét képezi a tejfogyasztás, tartalmazza mindazon komponenseket (fehérjék, zsírok, szénhidrátok, ásványi anyagok és vitaminok) melyekből felvehetjük a szervezetünk számára szükséges fehérjéket, aminosavakat és zsírsavakat.

Ajánlások szerint napi fél liter tej elfogyasztásával már fedezhető az esszenciális aminosav bevitel a metionin kivételével, egy átlagosan táplált felnőtt férfi számára [KUKOVICS, 2009].

A tej és tejtermékek egészségre gyakorolt hatását, a benne található biológiailag aktív komponensek együttesen határozzák meg. Ebből adódóan a fehérjék védelmet nyújtanak a fogszuvasodás ellen, továbbá antimikrobás hatást fejtenek ki, a gyomor és bélrendszerben, emellett egyes ráktípusok kialakulásának a kockázatát is képesek csökkenteni. A fehérjék mellett a kalcium az egyik legismertebb és állatszámos kutatás alapján is elismert komponens mely az egészséges fejlődés egyik kiemelt eleme. A tejben található jelentős mennyiségű kalcium kiemelt szerepet játszik az egészséges csontfejlődésben és növekedésben. A tejfehérjék napi étrendbe való alkalmazása számos betegség megelőzésében és az emberi szervezet egészségének a megőrzésében játszik fontos szerepet, kijelenthető hogy a tejtermékek fogyasztása jelentős mértékben képes csökkenteni a szív és érrendszeri betegségek kialakulásának a kockázatát [JORDE és BĚRNA, 2000].

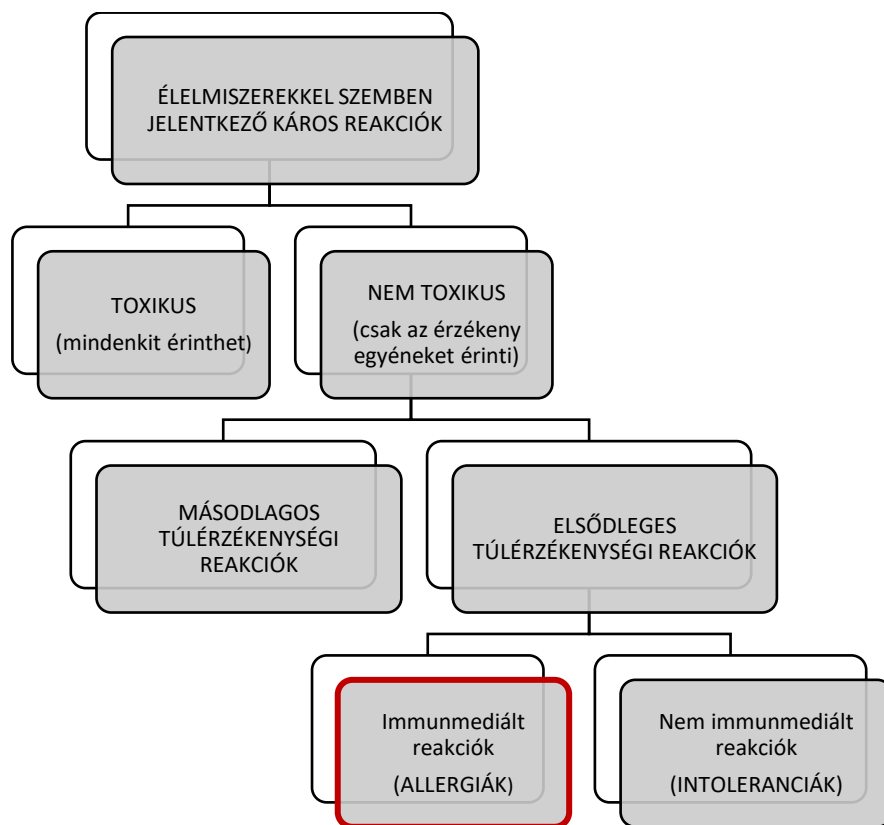
2.5 Allergenitás, élelmiszer allergia

Az élelmiszer allergia olyan immunmediált válaszok halmaza, melyek esetében valamilyen ellenanyag mutatható ki az emberi szervezetben. Az élelmiszerekkel szembeni túlérzékenységi reakciókat több csoportba sorolhatjuk (allergiák, intoleranciák). Munkám során az allergiával, azon belül is a tejfehérje allergiával, annak csökkentésével foglalkoztam. Jelenleg a túlérzékenységi reakciók egyetlen kezelési módja, az azt kiváltó komponens elhagyása, esetleges diéta bevezetése.

2.5.1 Élelmiszer allergének általános jellemzése

Élelmiszer allergéneknek nevezzük azon anyagok összeségét, melyek immungloblin E (IgE) ellenanyag termelődését válthatják ki közvetlenül.

Elmondható hogy az IgE típusú élelmiszer allergia esetében az allergiát kiváltó komponensek természetesen előfordulnak az adott élelmiszerben. Az allergiás reakciók kiváltásáért leginkább az olyan fehérjék tehetőek felelőssé, melyek ellenálnak az emésztési és hőkezelési folyamatoknak. A fehérjék immunogenecitása számos paramétertől és tényezőtől függ. Az élelmiszerek által kiváltott káros reakciók csoportját a 2. ábra mutatja be.



2 ábra: Élelmiszerek által kiváltott káros reakciók [KUKOVICS, 2009]

Egy fehérje allergén hatása egyrészt függ a fehérje 3D-s térszerkezetétől továbbá annak aminosav szekvenciájától, emellett a fehérje mérete is meghatározó tulajdonsággal rendelkezik, ugyanis ha mérete nem megfelelő akkor nem képes hidat képezni két IgE molekula között melynek következtében nem jön létre az allergén reakció. A fehérjének továbbá egynél több IgE kötő helyel kell rendelkeznie, ezek hiányában szintén nem alakul ki allergén reakció.

Az adott fehérjék mérettartományát vizsgálva megállapítható, ha az adott fehérje molekulatömege 10 – 70 kDa között helyezkedik el allergén hatása jelentős, azonban ha 10 kDa alatt helyezkedik el, veszít ezen tulajdonságából, mivel ebben a tartományban már nem képes hidat képezni az IgE molekulák között [TAYLOR, 1992; SICHERER és SAMPSON, 2010].

Számos kutatás bizonyította hogy az epitópok károsításával jelentősen csökkenthető a fehérjék allergénkeltő hatása. A fehérjemolekulák azon immunreaktív szakaszát, melyet az ellenanyagok felismernek, epitópnak hívjuk. Ezen epitópok különféle hő- nyomás- és mikrohullámú kezelés hatására jelentős mértékben károsodnak [KLEBER et al., 2007; KLEBER és HINRICHS, 2007; ISMAHAN et al., 2014].

Az epitópok allergén hatásának mérséklésére irányuló technológiák folyamatos kutatások részét képezik. Ilyen technika például az enzimes hidrolízis alkalmazása mellyel szintén ugyanazt a hatást érhetjük el mint a hő- nyomás- és mikrohullámú kezelés esetén [PAHUD et al., 1985].

2.5.2 Tej allergén fehérjéi

A tehéntej számos allergén összetevőt tartalmaz, melyek a későbbiekben allergiás reakciók kialakulásához vezethetnek. Az európai felnőtt népesség 1-2 %, míg a gyermekek 5-7 %-a esetében tapasztalható a tejfehérje allergia kialakulása [KUKOVICS, 2009].

A tejfehérje allergia beletartozik a nagy nyolcak „Big 8” csoportjába. A „Big 8” az a 8 élelmiszertípus, melyek a legnagyobb arányban okoznak élelmiszer allergiás megbetegedéseket. Ide tartozik, a tej, tojás, hal, mogyoró, dió, szója, búza és a tengeri élőlények. A tejfehérjével szembeni allergiás reakciók többsége IgE-mediált (60%) és sejtmediált mechanizmusok következtében alakulnak ki. Azonban a tejfehérje allergiát számos más termék is kiválthatja, ugyanis a tejfehérjéket gyártási segédanyagként széleskörben alkalmazzák [MONACI et al., 2006].

Az élelmiszerekben lévő allergének kimutatása történhet IgE-specifikus humán és állati (nyúl, kecske) szérumokkal. A humán szérumokkal végzett vizsgálatok során, az adott élelmiszerallergia (tej, tojás, hal) jelenléte igazolható. Humán szérumok felhasználásával, gélelektroforézissel elválasztott fehérjék immunblott vizsgálati alkalmasak az allergiás betegeknél a reakciót kiváltó fehérjék kimutatására [GONZÁLEZ-BUITRAGO et al., 2007].

NATALE 2004-es vizsgálati során, 20 tejfehérje allergiában szenvedő beteg mintáiban immunreaktív fehérjék voltak kimutathatók. Minden beteg érzékeny volt egy vagy több

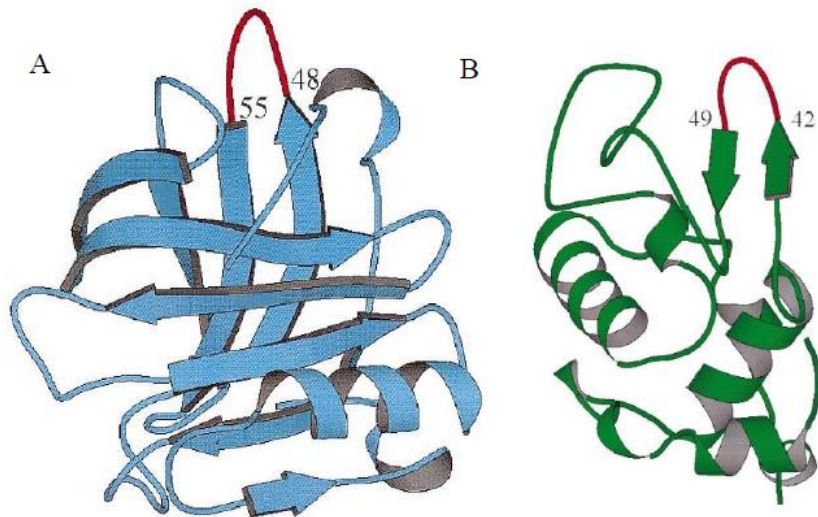
kazeinfrakcióra, az érzékenység előfordulási gyakorisága: β -kazein 3/20 (15%), κ -kazein 10/20 (50%), α_{s1} -kazein 11/20 (55%), α_{s2} -kazein 18/20 (90%). A β - és κ -kazein iránti érzékenység mindig α -kazein iránti érzékenységgel társult. 9 (45%) betegnél mutattak ki specifikus IgE-t a β -laktoglobulinra.

Az élelmiszerek allergenitásának a vizsgálatára számos immunanalitikai módszer került kifejlesztésre, melynek egyik fajtája az immunblott vizsgálat. Az immunoblot vizsgálat, vagy másnéven western blot technika a fehérjék specifikus detektálására szolgáló módszer, ahol a fehérjéket gélelektroforézissel való szétválasztás után szilárd hordozóra visszük fel majd azok jelenlétét specifikus antitestekkel detektáljuk [AKIYAMA et al., 2011].

WRÓBLEWSKA és KALISZEWSKA 2012-es kutatásai alapján megállapítható, hogy az élelmiszerek általános allergén hatása főként a nagy molekulású fehérjékhez (70-80 kDa), a szarvasmarha-szérumalbuminhoz, laktofferinhez és az α -kazein frakcióhoz kötődik. Az egyes fehérjék allergenitása a különböző feldolgozási technológiák (fermentáció, hidrolízis) kombinált alkalmazásával csökkenthető.

A tej allergéntartalmát több frakció együttese határozza meg, allergén hatást fejtenek ki a kazein frakciók és a savófehérjék egyes alkotóelemei is. LIFSCHITZ és SZAJEWSKA 2015-ös kutatása alapján megállapítható hogy az IgE irányított fő allergének az α_{s1} -, α_{s2} -, β -, és κ -kazeinek, illetve a savófehérjék közül az α -laktalbumin és β -laktoglobulin, melynek térbeli szerkezetét a 3. ábra mutatja be. Ahhoz hogy a fehérjék allergenitását a lehető leghatékonyabban csökkentsék, fontos az egyes fehérje frakciók konformációjának az ismerete. Az α -laktalbumin molekulatömege 14,4 kDa, 123 aminosavból épül fel, továbbá négy diszulfid-híddal rendelkező globuláris fehérje. Ca^{2+} régióval rendelkezik, melynek köszönhetően stabil másodlagos szerkezet alakul ki. Aminosav szekvenciája hasonló a tyúktojásban található lizozimmal és az emberi α -laktalbuminnal, konformációs és lineáris epitópokkal is rendelkezik. A β -laktoglobulin 36 kDa méretű dimerekből, 18 kDa méretű monomerekből és 162 aminosavból épül fel. Hasonlóan az α -laktalbuminhoz szintén diszulfid-híd kötésekkel rendelkezik, lineáris epitópokkal, továbbá egy szabad cisztein láncsal.

A β -laktoglobulin stabil szerkezetének köszönhetően viszonylag ellenálló a savas és enzimes kezeléssel szemben, így a diszulfid-hidak felszakadása esetén sem veszíti el allergenitását [CAIRA et al., 2012; MONACI et al., 2006].



3. ábra: A β -laktoglobulin (A) és az α -laktalbumin (B) szerkezete [SHARMA et al., 2001]

Az α_{S1} -, α_{S2} -, β -, és κ -kazeinek önálló szerkezetükkel rendelkeznek, azonban képesek együtt aggregátumokat/micellákat képezni. A kazeinek laza, negyedleges szerkezettel rendelkeznek, melynek köszönhetően jól ellenállnak a hőhatásnak [CAIRA et al., 2012; MONACI et al., 2006].

A tej számos olyan fehérjét is tartalmaz, amelyek allergén potenciállal rendelkeznek. A tehéntej fő allergénjei a kazeinek (20–30 kDa) melyen belül az egyes kazein frakciók molekulatömege az alábbiak szerint osztható fel: α_{S1} - 23,6 kDa, α_{S2} - 25,2-25,4 kDa, β - 24 kDa, γ - 25 kDa és κ - 19 kDa [O'REGAN et al., 2009].

A tehéntejben ritkábban előforduló antigének a marhaszérumalbumin (BSA, 67 kDa), a laktoferrin (76–80 kDa) és az immunglobulinok (kb. 160 kDa) [LIFSCHITZ és SZAJEWSKA, 2015]. A legtöbb fehérje a tejben, beleértve az allergéneket is, glikoprotein formájában van jelen.

2.6 Bioaktív peptidek

A bioaktív peptidek olyan specifikus fehérjetöredékek, amelyek pozitív hatással vannak a szervezet metabolikus folyamataira és azok funkcióira. A bioaktív peptidek hatásukat enzimes hidrolízisen keresztül mind „*in vivo*” mind pedig „*in vitro*” módon képesek kifejteni.

A tejfehérjék meghatározó forrásként szolgálnak a legtöbb bioaktív peptid számára, amelyek inaktív állapotban vannak a tej fehérjéinek molekuláin belül. A bioaktív peptidek aktivitását, azok hatását, az őket alkotó aminosavak és azok szekvenciája határozza meg. A legtöbb peptid 2–20 aminosavból áll, amelyek molekulatömege kevesebb, mint 6 kDa. A bioaktív peptidek felszabadítására számos módszer ismeretes, melyeket az alábbiakban mutatok be. Első: enzimes hidrolízissel melyben az emésztőrendszer enzimeit végzik a hidrolízis folyamatát, mint a tripszin vagy a pepszin.

Második: fermentációval proteolitikus starter kultúrákkal, vagy más állati, növényi, illetve mikrobiális eredetű proteolitikus enzimmel. A bioaktív peptidek felszabadulásával szabályozzák az immunológiai, a hormonális és a neurológiai reakciókat, ezáltal létfontosságú szerepet játszanak a rák, a csontritkulás, a magas vérnyomás és más rendellenességek megelőzésében. Az ilyen fiziológiai sokoldalúság miatt a tejből származó bioaktív peptidek világszerte sok kutató figyelmét hívták fel arra, hogy több olyan potenciális terméket hozzanak létre, amelyek egészséget megőrző, funkcionális tulajdonságokkal rendelkeznek. Ennek hatására egy új iparág indult fejlődésnek, a funkcionális élelmiszerek előállítására [MEISEL és FITZGERALD, 2003].

A bioaktív peptideket tulajdonságaik alapján 5 különböző csoportba lehet sorolni, melyek a következők: antimikrobiális, immunrendszer szabályzó, ACE (angiotenzin-konvertáló enzim) gátlók, ópioid és antioxidáns hatású peptidek.

A tejfehérjékből származtatott bioaktív peptidek antimikrobiális tulajdonságuknak köszönhetően képesek számos Gram + és Gram – patogén mikroorganizmus gátlására (*Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella typhi*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *Staphylococcus aureus*).

MOHANTY és munkatársai 2016-os kutatásaiból kiderül, hogy a kazeinekből és a savóból származó bioaktív peptidek stimulálják az immunrendszer limfocita és makrofág szintézisét továbbá azok aktivitását, emellett hatással van a citokinek termelésére.

A citokinek olyan kis molekulatömegű kémiai hírvivő anyagok (10–40 kDa-os), másnéven glikoproteinek, melyek különböző sejtek közötti kapcsolatok létrehozásában játszanak fontos szerepet. Hatásukat a citokinreceptorokhoz nagy affinitással való kötődéssel fejtik ki. A létrejövő immunválasz során segítik az információtovábbítást és az immunválasz szabályozását. Különbséget kell tenni egy fehérje allergenitása és immunogenitása között. Egy fehérje immunogenitása a fehérjének az a képessége, melynek segítségével IgE antitesteket indukál. UENO és munkatársai 2018-ban végzett vizsgálatai során kazein hidrolizátum, alkaláz enzimmal végzett hidrolízisét követően arra az eredményre jutottak hogy, a vizsgált kazeinek esetében csökkenő allergenitást míg változatlan immunogenitást tapasztaltak. A hidrolízist lúgos pH-n végezve az IgE epitópok hasításával ígéretes eredményeket sikerült elérni a tejfehérje allergiában szenvedő betegek immunterápiájával kapcsolatban.

Az ACE gátló peptidek segítik a vérnyomás szabályozását, ugyanis ezen peptidek hatására gátlódik az angiotenzin I – II konverziója, melynek következtében a vérnyomás alacsony marad. Normál esetben az angiotenzin II erős vazopresszorként funkcionál: az artériák összehúzódását okozza, amelyek ideiglenes szűkülése növeli a bennük áramló vér nyomását. JÄKÄLÄ és munkatársainak 2010-es vizsgálatai kimutatták, hogy a tejsavbaktériumokkal (*Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis*) végzett fermentáció hatására két tripeptid szabadul fel a kazein molekulák felhasadásával Ile-Pro-Pro, Val-Pro-Pro. Ezek a peptidek számos modellben mérsékeltek a magas vérnyomást, továbbá μM koncentrációban ACE gátló hatással rendelkeznek. A tejfehérjék jelentős mennyiségben tartalmazznak olyan peptideket, melyek ACE gátlók. Ez az érték folyékony tejfehérje-koncentrátum esetében megközelítőleg 6 %-os értéket képviselt. A folyékony tejfehérje-koncentrátum elenyésző ACE gátló hatása a natív tejfehérjék és az angiotenzin-konvertáló enzim aktív oldala közötti rossz interakcióval magyarázható. Ile-Pro-Pro, Val-Pro-Pro peptidekhez hasonlóan számos más peptid (Ile-Trp, Leu-Trp, Phe-Pro, Phe-Tyr) is rendelkezik ACE gátló, vérnyomáscsökkentő hatással [WANG et al., 2018; YU et al., 2019].

Ezek a tripeptidek (Ile-Pro-Pro, Val-Pro-Pro) számos állatkísérlet esetében csökkentették a magas vérnyomás kialakulását az angiotenzin I – II konverziójának a gátlásával, illetve a már kialakult akut magas vérnyomást sikeresen csökkentették a klinikai vizsgálatok során. A tej, mint hagyományos élelmiszer egy új funkcionális élelmiszerként vagy annak egy összetevőjeként szolgálhat a benne felszabaduló bioaktív peptideknek köszönhetően, mely speciális egészségvédő komponenseket hordozhat magában [JÄKÄLÄ és VAPAATALO, 2010].

Az ópioid peptidek olyan ópioid receptor ligandumok, amelyeket marha- és humán β -kazeinből enzimatis hidrolízissel állítanak elő. Az ópioid peptidek enzimatis hidrolízissel, illetve mikrobiális fermentációval állíthatók elő különböző fehérjékből (α -kazein, β -kazein, α -laktalbumin, β -laktoglobulin) [KOSTYRA et al., 2004]. Az endogén ópioid peptidek (enkephalinok, endorphinok, dynorphinok) szabályozzák a központi idegrendszerben részt vevő sejtek növekedését és működését, míg a β -kasomorfinek az újszülöttek nyálkahártyáján át szállítódnak, amelyek szabályozzák a fiziológiai reakciókat, csecsemőknél nyugalmat és alvást eredményezve. Megoszlásukat vizsgálva elmondható, hogy leginkább ott találhatóak ahol a fájdalom érzékelése megy végbe (gerincvelő, lamina I–II, periaquaeductalis szürkeállomány stb.) [MEISEL és FITZGERALD, 2000].

Peptidek jelentős része szabályozó szerepet tölt be az élő szervezetek oxidatív metabolizmusában, amely elengedhetetlen a sejtek túléléséhez, illetve működéséhez. Az oxidatív folyamatok következtében szabad gyökök képződnek, melyek nagy mennyiségben celluláris stressz állapotot, oxidatív stresszt idéznek elő. Ennek következtében a sejt különböző molekuláinak (nukleinsavak, fehérjék stb.) oxidatív károsodása következik be, mely végül a sejt pusztulásához vezet. A tehéntejből nyert antioxidáns peptidek 5 – 11 hidrofób aminosavból állnak, pl prolin, hisztidin, tirozin aminosavakból. A bioaktív peptidek hatásukat egyrészt a szabadgyökök képződésének gátlásával, illetve azok eltávolításával fejtik ki, csökkentve a szabadgyökök oxidatív hatásából adódó negatív hatást. TONOLO és munkatársai 2019-ben végzett munkájuk során a tejfehérjék hidrolízise/fermentációja során felszabaduló bioaktív peptideket vizsgálták. Kutatómunkájuk során megállapítást nyert, hogy a Y-4-R (YVPR), V-6-R (VPYPQR), V-7-K (VLPVPEK), A-10-F (ARHPHPLSF), R-10-M (RHPHPLSFM), és H-9-M (HPHPHLSFM) bioaktív peptidek antioxidáns tulajdonsággal rendelkeznek. A felsorolt bioaktív peptidek esetében, az adott peptid aminosav szekvenciáját láthatjuk, a szekvenca kezdő és végső aminosav fajtájával, míg a peptid szekvenca közepén helyet foglaló szám, az adott bioaktív peptidet alkotó aminosavak számát adja meg. Y-4-R (YVPR) esetében a bioaktív peptidet, tirozin, valin, prolin és arginin alkotja. A felszabaduló bioaktív peptidek megakadályozták a Caco-2 sejtek oxidatív stressz miatti életképesség csökkenését. A Caco-2 sejtvonal humán colon adenokarcinoma eredetű.

Ezt a sejtípust igen széles körben alkalmazzák a vékonybélből történő gyógyszerfelszívódás in vitro modellezésére [MOHANTY et al., 2016; ERDEI et al., 2012; TONOLO et al., 2019].

2.6.1 Bioaktív peptidek előállítása - Enzimes hidrolízis

A bioaktív peptidek előállításának, egyik leggyakrabban alkalmazott módszere, az enzimes hidrolízis. A fehérjék enzimes hidrolízisét proteáz enzimekkel végzik, melyek közül megkülönböztetünk állati (tripszin, pepszin), növényi (papain, bromelin) és mikroorganizmusok (alkaláz) által termelt proteázokat. A proteázok a fehérjékben található peptidkötések hidrolízise révén bontják le a fehérjéket kisebb peptidekre, majd aminosavakra, speciális aminosav szekvencia alapján. Az egyes enzimek alkalmazásával különböző bioaktív peptidek állíthatóak elő. ACE-gátló peptidek előállítására általában tripszin enzimet használnak [KORHONEN és PIHLANTO, 2006].

A hidrolízis környezeti paramétereinek a megválasztása kiemelt fontosságú, ha a hőmérséklet és/vagy a pH érték jelentős mértékben eltér az adott enzim vagy mikroorganizmus ideális működési paramétereitől annak hatása az adott fehérje funkcionalitását fogja befolyásolni. Ennek következtében nagyobb arányban halmozódhatnak fel a keserű ízért felelős peptidek az adott termékben.

A tejfehérjék hidrolízise során a bioaktív peptidek felszabadulásának előrejelzésére különféle szoftverek kerültek kifejlesztésre, melyek a kiválasztott enzim hasítási specifitásának ismeretében becsülik meg a keletkező bioaktív peptidek típusát. A tejfehérjék *in silico* emésztéséhez általánosan használt programok között szerepel az ExPASy és a BIOPEP, melyek szabadon hozzáférhetőek az interneten [NONGONIERMA és FITZGERALD, 2017].

JANG és munkatársai 2017-es vizsgálataik során, állati fehérjék (lepényhal, tonhal) enzimes hidrolízisét végezték különféle enzimek (papain, α -kimotripszin) alkalmazásával, majd vizsgáltak a hidrolizátum antioxidáns kapacitását DPPH módszerrel. A vizsgált enzimek esetében különböző DPPH érték volt mérhető, ugyanis az enzimek különböző szekvencia mentén hasítanak. Vizsgálataikban megállapították hogy, papain enzim használata tonhal fehérje hidrolizátumban, míg lepényhal esetében az α -kimotripszin mutatta a legmagasabb DPPH értéket.

Az enzimek kiválasztásának és alkalmazásának feltétele hogy az adott enzim ne károsítsa a termék érzékszervi tulajdonságait, mely számos kihívást állít az élelmiszeripari gyártástechnológiákban. Az aminosavak és peptidek befolyásolják a termék érzékszervi tulajdonságait, kiemelt szerepük van a textúra, alak, szín és íz kialakításában [TAVANO et al., 2018].

2.6.2 Bioaktív peptidek előállítása - Fermentáció

WIDYASTUTI és munkatársai 2014-es kutatásukban megállapítást nyert hogy a fermentáció egyik legjobban fejlődő területe a tej, tejsavbaktériumokkal (LAB – Lactic Acid Bacteria) történő fermentációja. A tejsavbaktériumokkal történő fermentáció nem csak az adott termék eltarthatóságát és organoleptikus tulajdonságait fejleszti, hanem elősegíti a bioaktív peptideknek a felszabadulását. A fermentáció történhet spontán vagy irányított módon, azonban a fermentációs technológiák során irányított módszert alkalmaznak mivel ebben az esetben irányítható a folyamat és növelhető a keletkező fermentációs termék volumene.

Bioaktív peptidek nem csak enzimes hidrolízissel, hanem mikrobiális fermentációval is előállíthatók. A tejiparban alkalmazott starter kultúrák jelentős része proteolitikus tulajdonságokkal rendelkezik.

A tej tejsavbaktériumokkal történő fermentációja során különböző bioaktív peptidek állíthatók elő, az alkalmazott mikroorganizmusok függvényében. *Lactobacillus helveticus*, *Saccharomyces cerevisiae* és *Streptococcus thermophilus*+*Lc. lactis subsp.* kultúrákkal történő fermentáció során ACE-gátló peptidek, *Lb. Delbrueckii subsp. bulgaricus* IFO13953 fermentációjával antioxidáns peptidek kerülnek előállításra. A *Lactobacillus helveticus* széles körben alkalmazott starter kultúra a fermentált tejtermékek előállításában (ementáli sajt), mely fermentációt követően számos bioaktív peptid (Val-Pro-Pro (VPP), Ile-Pro-Pro (IPP)) szabadul fel [KORHONEN és PIHLANTO, 2006].

RAVESCHOT és munkatársai 2018-as kutatása során *Lactobacillus* baktériumokkal történő fermentációnak az ipari lehetőségeit vizsgálták. Megállapítást nyert hogy az élelmiszeriparban több szempontból is kiemelt szerep jut a *Lactobacillus* törzseknek a fermentáció során (bioaktív peptidek, hozzáadott funkcionális érték, allergéntartalom csökkenés), emellett a bioaktív peptidek előállítása *Lactobacillus* fajokkal történő előállítása viszonylag olcsó az enzimes hidrolízishez képest. Azonban a folyamat hátránya, hogy a fermentációs úton előállított bioaktív peptidek termelékenysége alacsony az enzimes hidrolízishez képest.

2.7 Membránszűrés

Az alábbi fejezetben a membránműveleteket mutatom be, mely folyamatok közös jellemzője, hogy valamely hajtóerő hatására szelektív transzport jön létre. A 2.7-es fejezet során bemutatásra kerül a membránok történelme, alapfogalmai, mutatói és az NF (Nanoszűrő) membránok modellezése.

A membránszűrés alkalmazása az elmúlt években egyre nagyobb mértékben terjedt el az élelmiszeripari gyártás technológiák során. Integrálása az egyes technológiákba elősegítette a termékek minőségének javulását, kíméletes eljárás lévén lehetővé teszi az értékes komponensek megőrzését, továbbá a membránok szelektivitásának köszönhetően komponensre specifikusan eltávolítható vagy dúsítható a termék egy adott komponensre vetítve.

Számos alkalmazási terület egyike a tejipar. A tejben lévő baktériumok és a spórák eltávolításának egyik módja a mikroszűrés (MF), mely az ultrapasztörözés (UHT – Ultra High Temperature) egyik alternatívájaként használható, a tej eltarthatóságának meghosszabbítása érdekében.

2.7.1 Membránszűrés történelme

A mesterséges membránok történelmének első jelentős eseménye az 1748-as évek tehető, amikor egy francia pap Abbé Jean-Antoine Nollet a víz elválasztásának/permeabilitásának felfedezését írta le. Kísérletében egy edénybe bort öntött, melynek száját egy állati eredetű hólyaggal zárta le, majd az egészet vízbe merítette.

A hólyag a víz számára átjárható volt melynek következtében beszivárgott az edénybe, felfedezve ezzel a szemipermeabilitás jelenségét. Nyolcvan évvel később, 1823-ban Doebereiner hidrogéngáz diffúziójának vizsgálata ösztönözte Thomas Grahamet a gázok diffúziójának további vizsgálatára, melynek köszönhetően megalkotta a Graham féle diffúziós törvényt (1866). 1855-ben Adolf Fick határozta meg a diffúzió törvényét, mely rövid időn belül az alapját képezte a membránok diffúziós transzportjának leírásának. Traube 1867-ben sikeresen elkészítette az első félig-áteresztő hárttyát, amelyet az oldatok ozmotikus nyomásának mérésére használt Pfeffer 1877-ben.

Van't Hoff tíz évvel később 1887-ben a további kutatásai során sikeresen megalkotta az ozmotikus nyomás elméletét (Van't Hoff törvény), amiért később az első kémiai Nobel-díjat kapta 1901-ben. A magyar származású Zsigmondy Richárd nevéhez fűződik, hogy 1907 és 1920 között olyan finom szemcseméretű mesterséges membránokat hozott létre, amivel

megteremtette a mikroszűrés és az ultraszűrés alapjait. A 20-as évek végén már megfigyelték és tanulmányozták celofán vagy cellulóz-nitrát membránokkal a fordított ozmózis jelenségét. Az 1930-as években Teorell és Meyer megalkotta az elektrodialízis és a modern membrán elektródok fogalmát [FANE et al., 2010].

Később az 1950-es évek elején már az elektrodialízist, a mikroszűrést és az ion-cserélő membránokat laboratóriumi kutatásokra használták, illetve az ivóvíz tisztaságát ellenőrizték Európában. 1954-ben már üzemek használták ivóvíz előállítására, amelyet a sós víz elektrodialízisével és ioncserélésével értek el. 1962 egy mérföldkőnek is tekinthető a membránszűrés történetében, ugyanis Loeb és Sourirajan egy hibátlan, nagy fluxusú, aszimmetrikus cellulóz-acetát membránt hozott létre.

1980-ra a fordított ozmózis, ultraszűrés, mikroszűrés és az elektrodialízis már világszerte megtalálható volt üzemi alkalmazásokban [SALEH és GUPTA, 2016].

2.7.2 A membránszűrés alapfogalmai

A membrán egy olyan permszelektív réteg, amely két vagy több komponensből álló elegy egyes komponenseit átreszti, másokat pedig részben, vagy teljesen visszatart. A membránműveletek során különböző hajtóerők hatására a membránon transzportfolyamatok mennek végbe, melyek bizonyos komponensekre nézve szelektívek. A membránműveletek nagy előnye hogy, energiaigénye más folyamatokkal ellentétben alacsony, kémiai átalakulás nélkül megy végbe a szétválasztás, könnyen illeszthető más műveletekhez, könnyen automatizálható, továbbá környezetbarát (nem termel veszélyes hulladékot).

A szétválasztási, besűrítési és tisztítási folyamatok fejlődése elengedhetetlen volt a kiváló minőségű termékek előállításának az érdekében mind a gyógyszeripar és mind az élelmiszeripari termékek esetében. A szétválasztási technológiák fejlődésével egyre hatékonyabbá vált a káros, értékes komponensek egymástól való elválasztása. A szétválasztás kétféleképpen valósulhat meg, aktív és passzív transzporttal.

Aktív transzport esetében a szétválasztást (komponensek áramlását) az alkalmazott membrán permszelektivitása határozza meg, ezzel ellentétben a passzív transzport esetében a szétválasztandó fázisok fizikailag kerülnek elválasztásra [STRATHMANN et al., 2006].

A membránszűrő berendezéseket (modulokat), kialakításuk szerint két csoportba sorolhatjuk. A klasszikus vagy „Dead End” szűrés esetében a betáplált oldatot a membrán felületére merőlegesen vezetik. A szűrés során a visszatartott komponensek felhalmozódnak a membrán

felületén, így kialakul egy koncentráció-polarizációs réteg (ezt klasszikus szűrésnél szűrőlepenynek nevezzük). A kialakuló szűrőlepenynek a vastagsága és az ellenállása növekszik a szűrési idő során, melynek hatására csökken a keletkező szűrletáramnak a mennyisége.

Abban az esetben ajánlott alkalmazni a „Dead End” szűrést, amikor a szürendő anyag szilárdanyag tartalma kicsi, továbbá a kialakuló szűrőlepeny ellenállása elfogadható áramlási sebességet tesz lehetővé.

A „Cross Flow”, keresztáramú szűrés során a szürendő oldatot a membrán felületéhez képest párhuzamosan áramoltatják, mely szűrési technikának előnye, hogy a művelet során a visszatartott komponensek kevésbé halmozódnak fel a membrán felületén így nagyobb a szűrési sebesség [VAN DER BRUGGEN, 2018]. A különféle membránszeparációs eljárásokat a 8. táblázat foglalja össze.

8. táblázat: Alkalmazott membránműveletek, működtetési elvek [GÁSPÁR, 2016]

Művelet	Membrán típusa	Hajtóerő	Anyagátadási mechanizmus	Példák alkalmazásra
Mikroszűrés	Szimmetrikus pórusos, pórus átmérő: 0,1–10 µm	Nyomás 0,1–0,2 Mpa	Szitahatás (méret alapján történő osztályozás)	Vízisztítás, sterilizálás (gombák, baktériumok), koncentráció (keményítő, gyümölcslevek)
Ultraszűrés	Asszimmetrikus pórusos, pórus átmérő: 10–100 nm	Nyomás, 0,2–0,5 Mpa	Szitahatás (méret alapján történő osztályozás)	Elegyek szétválasztása, vízisztítás (vírusok, fehérjék, koloidok, makromolekulák), fehérjék eltávolítása
Diaszűrés (Mikro/Ultraszűrő modul)	Asszimmetrikus pórusos, pórus átmérő 2–10 nm	Nyomás, 0,1–0,5 Mpa	Szitahatás (méretkizárásos) és dialízis	Molekuláris keverékek tisztítása, művese
Nanoszűrés	Asszimmetrikus pórusos szerkezet, pórus átmérő 1–10 nm	Nyomás, 0,1–1 MPa	Szitahatás (méret alapján történő osztályozás)	Fehérje leválasztás, nagyobb molekulák, cukrok, kétértékű ionok
Fordított ozmózis	Asszimmetrikus bőr típusú oldódás-diffúziós membrán	Nyomás, 1–10 MPa	Oldódás és diffúzió	Tengervíz és sós vizek sómentesítése, anionok leválasztása
Direkt (Forward) ozmózis	Vékony film kompozit membrán	Koncentráció gradiens	Oldódás és diffúzió	Nyomáskésleltetett diffúzió, sómentesítés

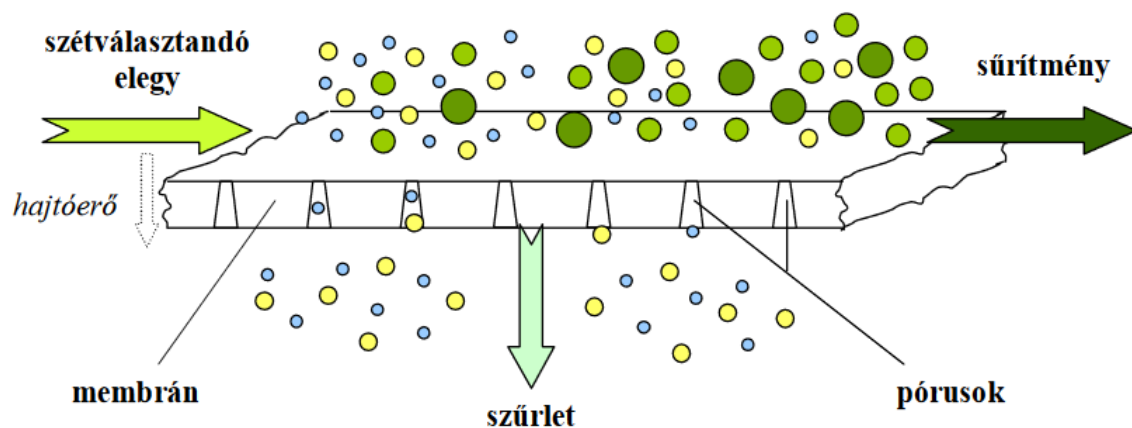
Dialízis	Szimmetrikus pórusos membrán	Koncentráció gradiens	Diffúzió	Fehérjeoldatok sómentesítése
Membrán emulzifikáció	Szimmetrikus pórusos membrán, pórus átmérő: 0,1–10 μm	Nyomás, 0,1–10 Mpa	Felületi feszültség	Mikroemulziók előállítása
Elektrodialízis	Szimmetrikus ioncserélő membrán	Elektromos potenciál	Donnan kizárás	Sav és lúg előállítás
Elektrodialitikus vízszeparáció	Bipoláris membrán	Elektromos potenciál	Donnan kizárás	Sav és lúg előállítás
Membrán desztilláció	Szimmetrikus pórusos	Gőznyomás	Diffúzió	Szilárd folyadék szétválasztás
Membrános érintkeztetők (contactors)	Szimmetrikus pórusos / folyadék membrán	Kémiai potenciál	Oldódás-diffúzió	Oldószer extrakció
Membrán reaktor	Homogén / pórusos membrán	Kémiai potenciál	Szelektív szorpció és diffúzió	Szennyvízkezelés, szelektív oxidáció
Folyékony (liquid) membránok	Pórusos támasz membrán	Kémiai potenciál	Diffúzió és reverzibilis reakció	Fémek és antibiotikumok eltávolítása és hasznosítása
Pervaporáció	Homogén asszimmetrikus membrán	Gőznyomás	Oldódás-diffúzió	Azeotróp keverékek szétválasztása

A membránok anyagukat tekintve is többfélék lehetnek, attól függően, hogy az adott eljárás vagy alkalmazás mit igényel. Osztályozásukat tekintve lehetnek gáz, folyadék vagy szilárd membránok. A gáz membránok esetében a szétválasztás atmoszférikus nyomáson történik. Folyadék membránok esetében az elválasztandó komponensek, három egymásra épülő fázisban helyezkednek el, ahol is a szétválasztás az alsó és a felső fázis között elhelyezkedő köztes fázison keresztül történik. A szilárd membránokon belül megkülönböztetünk természetes és mesterséges membránokat.

A természetes eredetű membránok különféle növényi vagy állati alapanyagból készülnek, míg a mesterséges membránok különféle polimerek fémek, illetve kerámiák lehetnek [CSÉFALVAY és MIKA, 2008].

A membrános műveletek általános elve a 4. ábrán látható. A szétválasztás során a betáplálási elegyet a membránmodulban található membrán felületére vezetik.

A membránszűrés során kétféle áramot kapunk, a membrán által visszatartott komponensek alkotják a sűrítményt vagy másnéven retentátumot, míg a membránon átáramlott komponensek képezik a szűrlet vagy permeátum ágat. A membránon keresztüli anyagtranszport megvalósulásához szükséges, hogy legalább egy fizikai mennyiségben különbség mutakozzon meg a szűrlet és a sűrítmény oldalon. A membránszűrés hajtóereje lehet a retentátum és permeátum oldal közötti nyomásgradiens, hőmérséklet-gradiens vagy elektromos potenciál-gradiens [ROMÁN, 2010].



4. ábra: A crossflow membránszűrés elve [ROMÁN, 2010]

2.7.3 Membránszűrés jellemző mutatói

Az alábbi fejezetben ismertetem a membránszűrés során alkalmazandó mutatókat, alapfogalmakat. A nyomásgradiens által irányított folyamatok esetében a hajtóerő, a transzmembrán nyomáskülönbség, mely a szűrlet és a sűrítmény oldal közötti nyomáskülönbséget jelenti.

A súrlódási nyomásveszteség okán, a modul hosszában a nyomás folyamatosan csökken a belépő oldaltól a kilépő oldalig, ezzel ellentétben a szűrlet oldalon a nyomás megegyezik a légköri nyomással:

$$TMP = \frac{p_{BE} + p_{KI}}{2} - p_0 \quad (1)$$

Ahol TMP a transzmembrán nyomáskülönbség [Pa, bar], p_{BE} a sűrítmény nyomása a modulba való belépéskor, p_{KI} pedig a kilépéskor, p_0 a szűrlet nyomása.

A fluxus vagy permeációs sebesség megadja a membrán egységnyi felületén egységnyi idő alatt átáramlott anyag mennyiségét. A fluxust is két csoportra oszthatjuk, egyrészt felírható a permátumra vonatkozó fluxus, illetve egy adott komponensre vonatkoztatott fluxus érték is.

$$J_P = \frac{V_P}{A \cdot t} \quad (2)$$

Ahol J_P a permeátum fluxusa [$L/(m^2h)$], V_P a permeátum térfogata [L], A a membrán szűrőfelülete [m^2], t a szűrés ideje [h].

Egy termék gyártási technológiájának előkészítésében, annak tervezésében a fluxuson kívül egy másik fontos jellemző, a szelektivitás. Míg az alacsony fluxus érték kompenzálható, növelhető abban az esetben ha növeljük a szűrőfelület nagyságát, ellenben a szelektivitás értéke nagymértékben meghatározza az adott membrán alkalmazhatóságát, illetve a termék minőségét. A szelektivitást a visszatartással szokták jellemezni, az alábbi egyenlettel:

$$R = \left(1 - \frac{C_P}{C_R}\right) \cdot 100 \quad (3)$$

Ahol R a visszatartás [%], C_P , a koncentráció a permeátumban [g/L] vagy [mol/m^3], C_R , a koncentráció a retentátumban [g/L] vagy [mol/m^3]. A visszatartás értéke 0 – 100% közötti értéket vehet fel. Továbbá a visszatartás értéke függ a nyomástól és a hőmérséklettől is, így ezen paramétereket is figyelembe kell venni az adott membrán/elválasztás tervezése során.

A membránszűrés egy másik fontos jellemzője a koncentrációs faktor (volume concentration ratio/reduction, VCR), mely nem egy adott membránra vonatkoztatott paraméter, hanem a besűrítés mértékét/folyamatát határozza meg. Megmutatja, hogy a kiindulási elegy térfogata hányszorosa a sűrítmény térfogatának:

$$VCR = \frac{V_F}{V_F - V_P} = \frac{V_F}{V_R} \quad (4)$$

ahol VCR a sűrítési arány [-], V_F a kiindulási elegy térfogata [L], V_P a permeátum térfogata [L] és V_R a retentátum térfogata [L].

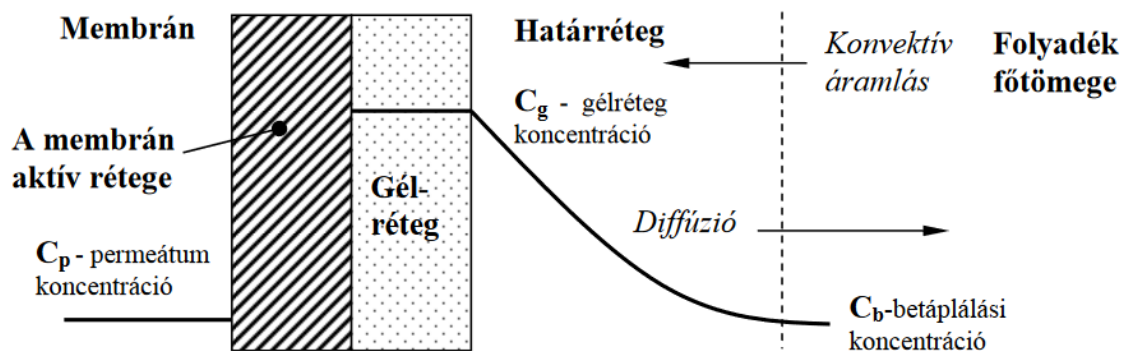
A pórusos membránokat jellemezhetjük egyrészt az átlagos pórusátmérővel (pórusméret), illetve az adott membránra vonatkozó vágási értékkel. A vágási érték (molecular weight cut-off, MWCO) azt a molekulatömeget jelenti (Da -ban), amit a membrán 90 %-ban visszatart.

2.7.4 Nanoszűrés modellezése

A nanoszűrő membránok megjelenése az 1980-as évekre tehető, ipari alkalmazásukat tekintve, egyaránt megtalálhatóak a víz- és szennyvízkezelés, biotechnológia és élelmiszeripar területén. Az nanoszűrés az ultra-, és fordított ozmózis között képez átmenetet, ebben a tartományban a pórusméret 1 - 10 nm között helyezkedik el. A pórusméret mellett a membránszűrés jellemezhető a vágási értékkel is, mely a nanoszűrés esetében 200 Da és 500 kDa között található. A nanoszűrés (NF) baktériumok, zsírok és fehérjéken túl a cukrok, több vegyértékű ionok kiszűrésére alkalmas szétválasztó művelet.

A membránszűrés szakaszos és folytonos eljárással is végezhető, melynek megválasztása a betáplált anyag mennyiségének a függvénye. A művelet hajtóereje a membrán két oldala közötti nyomáskülönbség, mely akár 30 – 40 bar is lehet. A nagyobb nyomáskülönbséget, a nanoszűrő membránok sűrűbb és kisebb pórusokkal tagolt anyaga indokolja, ugyanis szerkezetéből adódóan nagyobb ellenállást fejt ki a mikro-, és ultraszűrő membránokhoz képest.

Kisebb mennyiségek szűrése esetén szakaszos, nagyobb mennyiségű szűrendő oldatnál folytonos, másnéven „Feed and Bleed” eljárást érdemes alkalmazni. A 2.7.3-as fejezetben bemutatott membránszűrés mutatói mellett meghatározó jellemző a membrán ellenállása (R_M). A membránszűrés esetében nem elhanyagolható tényező a koncentráció polarizáció (5.ábra), mely jelentős hatással van a szűrés folyamatára. Abban az esetben, ha egy oldatból egy adott komponens szeretnénk eltávolítani a visszatartás következtében a membrán felületén megnő a szilárd, illetve oldott anyag (fehérje) koncentrációja. Az így keletkező gélréteg vastagsága a szűrés idő előrehaladtával folyamatosan nő. Ennek a gélrétegnek a vastagsága minimálisan csökkenthető az oldat sebességének a növelésével, azonban egy idő után kialakuló egyensúly következtében kialakul az ellenáramú diffúzió kontrollja. Ez az egyensúly a szűrletteljesítmény, mely a gélréteg és az oldat tömegében lévő koncentrációkülönbség következtében alakul ki. A membrán pórusainak eltömődésével és a határréteg ellenállás következtében a szűrés sebesség csökken [BÉLAFINÉ, 2002; TEKIC et al., 1996].



5 ábra: A koncentráció polarizáció elve [TEKIC et al., 1996]

Nanoszűrés esetében, ha a hajtóerő függvényében ábrázoljuk a fluxust, hasonlóan az ultraszűréshez, a fluxus értéke nem nő lineárisan hanem egy bizonyos tartományon túl elhajlik. Ezen tartomány leírásának érdekében hozták létre az ozmotikus nyomás modellt [RAUTENBACH 1997].

Ennek meghatározása a következőképpen történik:

$$J = \frac{TMP - \Delta\pi}{\eta \cdot R_M} \quad (5)$$

Ahol, $\Delta\pi$ az ozmotikus nyomás különbségét jelöli, mely az alábbi képlettel írható fel:

$$\Delta\pi = \pi_b - \pi_p \quad (6)$$

A π_p és π_b a membrán belső falában, illetve a szűrletben mért koncentráció. Abban az esetben, ha a szűrlet koncentrációja elhanyagolható mértékű a membrán falánál mért koncentrációhoz képest, akkor $\pi_p = 0$, így pedig $\Delta\pi = \pi_b$. A hajtóerő csökkenését a membrán falánál megnövekedett koncentráció okozza, mely folyamatnak a koncentráció függése az alábbiak szerint írható fel:

$$\pi = a \cdot c_b^n \quad [Pa] \quad (7)$$

Ahol a és n , az oldott anyag tulajdonságaitól és hőmérsékletétől függő állandók. A c_b a fent említett membrán fal melletti koncentrációját jelöli. A membrán fal melletti koncentrációja az alábbiak szerint számítható:

$$c_b = c_0 \cdot e^{\frac{Jp}{k}} \quad [g/dm^3] \quad (8)$$

Az ellenállás modell esetében az oldószer fluxus értékét a membrán ellenállás (R_M) és a polarizációs réteg ellenállása határozza meg (R_P). A polarizációs réteg ellenállása további két komponensre osztható fel: gélréteg (R_G) és határréteg ellenállás (R_H).

A gélréteg és a határréteg ellenállása függ továbbá a nyomáskülönbségtől, hőmérséklettől, áramlási viszonyoktól és az oldat jellemző fizikai tulajdonságaitól. A változók ismeretében az ellenállás modell egyenlete az alábbiak szerint módosul: [FONYÓ és FÁBRY, 1998].

$$J = \frac{TMP}{R_M + R_P} ; R_P = R_G + R_H \quad (9)$$

Tiszta víz esetében a víz fluxusa, az alábbi képlettel fejezhető ki:

$$J_V = \frac{TMP}{R_M} \quad (10)$$

Abban az esetben ha a (9)-es egyenletbe bevezetésre kerül a dinamikai viszkozitás értéke (η), a membrán ellenállásának a mértékegysége $1/m$ lesz, és nem függ a hőmérséklettől.

$$J_V = \frac{TMP}{\eta \cdot (R_M + R_P)} \quad (11)$$

A polarizációs réteg ellenállásának (R_P) számításához figyelembe kell venni a szűrés során fellépő többi ellenállásnak is az értékét:

$$R_P = R_G + R_H + R_F \quad (12)$$

ahol, R_G : a gélréteg-, R_H : a határréteg- és R_F : az eltömődésből származó ellenállás

A membrán hidrodinamikai ellenállása (R_M) a desztillált vízzel végzett fluxus mérésekből számítható, ebben az esetben nem alakul ki polarizációs réteg ($R_P = 0$) a membrán felületén. Mivel a membrán pórusai nem tömődnek el, így az eltömődésből származó ellenállás nem alakul ki ($R_F = 0$).

Az alábbiak alapján a tisztavíz fluxus számítható:

$$J_V = \frac{TMP}{\eta_V \cdot R_M} \quad (13)$$

ahol J_V : tiszta vízzel mért szűrletfluxus [$m^3/m^2 \cdot s$], η_V : víz dinamikai viszkozitása [$Pa \cdot s$], R_M : membrán ellenállása [$1/m$], TMP : transzmembrán nyomáskülönbség [Pa].

A (13)-as egyenlet alapján számítható a membrán ellenállása (R_M).

$$R_M = \frac{TMP}{\eta_V \cdot J_V} \quad (14)$$

ahol TMP - transzmembrán nyomáskülönbség [Pa], η – a tej dinamikai viszkozitása 25 °C-on: $1,74 \cdot 10^{-3}$ [Pa s], J_V - desztillált víz szűrletfluxusa [$\text{m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{s}$]

2.8 Statikus keverés alapfogalmai

A membránszűrés két alapvető problémája a membrán pórusainak eltömődése és a koncentráció-polarizáció jelensége. A membrán pórusainak eltömődését különböző makromolekulák, szuszpendált szilárd anyagok és kolloidok lerakódása okozza a membrán felületén. A pórusok eltömődése a permeátum fluxusára van a legnagyobb hatással, utóbbi az idő elteltével jelentős mértékben csökken. A membrán felületén kialakuló vékony réteg következtében koncentráció polarizáció hatása lép fel. A folyamat egy bizonyos mértékig visszafordítható, azonban a membrán pórusainak eltömődése egy idő után irreverzibilis. A kialakult réteg másodlagos szűrőként viselkedik, a lerakódás mértéke függ a membrán tulajdonságaitól, a modul geometriájától, pórusméretétől, a betáplált fluidum összetételétől, valamint a folyamat egyéb üzemeltetési paramétereitől, továbbá a betáplálás sebességétől, áramlási sebességtől, transzmembrán nyomásesés eloszlásától a modulon [GIMMELSHTEIN és SEMIAT, 2005].

A membrán felületén kialakuló gélréteg csökkenti a szűrés sebességét, illetve negatívan hat a membrán szelektivitására. Az élelmiszer-, vegyész- és biomérnöki folyamatok többségében Newtoni közegeket ($\eta < 0,05 \text{ Pa}\cdot\text{s}$) alkalmaznak, melyek áramlása turbulens áramlási viszonyok mellett történik. A folyamatok intenzifikálásának, keverésének javítása érdekében napjainkban egyre nagyobb számban építenek be statikus keverőket a rendszerekbe.

A jobb keveredés mellett, csökkenthetőek az üzemeltetési és karbantartási költségek, továbbá csökken a tartózkodási idő. A statikus keverők, olyan nem mozgó betétek, amelyek az áramlás kinetikáját felhasználva intenzív keresztirányú keverést létesítenek az adott rendszerben. [NÉMETH, 1995; VARGA et al., 2019].

A kereskedelemben kapható legismertebb statikus keverőket a 9. táblázatban mutatom be [GHANEM et al., 2013; THAKUR et al., 2003].

9. táblázat: A kereskedelemben forgalmazott statikus keverők és gyártóik [GHANEM et al., 2013; THAKUR et al., 2003]

Gyártó	Modell
Chemineer-Kenics	KM, HEV, KMX, KME, Thermogenizer, Ultratab, WVM
Sulzer	SMF, SMN, SMR, SMRX, SMV, SMX, SMXL, SMI, KVM, CompaX
Ross Engineering	ISG, LPD, LLPD
Komax Systems	Komax, Custody Transfer, Ozone Mixer, GGM, FRP, Channel Mixer, Triple Action Mixer
Alfa Laval	ART Plate Reactor
Westfall Manufacturing	Model 2800 Plate Type Mixer
Fluitec	CSE-XR
ZelenTech	ZT-MX
Wymbs Engineering	HV, LV
Lightnin	Inliner Series 45, Inliner Series 50
EMI	Cleveland
Bran and Luebbe	N-form
Toray	Hi-Toray Mixer
Prematechnik	PMR
UET	Heliflo (Series, I, II and III)
Noritake	N10, N16, N26, N60
Hazai gyártók	
StatMIX Kft	TETRAMIX, Turbomix
Szelence Képviselési Kft	Statiflo statikus keverő

Abban az esetben ha növeljük a folyadék áramának turbulenciáját a membránban, csökken a koncentráció-polarizáció mértéke, a gélréteg képződése és a póruseltömődés. Kutatók a tej ultraszűrésénél figyelték meg, hogy a mikro-, és ultraszűrő csőmembrán statikus keverővel (Kenics) való kombinálásának segítségével növelhető a szűrletfluxus, illetve csökkenthetőek az üzemi költségek. Elősegítve ezzel a folyamat hatékonyabb működését. A membránszűrés során 30 darab Kenics statikus keverő (6,35 mm belső átmérő) került beépítésre a membrán modulba (Membralox™ T1-70) elhelyezett egyjáratú kerámiacső membránokba (250 mm hosszú, 6,8 mm belső átmérő) [KRSTIC et al., 2002].

2.9 Membránműveletek tejipari alkalmazás

Az Alfa Laval által kifejlesztett Bactocatch rendszerben a nyers tejet zsírszegény tejre és tejszínre választják szét. A membránszűrés során, a sűrítmény (retentátum) tartalmazni fogja a tejben található baktériumok és spórák jelentős mennyiségét, míg a szűrletben (permeátumban) jelentős mértékben csökken a mennyiségük. A retentátumot ezután standard mennyiségű tejszínnel keverik össze, majd ezt követően a keveréket hőkezelésnek vetik alá (pasztörizálás), majd visszavezetik a permeátumba. Azáltal, hogy a tejnek mindössze csak a 10%-át vetik alá hőkezelésnek, jelentősen javul az érzékszervi minősége. Az így alkalmazott Bactocatch rendszernek köszönhetően jelentős mértékben nő a tej eltarthatósági ideje, 12-ről 45 napra 4 °C-os tárolási hőmérséklet mellett, mely megfelel az ESL (Extended Shelf Life) minőségi kategóriának.

A baktériumok és spórák eltávolításával nem csak jobb minőségű, növelt eltarthatósági idővel rendelkező tejet lehet előállítani, hanem az eltávolított spóráknak és baktériumoknak köszönhetően javul az egyes savófehérje-koncentrátumok és izolátumok minősége. Az előállított savófehérje-koncentrátumok és izolátumok megőrzik funkcionális tulajdonságaikat, elkerülve az értékes komponensek hőkezelés során történő denaturációját/kicsapódását. A tejsavófehérjéket más termékek funkcionális tulajdonságainak a javítására alkalmazzák, ezzel javítva az egyes termékek gélképző és emulzifikáló tulajdonságát [KUMAR et al., 2013].

HENNING és munkatársai 2006-os kutatásai során megállapítható, hogy a sajtgyártás területén egy teljesen új szegmens válik elérhetővé a membránszűrés alkalmazásával. A membránszűrés során kapott sűrítmény alkalmazása, mint sajtgyártás alapanyaga, jelentősen csökkenti az előállítási és gyártási költségeket a sajtgyártás során.

Emellett csökkenthető a gyártási idő, mely további előnyös gazdasági mutatókkal jár. A javuló tápanyag összetétel mellett nagyobb hozam volt elérhető a sajtgyártás során, mely a megnövekedett szárazanyag tartalomnak volt köszönhető.

A κ – kazeinek és glikomakropeptidek (GMP) elválasztásával irányítható, csökkenthető az *E. coli* sejtek bélfalakon való megtapadásának a képessége, melynek gyógyszerészeti jelentősége van [KUMAR et al., 2013].

A sajtgyártáshoz felhasznált minden 100 kg tej 10-20 kg sajtot és 80-90 kg tejsavót eredményez. A tejsavó a sajtgyártás mellékterméke, amit sokáig értéktelennek tartottak, így megszabadultak tőle.

Később felfedezték, hogy kiváló tápanyagforrás, ugyanis a gyártás után a 93,0-94,0% vizen kívül az eredeti tejből laktózt, oldható fehérjéket, ásványi anyagokat, tejsavat és zsírokat, valamint egyéb összetevőket, például citromsavat, és nem fehérje nitrogénvegyületeket tartalmaz (NPN – Non Protein Nitrogen) [AGUERO et al., 2017].

A tejsavó feldolgozására a leggyakrabban alkalmazott membránszűrési eljárás az ultraszűrés, amelyet az 1970-es évektől alkalmaznak tejfeldolgozó iparban. Az alkalmazott technikával lehetőség van a tejsavófehérjék koncentrálására. A laktóz és az ásványi-anyagok a membrán pórusain átjutnak és permeátumként távoznak a savóból. Az így keletkezett tejsavó-koncentrátum táplálék-kiegészítőként, vagy funkcionális élelmiszerek összetevőiként kerülnek felhasználásra [DUKE és VASILJEVIC, 2015].

A tejiparban a membránszűrés kiemelt szerepet képvisel, ugyanis a membránszűrés alkalmazásával növelhető a tejtermékek funkcionális tulajdonsága. Az esetek jelentős részében a membránszűrés bizonyos komponensek dúsítását jelenti (α -laktalbumin, laktoferrin, immunglobulinok).

Az α -laktalbumint és az immunglobulinokat csecsemő tápszerekben, a β -laktoglobulint felületaktív tulajdonságainak köszönhetően stabilizátorként használják cukrászsütemények esetében. A csökkentett allergéntartalmú termékek előállításának központi eleme jelenleg a csecsemőtápszerek előállításában mutatkozik meg. További kutatások alapján membránbioreaktorok alkalmazásával csökkentett allergéntartalmú tej is előállítható, mely a későbbiekben alapját képezheti az allergénmentes tejtermékek előállításának [MAZZEI et al., 2010; AKIN et al., 2012].

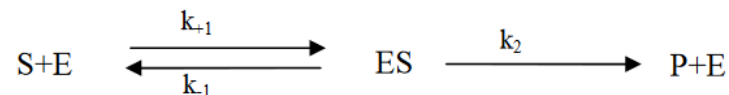
2.10 Enzimes hidrolízis

Doktori munkám során a bioaktív peptidok előállítását enzimes hidrolízis alkalmazása mellett végeztem el, melyet a 2.8-as fejezetben mutatom be. Az enzimek számos biológiai folyamatot irányítanak és az iparban számos területén alkalmazzák őket különböző termékek előállítására.

2.10.1 Enzimkinetika

Az enzimreakciók kinetikáját Leonor Michaelis és Maud Menten írta le először az 1913-as években [DIXON és WEBB, 1964].

A Michaelis-Menten modell szerint az enzimkinetika alapját képezi az adott enzim (E) és szubsztrát (S) által képződő intermedier komplex (ES), mely további reakciók során alakul terméké (P). Az alábbi kinetikai modell az alábbiak szerint írható fel (15):



A modell első felében a folyamat reverzibilis, míg a második szakaszában már irreverzibilis. Az alkalmazott modell esetében feltételezzük, hogy a szubsztrát koncentrációja (S) nagyobb mint az enzimé (E), továbbá mennyisége időben állandónak tekinthető:

$$(E_t) = (E) + (ES) \quad (16)$$

Ahol, az E_t a teljes enzimkoncentráció, E a szabad állapotban lévő enzimkoncentráció, ES pedig az enzim-szubsztrát komplexben lévő enzimkoncentráció. A sztöchiometriai egyenletre felírhatjuk a koncentrációk időbeli változását:

$$\frac{d(P)}{dt} = k_2 (ES) \quad (17)$$

Az egyenletből jól látszik, hogy a termékképződés időbeli változása arányos az enzim-szubsztrát komplex koncentrációjával. Az alábbi egyenlet ismeretében felírható az enzimreakciók kinetikáját leíró alapegyenletet:

$$v = \frac{k_2 (E_t)(S)}{K_S + (S)} \quad (18)$$

Ahol, v a reakciósebesség, K_S (k_{-1}/k_1) a Michaelis-Menten állandó. Abban az esetben ha a szubsztrát (S) koncentrációja nagy, az enzim teljes mennyisége komplex formában lesz

megtalálható (ES), melynek következtében a reakciósebesség maximális értéket képvisel, mely szerint a (17)-es egyenlet az alábbiak szerint változik, mely a Michaelis-Menten egyenlet közismert formája:

$$v = \frac{v_{MAX}(S)}{K_S+(S)} \quad (19)$$

2.10.2 Proteáz enzimek

A proteázok a fehérjebontó enzimek csoportjába tartoznak. Létfontosságú szerepet töltenek be mind az állati mind pedig a növényi szervezetekben, így mindkét csoportban megtalálhatóak a proteáz enzimek. Hasítási mechanizmusuk a fehérjékben lévő peptidkötések bontásával valósul meg, melynek során a fehérjékben lévő peptidkötéseket az enzimek tovább hidrolizálják aminosavakra. Az egyes proteáz enzimek mind egy-egy speciális szekvencia mentén hasítanak, így minden enzim specifikusnak tekinthető az aminosavakra. A proteáz enzimeket két további alcsoportba sorolhatjuk, az endo- és exopeptidázok csoportjába.

Azokat a proteázokat, amelyek a fehérjelánc belsejében hasítanak endopeptidázoknak, míg a lánc végén bontókat exopeptidázoknak nevezzük.

Ipari alkalmazás tekintetében az endopeptidázok alkalmazása terjedt el leginkább, ebbe a csoportba sorolhatók a szerin proteinázok (tripszin, kimotripszin), tiol proteinázok (papain), savas proteinázok (pepszin, kimozin) és a fémtartalmú proteinázok [MEHTANI et al., 2013].

A proteáz enzimeket az élelmiszeripar számos területén alkalmazzák, ilyen például a szója szósz előállítás, húspuhítás és további élelmiszeripari hidrolizátumok gyártása. Az enzimes hidrolízisnek azonban hátrányai is vannak. AKHTARUZZAMAN és munkatársai 2012-es munkája során látható, hogy a szójafehérje hidrolizátumok esetében jelentős mértékű a keserű íz komponens megjelenése. A keserűség mértéke az adott hidrolizátumban nagymértékben függ a fehérjében található hidrofób kötések számától. Azonban ez a keserűség csökkenthető olyan enzimek alkalmazásával, melyek a hidrofób kötések mentén hasítanak [AKHTARUZZAMAN et al., 2012].

SHU és munkatársai 2018-as munkájukban tehéntej és kecsketej hidrolízisét vizsgálták négy különböző enzim (alkalikus proteáz, tripszin, bromelin, papain) alkalmazása mellett, mely során vizsgálták az alkalmazott paraméterek (enzim koncentráció, tartózkodási idő) függvényében a hidrolízis fokát (DH – Degree of hydrolysis) és az ACE (angiotenzin-konvertáló enzim) mennyiségét.

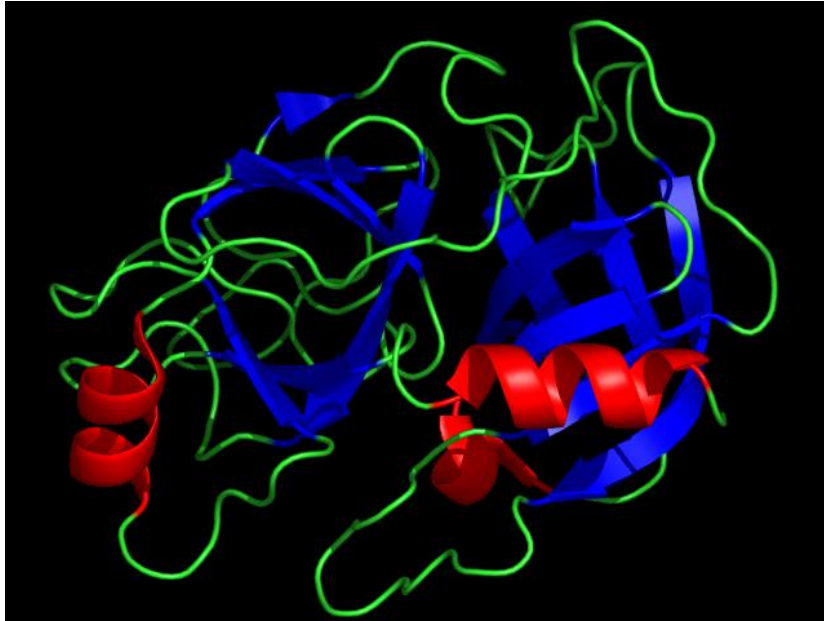
A hidrolízis foka az alkalmazott négy enzim közül az alkalikus proteáz esetében volt legmagasabb (DH = 60%), ahogyan az ACE enzim gátló mennyisége is ebben az esetben volt a legnagyobb (ACE = 70%). Továbbá az elvégzett kísérletek alapján jól látható, hogy a hidrolízis foka és az ACE gátló enzim mennyisége között nem áll fent szoros kapcsolat [SHU et al., 2018].

A fehérjék hidrolízise, hidrolizátumok előállítása során keserű peptidek szabadulhatnak fel, melyek jelentősen megnehezítik az egyes fehérjehidrolizátumok gyakorlati alkalmazhatóságát. A fehérjék oldhatósága és a hidrolízis hatásfoka közvetlenül befolyásolja a kialakuló keserű peptidek arányát, mennyiségét. CUI és munkatársai 2021-es kutatása során megállapítást nyert, hogy az alkalázattal végzett enzimes hidrolízis során nagyobb arányban szabadulnak fel keserű peptidek, míg a Protamex enzim alkalmazása esetén már kisebb mennyiségben voltak detektálhatóak a keserű ízt okozó peptidek. Empirikus összefüggés áll fent a peptidek hidrofóbicitása és a keserű íz között, mely szerint a hidrofób aminosavakból nagyobb eséllyel keletkeznek keserű peptidek, ellenben a hidrofil aminosavakkal. Ezt a korrelációt Q-szabályként, értéként ismerik, mely az 1400 cal/mol-nál nagyobb Q-értékkel rendelkező peptidek esetén keserű íz jelenlétére utal [MAHASHI et al., 2008; CUI et al., 2021].

2.10.3 Tripszin enzim

A tripszin egy endopeptidáz (EC 3.4.21.4) enzim, mely a szerin proteázok csoportjába tartozik, ezen csoport közös jellemzője hogy aktív centrumukban szeril- és hisztidil-oldallánc található, szerkezeti struktúrája a 6. ábrán látható. A szerin proteáz enzimek a fehérjék bontását végzik és számos gerinces élőlény emésztőrendszerében megtalálhatók.

Molekulatömege 23,8 kDa, szintézise a hasnyálmirigyben történik inaktív acinussejtekben inaktív prekursorok (zimogének) formájában, mely a bél nyálkahártyájából bélhámsejtek kefeszegélyében található enterokináz enzim hatására aktív formává alakul. Katalitikus hatását bázikus közegben fejt ki, melynek optimális tartománya pH 7-11 közötti.



6. ábra: Tripszin enzim szerkezeti felépítése [LEIROS et al., 2004]

Az aktív centrumban bont, jellemzően a szerin oldallánc a katalitikus hely. Fehérjék esetén az Arg és a Lys oldalláncot hasítja a C-terminálisa felől. A termékei a poli- és oligopeptidek és az aminosavak.

Az enzim specifitásáért a katalitikus zsebben található negatív aszpartát rész felelős, melynek hatására a pozitív töltésű lizin és / vagy arginin rész stabilizálódása, illetve vonzása történik [UMEYAMA et al., 1984].

Hatásmechanizmusa a többi szerin proteáz enziméhez hasonló, katalitikus triádot tartalmaznak, mely a hisztidin -57, aszpartát -102 és szerin -195 helyen található. A tripszin enzim által katalizált enzimes reakciók termodinamikailag kedvezőek, azonban jelentős aktiválási energiát igényelnek [POLGÁR, 2005].

A tripszint széles körben alkalmazzák különféle fehérje szekvenálás és különféle aminosav elemzések során. Előnyös tulajdonságai közé tartozik, hogy aktivitását hosszú időn át képes megőrizni alacsony hőmérsékleten mind liofilizált, mind pedig oldat formában alacsony pH értéken tartva [BAIRD, 2013].

KIM és munkatársai 2007-es munkájuk során számos enzim működését vizsgálták tejsavó fehérje koncentrátumok hidrolízisével. Vizsgálataik során a natív, előmelegített savófehérje hidrolizátumokat 50°C-on, különböző enzimkoncentrációk és kezelési idők mellett vizsgálták (30- 60- 90 perc; 0,1%, 0,5% és 1% pepszin és 0,1%, 0,5% és 1% tripszin).

Az elvégzett kísérletek során megállapítást nyert, hogy a hidrolízis foka/mértéke (DH) nagyobb enzimkoncentráció és hosszabb kezelési idő esetén magasabb volt. A legmagasabb fokú hidrolízis az 1% pepszin és 1% tripszinnel való 120 percig tartó kezeléskor volt mérhető.

A natív állapotban lévő α -laktalbumin és β -laktoglobulin esetében különböző a degradáció mértéke. Az α -laktalbumin degradációja 0,1% pepszin és 0,1% tripszinnel való kezelés esetén minimális mértékű volt, azonban az alkalmazott enzimek 0,5%-os koncentrációjában 60 perces kezelési idő esetén a hidrolízis teljesen végbement. Natív tejsavó koncentrátumok esetében az alkalmazott enzimek nem fejtettek ki hatást a β -laktoglobulin esetében [KIM et al., 2007].

Hasonló eredményeket kaptak abban az esetben mikor Proteáz 2A és tripszin enzimekkel hidrolizálták a savófehérjéket. Az eredmények szintén azt mutatták, hogy magasabb enzimkoncentráció esetén magasabb fokú hidrolízis volt mérhető, azonban különböző volt a hidrolízis után felszabaduló szabad aminosavak összetétele. Az alkalmazott Proteáz 2A esetében ugyan nagyobb volt a felszabaduló szabad aminosavak mennyisége, azonban kisebb specifitás volt megfigyelhető. Tripszin esetében magas lizin koncentráció volt mérhető mely az enzim specifitásából adódik [PINTADO et al., 1999].

A tejfehérjék tripszinnel végzett enzimes hidrolízise elősegíti a peptidek baktériumsejtekbe való bejutását, ugyanis a hidrolízis során a fehérjék molekulatömege csökken, a fehérjék peptidekké hasadnak. Kutatások bebizonyították, hogy az enzimes hidrolízis során a fehérjesűrűség antioxidáns kapacitása az alkalmazott DPPH és FRAP vizsgálatokkal mérve alacsonyabb abban az esetben, ha a hidrolízis a mikrobiális fermentáció után történik. Ez azzal magyarázható, hogy az alacsony molekulatömegű peptidek transzportja sokkal könnyebben végbe megy intracelluláris környezetben, ahol is különféle nitrogén metabolitokká majd ezt követően aminosavakká alakulnak [KUNJI et al., 1996].

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

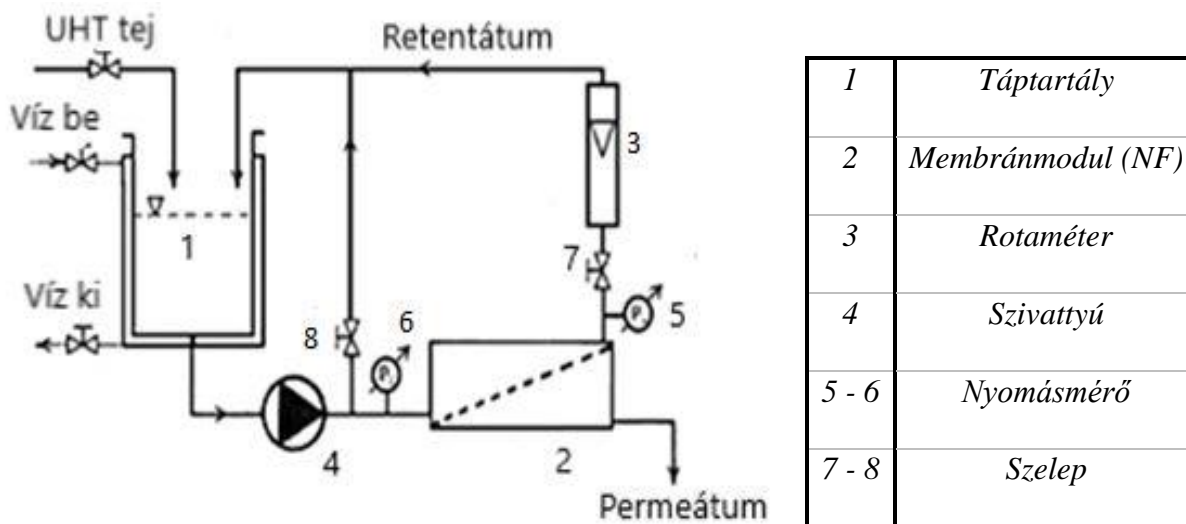
3.1 Alkalmazott UHT (Ultra High Temperature) tej

Doktori munkám során UHT tehéntejet használtam, mivel annak eltarthatósági ideje jobb, mint az ESL tejé. Továbbá, az UHT tejben lévő fehérjék koagulációjának az esélye a tripszinnel végzett hidrolízis és mikrobiális fermentáció alkalmazása mellett elhanyagolható az ESL tejhez képest.

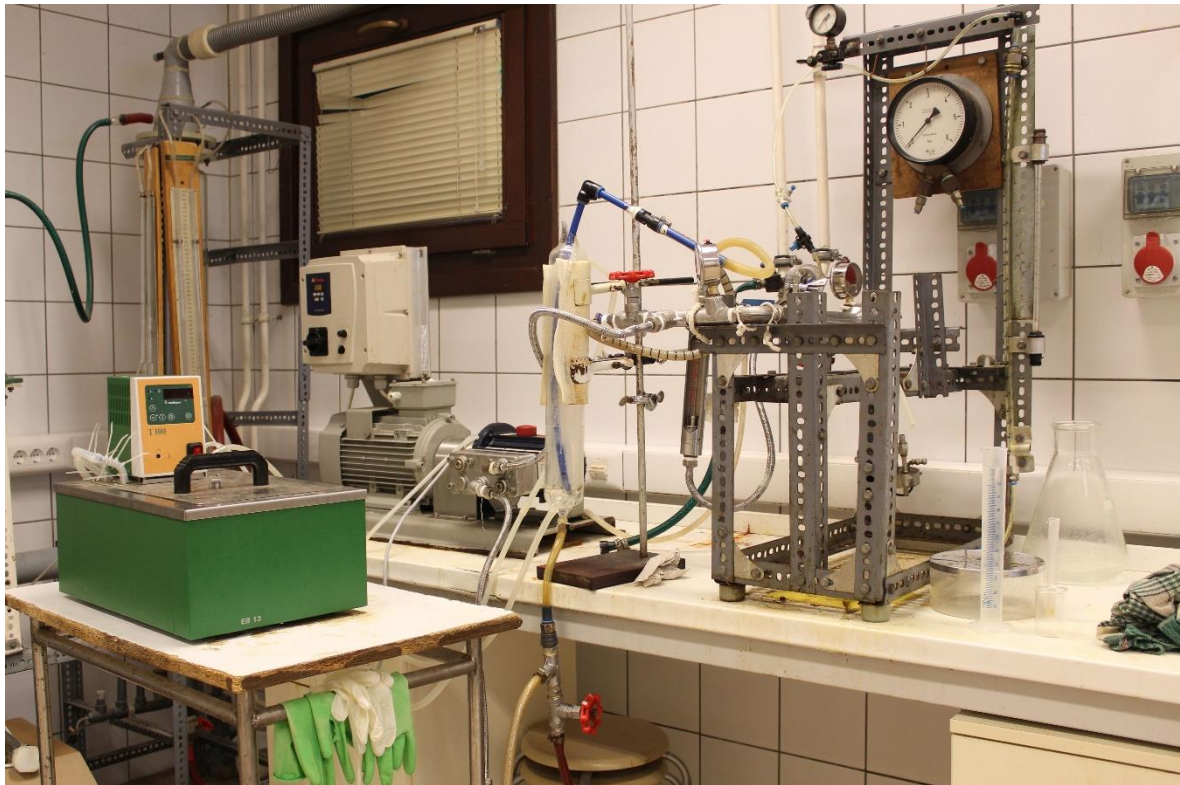
Az UHT tehéntejet (Riska Zero UHT tej 1 l - 0,1%) a SPAR Magyarország Kereskedelmi Kft Budapesti szupermarketében vásároltam. A vizsgált UHT tej tejfehérje, laktóz és zsírkoncentrációja átlagosan $31 \pm 0,1$ g/L, $47 \pm 0,84$ g/L és $1 \pm 0,12$ g/L érték volt, míg a pH-ja 6,8. A feldolgozásra kerülő mintát $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk hűtőszekrényben.

3.2 Membránszűrő berendezés

A laboratóriumi kísérleteket a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet Élelmiszeripari Műveletek és Folyamattervezés Tanszékén összeállított membránszűrő berendezésen végeztem (7-8. ábra). A membránszűrés során kapott sűrítményt (retentátum) további kezeléseknek vettem alá, melyet a 9. ábra mutat be.

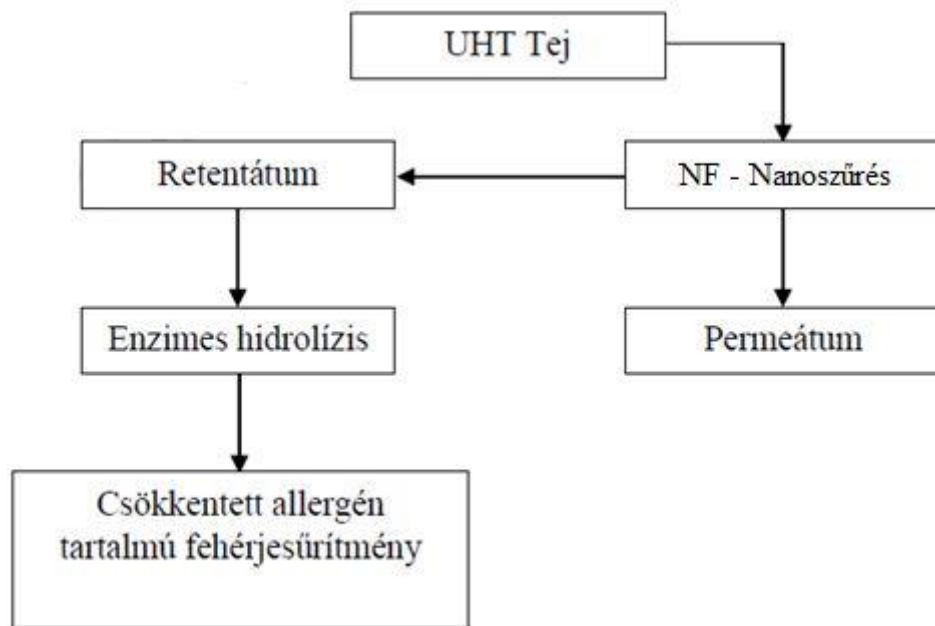


7. ábra: UHT tej nanoszűrésére kialakított membránszűrő berendezés



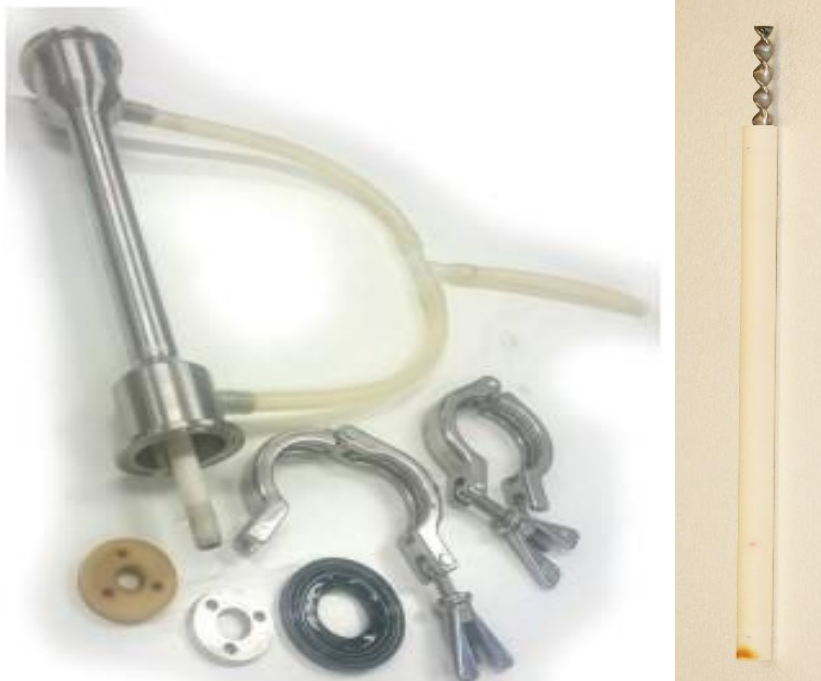
8. ábra: UHT tej nanoszűrésére kialakított membránszűrő berendezés

Az UHT tej betöltése egy duplafalú üvegtartályba történt, melynek köpenyterét termosztáthoz kapcsolva állandó hőmérsékletet lehetett fenntartani. A keresztáramban működtetett membránszűrő berendezésben a betáplált tej kétféle úton tud haladni a berendezésen belül. Az egyik áramlási irányban a tej, a szivattyún, membránmodulon, rotaméteren, majd végül a táptartályon keresztül vezet, míg a másik esetben egy Bypass elkerülő ágon át. A tej áramlását, a membránszűrő berendezéshez kapcsolt szivattyú segítségével tartottam fent, míg a retentátum és permeátum oldali nyomáskülönbséget a modul be és kivezető szakaszához csatlakoztatott nyomásmérővel állítottam be.



9. ábra: Csökkentett allergéntartalmú bioaktív peptidek előállításának technológiája tejfehérjesűrítményből

Az alkalmazott UHT tej sűrítése kerámia csőmembrán alkalmazásával történt, amit egy rozsdamentes acélból készült egycsatornás keresztáramú membránmodulba helyeztem, melyet a 10. ábra mutat be. A membrán aktív felülete titánium-oxidból, valamint alumínium-oxidból áll.



10. ábra: Egycsatornás keresztáramú membránmodul (NF = 5 nm) statikus keverő beépítése előtt

A membránszűrő berendezésben alkalmazott szerelvények típusait az alábbiakban mutatok be:

- Nanoszűrő membrán: Membralox® T1-70 , Pall Corporation, Crailsheim, Németország, pórusméret: 5 nm, aktív felület: 0,005 m²
- Szivattyú: Modell – E2-203-H1FN4S, 2,2 kW 3HP
- Rotaméter: P típusú saválló 1/2" 252215 kódú; mérési tartomány: 60 - 600 L/h
- Nyomásmérő: EN837-316SS WIKA; mérési tartomány: 0-6 bar; felbontás: 0,2 bar
- Szelepes csap: 1/2" (RB-RS12)
- Statikus keverő: Spirális kialakítású (Inox, Backi Petrovac, Vojvodina, Szerbia)

A tej hőmérsékletét a membránszűrőhöz kapcsolt termosztáttal tartottuk stabil 25 °C-on, amely a tartály köpenyterében áramoltatta a vizet. A térfogatáramot rotaméter segítségével, a nyomást pedig szelepekkel állítottam be. A membránszűrés során egy rozsdamentes acélból készült statikus keverőt (SS316) használtunk a fluxus értékének növelése és a koncentráció polarizáció értékének csökkentése érdekében. A statikus keverőt az alkalmazott kerámiacső membrán belsejében helyeztem el, mely statikus keverő rögzítését egy egyszerű dróttal végeztem el, amit a fém keverőbe fűrt lyukon fűztem át. A kereskedelemben kapható csőmembránt módosítottam egy 6,5 mm átmérőjű, 241 mm hosszú statikus keverővel, mely a rendszerből bármikor eltávolítható, illetve cserélhető. Az nanoszűrő membrán és a statikus keverő részletes leírását a 10. táblázat mutatja be.

10. táblázat: NF membrán és az alkalmazott statikus keverő karakterisztikája

Kerámiaacsó membrán karakterisztikája		Statikus keverőelem	
Pórusméret	5 nm	Menetemelkedés- átmérő arány; (Lead/Diameter)	2
Hossz	250 mm	Átmérő	6,5 mm
Belső átmérő	7 mm	Teljes hossz	241 mm
Külső átmérő	10 mm	Menetemelkedés	13,2 mm
Aktív felület	$5 \times 10^{-3} \text{ m}^2$	Keverőelemek száma	36
Aktív réteg	Titánium oxid	Vastagság	1,2 mm
Támasztó réteg	Alumínium oxid	Anyag	Rozsdamentes acél (SS316)

A szűrés során a sűrítési arány (VCR – Volume Concentration Ratio) értéke minden esetben kétszeres volt, a betáplált tejet a felére sűrítettem. A membránszűrést szakaszos üzemi mód mellett végeztem. Szakaszos üzemi mód esetében a táptartályba 1,4 L UHT tejet töltök, majd a membránszűrés során 700 mL értékre sűríttem be.

Kísérleteim során vizsgáltam továbbá a membránszűrés energiafogyasztását, melyhez a működési paramétereket változtattam. A transzmembrán – nyomáskülönbséget (TMP) 2 – 3 bar érték, a recirkulációs térfogatáramot (RFR) 100 – 200 L/h között változtattam statikus keverő alkalmazásával és nélküle.

A szűrés végeztével a nanoszűrő membránt többlépcsős vegyszeres tisztításnak vettem alá, ami elengedhetetlen a membrán következő kísérletben való alkalmazásához. Az alkalmazott membrán tisztítása és kondicionálása után ionmentes vízzel végeztem el a tiszta víz fluxus mérését.

A berendezés mosását lúgos és savas pH-jú vegyszerek kombinált használatával továbbá a vegyszeres mosások között ionmentes vízzel végeztem. A mosás paramétereit az alábbiakban részletezem: (1) lépésként 10 g / L koncentrációjú P3-11 kódú Ultrasil oldattal végeztem 30 percen keresztül amit (2) 30 perces ionmentes vízzel való mosás követett. Ezt követően a (3) lépésként 10 g / L citromsavat használtam, szintén 30 percen keresztül majd (4) a folyamat végén ionmentes vízzel 1 órán át mosom a membránt. Az Ultrasillel és a citromsavval végzett tisztítás során 200 L / h recirkulációs térfogatáramot és 0,8 bar transzmembrán nyomást alkalmaztam, míg az ionmentes vízzel való tisztítás során 5 bar transzmembrán nyomást és 200 L / h recirkulációs térfogatáramot alkalmaztam.

A permeátum fluxusának meghatározását a (2) összefüggés alkalmazásával számítottam ki.

A membránszűrő berendezés táptartályába töltött UHT tej mennyiségének a felére csökkenésének pillanatában ($VCR = 2$), számítható a folyamat során a szűrlet fluxusának csökkenése a kezdeti és a végállapot ismeretében az alábbi egyenlet alkalmazása mellett:

$$\Delta J (\%) = (J_{Initial} - J_{Final}) \cdot 100 / J_{Initial} \quad (20)$$

Ahol, a ΔJ a permeátum fluxusának csökkenése [%], $J_{Initial}$ a kezdeti fluxus [$L/(m^2h)$], J_{Final} a szűrés végén mért fluxus érték [$L/(m^2h)$] [NATH et al., 2017].

A nanoszűrés során a membránmodul belépő és kilépő oldalán mért nyomás értékek regisztrálása folyamatos volt, mely adatok ismeretében meghatározható volt a membránszűrés energiaigénye, az alábbi egyenlet alapján:

$$E_S = (Q_r \cdot \Delta p) / (J_{Initial} \cdot A) \quad (21)$$

Ahol az E_S a membránszűrés folyamán mért energiafogyasztás [kWh/m^3], Q_r a recirkulációs térfogatáram [$L/(m^2h)$], Δp a nanoszűrés során mért nyomáskülönbség [$Newton/m^2$], A a membrán aktív felülete [m^2], $J_{Initial}$ a kezdeti fluxus [$L/(m^2h)$] [NATH et al., 2017].

3.3 Tejfehérje sűrítmény enzimes hidrolízise

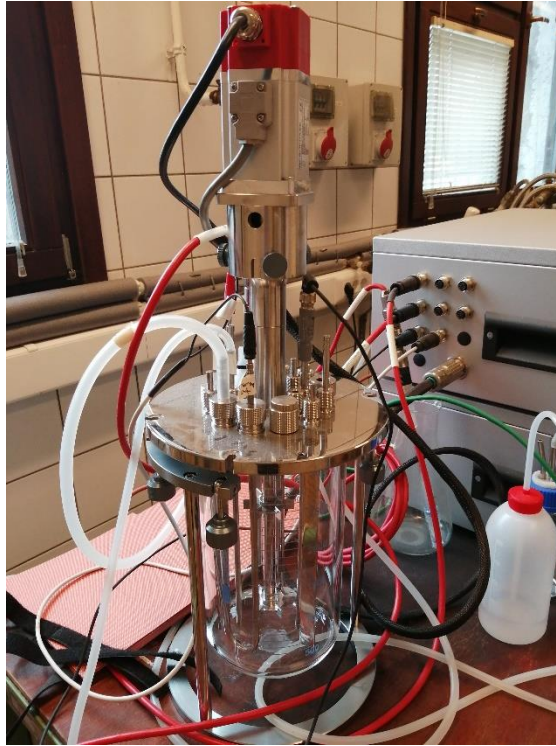
A bioaktív peptidek előállításához a membránszűrés során keletkező retentátumot (fehérje sűrítmény) használtam. Az enzimes hidrolízis megkezdése előtt a sűrítményt 1 órán keresztül 40 °C-on inkubáltam. Az inkubálást és az enzimes hidrolízist a Solida Biotech (München, Németország) által forgalmazott laboratóriumi bioreaktorral végeztem, mely a 11. ábrán látható.

Az alkalmazott bioreaktor lehetőséget nyújt számos működési paraméter egyidejű szabályozására, jelen esetben dinamikus szabályozást tesz lehetővé a hőmérséklet, pH értékében. A Solida Biotech bioreaktorának magasság/átmérő aránya H/D 2:1-hez arányú, kapacitása 600 mL. A fehérjesűrítmenyt az inkubációs idő letelte után különböző koncentrációban kezeltem tripszin enzimmal, mely koncentrációk a következők voltak: N1=0,008 g/L, N2=0,016 g/L, N3=0,032 g/L. Tripszin enzimmént (EC 3.4.21.4) a Sigma-Aldrich által forgalmazott liofilizált T8658 (CAS 9002-07-7) készítményt használtam, melynek molekulatömege 23,8 kDa. A három enzimm koncentráció elkészítéséhez 450 µL, 900 µL, 1,8 mL tripszinoldatot törzsoldatból (tripszin koncentrációja 0,009 g/mL) injektáltam egy 0,22 µm-es steril hidrofil poliéter-szulfon (PES) fecskendőszűrőn (LAB-EX Laborkereskedelmi Kft, Budapest) keresztül a tartályba töltött 500 mL sűrítmenybe [CHEISON et al., 2010].

A tripszin törzsoldat elkészítéséhez 0,009 g tripszin enzimet és 1 mL desztillált vizet használtam. A vizsgált tripszin törzsoldat enzimaktivitása 15,6 AU/(s·µg) volt. A tripszin enzimmal végzett hidrolízis során az egyes enzim koncentrációkhoz tartozó enzimaktivitás értékek a következőképpen alakultak: 0,008 g/L (0,014 AU/(s·µg)), N2=0,016 g/L (0,028 AU/(s·µg)), N3=0,032 g/L (0,056 AU/(s·µg)).

A fehérjesűrítmeny enzim hidrolízisét 40 °C-on 10 percig 175 rpm (Revolutions Per Minute) értéken végeztem. Az enzim hidrolízis folyamata közben a koncentrátum pH értéke 6,8-as értékre volt beállítva, melyet a bioraktor automatikus szabályozásának köszönhetően folyamatos kontroll alatt lehetett tartani. A stabil pH érték 2 N-os Nátrium Hidroxiddal volt biztosítva.

A 10 perces enzim kezelés befejezését követően fecskendő segítségével 20 mL mintát távolítottam el a rendszerből, majd azt egy mintatartóba helyeztem. Az inaktiválását 70 °C-on 30 percig végeztem, mely esetben a bioreaktor hőmérséklet értékét állítottam át, míg a keverés fordulatszámát azonos értéken tartottam. Az inaktiválási hőmérséklet értékét szakirodalmi források alapján nem javasolt 70 °C fölé emelni, ugyanis α-laktalbumin és a β-laktoglobulin 75 °C fölötti hőmérsékleten kicsapódhat. Az inaktiválás után a mintákat szobahőmérsékletre (25 °C) hűtöttem, és így készen álltak a további vizsgálatok elvégzésére [ELFAGM és WHEELLOCK, 1978].



11. ábra: Solida Biotech bioreaktor

3.4 Mikrobiális fermentáció

A fermentációt CHR Hansen FD-DVS YF-L812 Yo-Flex® (Nienburg, Germany) típusú starter kultúrával végeztem, mely liofilizált formában tartalmazta a *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* és *Streptococcus thermophilus* mikroba törzseket.

Az enzim deaktiválása után a tejfehérje-koncentrátum hőmérsékletét 45 °C-ra csökkentettem. A hűtést követően, a további vizsgálataimhoz a Solida Biotech bioreaktorban előállított 500 mL tejfehérje-koncentrátumot használtam. Doktori munkámban a glükóz, fermentációra gyakorolt hatását 50 mL térfogatú falcon csövekben vizsgáltam, mely során az 500 mL sűrítményt minták szerint falcon csövekbe töltöttem szét. Ebből a célból 45 mL nanoszűrt tejfehérje-koncentrátumhoz és enzimekkel kezelt folyékony tejfehérje-koncentrátumhoz aseptikus körülmények között külön hozzáadtam 1,35 mL 40% -os steril glükóz törzsoldatot egy 0,22 µm-es hidrofil poliéter-szulfon (PES) fecskendőszűrőn keresztül. Az elkészített minták glükóz koncentrációja 30 g/L volt. A steril glükózoldat elkészítéséhez a desztillált vizet autoklávba helyeztem, majd 121 °C-on 15 percig kezeltem. Ezt követően hozzáadtam a szükséges glükóz mennyiségét, majd 60 °C-on enyhe rázatás mellett elegyítettem az oldatot.

A korábbiakhoz hasonlóan hőmérséklet- és pH-érzékelő szondát (Testo 206-pH1, Testo-AG, Reutlingen, Németország) helyeztem a fermentációs közegbe, hogy a fermentációs folyamat hőmérsékletének és pH-értékének percenkénti rögzítését az erjesztési folyamat során nyomon követhessem. A hőmérséklet- és pH-érzékelő szondát a fermentációs közegbe való helyezés előtt, 70 %-os etanollal fertőtlenítettem, elkerülve ezzel a minták szennyeződését.

Mindegyik mintát inkubátorban (HACH, Düsseldorf, Németország) a fermentáció hőmérsékletére előmelegítettem, hogy elérje a 45 °C-os hőmérsékletet, majd ezt követően az egyes mintákba 30 µL törzstenyészetből származó kultúrát oltottam be.

Breed módszere szerint a *Streptococcus thermophilus* és *Lactobacillus bulgaricus* fermentációs közegben megtalálható mennyisége $5,5 \times 10^6$ TEK/mL (Telepképző egység), illetve $1,5 \times 10^7$ TEK/mL volt [BESHKOVA et al., 1998]. A minták fermentálását 45 °C hőmérsékleten 6 órán át inkubátorban végeztem (HACH, Düsseldorf, Németország) [LI et al., 2019].

3.5 Analitikai vizsgálatok

Doktori munkám során különféle analitikai vizsgálatokat végeztem az előállított mintákon, melyeket a 3.5-ös fejezetben mutatok be. Az analitikai vizsgálatok között szerepel, az SDS-poliakrilamid gélelektroforézis, antioxidáns tartalom meghatározás (FRAP, DPPH), ACE gátló enzimek, mikrobiológiai gátlás, fehérjetartalom vizsgálata, illetve a fehérjék immunblottja.

3.5.1 SDS-poliakrilamid gélelektroforézis

Nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) módszert alkalmaztam a kiindulási tej (UHT, Ultra High Temperature), a tejfehérje-koncentrátum (NF, nano filtered), az enzimmel kezelt (N1, N2, N3) és a fermentált minták (N1Y, N1Y+G, N2Y, N2Y+G, N3Y, N3Y+G, NFY, NFY+G) esetében. A minták kódolását, a 11. táblázat mutatja be. A fermentált mintákat starter kultúrával állítottam elő, mely kultúra liofilizált formában tartalmazta a mikroba törzseket. A molekulatömeg szerinti fehérje-eloszlásának meghatározására vertikális gélelektroforézis rendszert használtam (Bio-Rad Mini Protean 3 Cell, Bio-Rad Hungary Ltd). A használt molekula standardok (BioRad, Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, 1610374, USA), illetve kazein (20-30 kDa) és savófehérjék (α -laktalbumin - 14,4 kDa; β -laktoglobulin - 18 kDa) a gél kontroll sávjaira kerültek felvitelre. BioRad power PAC1000 feszültségadó készüléket alkalmazva, a beállított paraméterek a következők voltak: $U = 200$ V konstans; $I = 54$ mA, $P = 11$ W, futtatás idő = 60 perc.

11. táblázat: Vizsgált minták kódolása (SDS-PAGE)

Minta kódok	Minta leírás
NF	NF tejsűrítmény
N1	0,008 g/L tripszinnel kezelt NF tejsűrítmény
N1Y	0,008 g/L tripszinnel kezelt fermentált NF tejsűrítmény
N1Y + G	0,008 g/L tripszinnel kezelt fermentált NF tejsűrítmény + Glükóz
N2	0,016 g/L tripszinnel kezelt NF tejsűrítmény
N2Y	0,016 g/L tripszinnel kezelt fermentált NF tejsűrítmény
N2Y + G	0,016 g/L tripszinnel kezelt fermentált NF tejsűrítmény + Glükóz
N3	0,032 g/L tripszinnel kezelt NF tejsűrítmény
N3Y	0,032 g/L tripszinnel kezelt fermentált NF tejsűrítmény
N3Y + G	0,032 g/L tripszinnel kezelt fermentált NF tejsűrítmény + Glükóz
NFY	Fermentált NF tejsűrítmény
NFY + G	Fermentált NF tejsűrítmény + Glükóz

Az akrilamid és bisz akrilamid tartalmú futtatógél és a gyűjtőgél koncentrációja 15%, illetve 6% volt. A futtatógél és gyűjtőgél elkészítéséhez A- B- C- E- oldatokat használtam melyek összetételüket tekintve az alábbi volt: A-oldat (BioRad 1610156), 30% Acrylamide/Bis Solution, 29:1, 500 ml, B-oldat (pH 8,8): 2 M Trisz-HCl, C-oldat: 0,347 M SDS, E-oldat (pH 6,8): 0,5 M Trisz-HCl. A 15%, illetve 6%-os gélek összetétele: 15%-os elválasztó gél-oldat: 4 ml A-oldat; 1,8 ml B-oldat; 50 µl C-oldat; 2,06 ml desztillált víz; 6 µl TEMED; 50 µl ammónium-perszulfát-oldat, 6%-os gyűjtőgél: 0,5 ml A-oldat; 27,5 µl C-oldat; 0,33 ml E-oldat; 1,6 ml desztillált víz; 3 µl TEMED; 25 µl ammónium-perszulfát-oldat.

A gél zsebeibe a minták felvitele (10 uL) előtt futtató-pufferrel (0,025 M Trisz, 0,0035 M SDS, 0,193 M glicin) töltöttem fel az egyes zsebeket.

Az alkalmazott 15%-os futtatógél elkészítéséhez az alábbi oldatokat használtam: 4 mL A-oldat; 1,8 mL B-oldat; 50 µL C-oldat; 2,06 mL desztillált víz; 6 µL TEMED; 50 µL ammónium-perszulfát-oldat.

A 6%-os gyűjtőgél összeállításához szintén oldatok megadott mennyiségét használtam az alábbiak szerint: 0,5 mL A-oldat; 27,5 µL C-oldat; 0,33 mL E-oldat; 1,6 mL desztillált víz; 3µL TEMED; 25 µL ammónium-perszulfát-oldat.

A minták hígítását 2-merkaptoetanolt tartalmazó Laemmli-féle mintaoldó pufferrel (BioRad 1610737: 2x + 10% β-merkapto-etanol) végeztem, majd 5 percig forraltam a mintafelvétel előtt.

Az elektroforézis befejezése után a szeparált fehérjéket 20 percig fixáltam 20% triklór-ecetsav (TCA) oldatban, melynek összetételét az alábbiakban részletezem: 10% etil-alkohol (96%-os), 5% ecetsav (96%-os). A maradék TCA eltávolításához háromszor 10 percig rázattam a géleket PAGE-mosó oldatban. Ezután 10 percig, 25 °C-on Coomassie Brilliant Blue R-250 festékoldatban rázattam a gélt, majd 10% ecetsav-oldattal távolítottam el a háttérben maradt felesleges festéket. A gélek kiértékelése BIO-RAD Gel Doc 2000 rendszerrel történt.

3.5.2 Antioxidáns tartalom meghatározása

Az elmúlt években az egyes minták antioxidáns tartalmának a meghatározására számos módszert dolgoztak ki. Doktori munkám során e-módszerek közül kettőt alkalmaztam, FRAP és DPPH vizsgálatot, mely mérések elvégzését a 3.5.2-es fejezetben mutatom be. Az antioxidáns kapacitása különböző tényezőktől/faktoroktól függ, melyek a következők: (a) a tej biokémiai jellemzői, (b) az alkalmazott starter kultúra fajtája/ mennyisége, (c) a felhasznált fermentációs technológia, (d) a starter kultúra aktivitása és az alkalmazott antioxidáns kapacitás mérési módszere – DPPH, FRAP, ABTS (e) [YILMAZ-ERSAN et al., 2018].

3.5.2.1 Összes antioxidáns kapacitás meghatározása FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma - Vasredukálóképesség) módszerrel

Az antioxidáns tartalom mérés megkezdése előtt a nanoszűrt tejfehérje-sűrítményt, az enzim kezelt és a fermentált mintákat hőmérséklet szabályozott laboratóriumi centrifugába helyeztem (Z206A; Hermle Labortechnik ;Wehingen, Németország).

Az alkalmazott centrifuga beállításai a következők voltak: fordulatszám - 10000 rpm centrifugálás ideje - 20 perc. A centrifugálás befejezését követően az antioxidáns tartalom vizsgálatát a minták szétválasztása során keletkező felülúszón végeztem el.

Az összes antioxidáns tartalom meghatározását FRAP módszer (Ferric Reducing Antioxidant Power) alkalmazása mellett aszkorbinsav standard használatával végeztem el. A FRAP módszer lényege, hogy a vas (Fe^{3+}) ionok az antioxidáns aktivitású vegyületek hatására vas (Fe^{2+}) ionokká redukálódnak. A vas ionok alacsony pH esetén a 2,4,6 trypiridil-s-triazinnal (TPTZ) komplexet képezve intenzív kék színt kapunk, amelyet 593 nm-es hullámhosszon spektrofotométerrel (UV-VIS) határozzuk meg (Evolution™ 300; Thermo Scientific™, Waltham MA, USA).

A hígított 100 μ L felülúszóhoz 2,9 mL reagenst adtam, melyet a következők szerint készítettem el: 5 mL 20 mM vas-klorid + 5 mL 10 mM 2,4,6 trypiridil-s-triazinnal, 40 mM sósav + 50 mL 300 mM nátrium-acetát puffert kevertem össze pH = 3,6-os érték beállításához. Az így elkészült mintákat 35 °C-os hőmérsékleten 30 percig inkubáltam (HACH, Düsseldorf, Németország). Vak minták elkészítéséhez 100 μ L desztillált vizet és 2,9 mL reagenst használtam [BENZIE és STRAIN, 1996].

3.5.2.2 Gyökfogó kapacitás mérése DPPH (2,2-diphenyl-1-1-phydrylhydrazyl - Gyökfogó kapacitás) módszer alkalmazásával

A DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) módszer működését tekintve eltér az előző fejezetben megismert FRAP módszerétől, ugyanis ebben az esetben a DPPH egy stabil szabadgyök, melynek lila színe az antioxidáns vegyületekkel való érintkezés hatására csökkenő színintenzitást mutat. Ennek a csökkenésnek a mértékét lehet mérni spektrofotométer alkalmazásával. A módszer, mint számos hozzá hasonló mérés rendelkezik előnyökkel és

hátrányokkal. A DPPH módszer előnye hogy a mérés egyszerűen kivitelezhető, továbbá a DPPH kereskedelmi forgalomban is kapható. Azonban hátrányai között szerepel, hogy a gyök normál anyagcsere mellett nem keletkezik ezért nehéz megállapítani, hogy a minta antioxidánsai a biológiai gyökökkel szemben mennyire működnek reaktív módon [NEMES et al., 2015].

A DPPH módszer első lépéseként a mintákat 20 percig centrifugáltam 10000 rpm fordulatszámom, 20 percen keresztül. A hígított 100 μL felülúszóhoz 3,9 mL $6 \cdot 10^{-5}$ M DPPH-metanol oldatot öntöttem, majd Vortex kémcsőrázó (Vortex MX-S; AA Labor Kft) alkalmazásával elegyítettem őket.

A kontroll minták elkészítését 100 μL metanollal és 3,9 mL $6 \cdot 10^{-5}$ M DPPH-metanol oldattal végeztem majd szintén Vortex keverő alkalmazása mellett elegyítettem őket. Az így elkészült mintákat szobahőmérsékleten (~ 25 °C) inkubáltam 30 percig, ügyelve arra hogy a mintákat ez idő alatt ne érje külső megvilágítás. Ennek kiküszöbölésére a mintatartókat alufóliával fedtem be, továbbá az inkubálást sötét szobában végeztem el. Az inkubálási idő letelte után az abszorbanciát 517 nm-en mértem UV-Vis spektrofotométerrel (EvolutionTM 300; Thermo ScientificTM, Waltham MA, USA) [EL-FATTAH et al., 2017; ARFAOUI, 2020].

3.5.3 Az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) gátlás aktivitásának vizsgálata

Az angiotenzin-konvertáló enzim endopeptidázként a peptid szabad C-terminális oldalán hasít, melynek hatására két aminosavat lehasítva az angiotenzin I – II átalakulását katalizálja. Az ACE az angiotenzin I – II átalakuláson túl, más peptidek metabolizmusában is részt vesz, hasítja a gonadotropin-serkentő hormont, továbbá inaktiválja bradikinint. A bradikinin (1-7)-é történő hasítása csökkenti a B₂ receptoron kiváltott hatását, vagyis csökkenti a vazodilatációt [GUANG et al., 2012].

Az ehhez szükséges vizsgálat első lépéseként a nanoszűrt tejfehérje-sűrítményt és az enzimekkel kezelt, illetve fermentált mintákat az antioxidáns tartalom vizsgálatokhoz hasonlóan centrifugálni kell, majd a centrifugálás során keletkező felülúszóban vizsgáltam az ACE gátlás mértékét. A vizsgálatra szánt mintákat 20 percig, 10000 rpm fordulatszámom centrifugálom laboratóriumi berendezésen. A kísérletek elvégzéséhez szükséges reakcióelegyet az alábbi vegyszerek használatával állítottam össze: 100 nM Trisz-(hidroximetil)-amino-metán hidroklorid-ot (TRIS HCL, Sigma Aldrich), 50 mM NaCl-ot, 10 μM ZnCl₂-ot, 15 μM o-

aminobenzoésav (ABZ-FRK (DNP) – P) trifluor-acetát szubsztrátot és szérumot tartalmazott, mely reakcióelegynek a pH értéke 7 volt. A centrifugálás során keletkező felülúszót és a fermentlevet hígítani kell hogy a mérési tartományon belül vizsgálhatóak legyenek, mely hígítási érték 10^{-10} - 10^{-7} közötti volt. A gátló hatás IC_{50} pontjának meghatározása érdekében széles hígítási tartományt alkalmaztam (10^6), mivel az enzimesen hidrolizált és fermentált minták esetében nem volt ismert a pontos hígítási arány, illetve az IC_{50} érték. Ebben a széles hígítási tartományban, már bizonyosan leolvasható az IC_{50} érték, a vizsgált minták esetében. Az elkészített reakcióelegyen vizsgáltam az IC_{50} értéket, mely azon inhibitor koncentrációt jelenti, amely 50%-kal gátolja az ACE konvertáló enzim aktivitását. A reakció a szubsztrát hozzáadása után kezdődött el, mely reakció során a K_S és a V_{Max} értékét úgy határoztam meg, hogy a 540, 1620, 4860 és 160, 480, 1440 szorosára hígított minták aktivitását mértem $15 \mu M$, $7,5 \mu M$, $3,75 \mu M$ és $1,625 \mu M$ szubsztrát hozzáadása mellett. Két különböző hígítási sort alkalmaztam a mérés előkészítése során, az enzimesen hidrolizált fehérjesűrítmény esetében nagyobb, míg a fermentált minták esetében kisebb értékeket használtam. Az aktivitási értékeket nemlineáris illesztéssel rendeltem K_S és a V_{Max} értékekhez. A fluoreszcens jelintenzitásban történő változást fluoreszcens lemezolvasóban (BMG Novostar, BMG Labtech, Németország) végeztem $37^\circ C$ hőmérsékleten. A gerjesztési hullámhossz $\lambda = 340$ nm az emissziós hullámhossz $\lambda = 405$ nm volt. Az alábbi beállításokon végeztem a méréseket 5 perces időközönként 90 percen keresztül.

A kezdeti reakciósebességet ($V - t$) lineáris illesztésből határoztam meg, amit ábrázoltam az S-koncentráció függvényében, melyre nem lineáris regresszióval hiperbolát illesztettem. Az illesztést követően meghatároztam a K_S és V_{MAX} értékeket [FAGYAS et al., 2014].

3.5.4 Enzimaktivitás vizsgálata

Az enzimaktivitás meghatározása során $10 \mu L$ tripszin törzsoldatból (tripszin koncentrációja $0,009$ g/mL) indultam ki. Ezt követően elkészítettem a TRIS puffer oldatot az alábbiak szerint: 50 mM Trisz-(hidroximetil)-amino-metán hidrokloridot, 150 mM NaCl-ot és $0,01\%$ Triton-X-100-at (2-[4-(2,4,4-trimetilpentán-2-yl)-phenoxy-etanol) elegyítettem. A szubsztrát oldat készítése során 25 mM Boc-Gln-Ala-Arg-AMC szubsztrátot feloldottam dimetil-szulfoxidban (DMSO), majd az elkészített szubsztrát oldatból $1,63 \mu L$ -t összekevertem $1,3$ mL TRIS puffer oldattal. A reakció elegy összeállításához $10 \mu L$ tripszin törzsoldatot, $10 \mu L$ TRIS puffer oldatot és $80 \mu L$ szubsztrát oldatot használtam.

Az elkészített 100 μL mintát lemezolvasóba pipetáztam, majd a fluoreszcens jelintenzitásban történő változást fluoreszcens lemezolvasóban végeztem 30 percig, 37 °C hőmérsékleten. A gerjesztési hullámhossz, hasonlóan az ACE gátlás vizsgálata során (3.5.3-as fejezet), $\lambda = 340$ nm az emissziós hullámhossz $\lambda = 405$ nm volt. Vak minták elkészítéséhez 10 μL desztillált vizet és 90 μL szubsztrátot használtam [UCHINO et al., 1993].

3.5.5 Mikrobiológiai aktivitás vizsgálata

Jelen fejezetben a tej, illetve tejtermékekben leggyakrabban előforduló patogén mikrobák (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* CCM 4699) gátlását vizsgáltam a tejfehérje sűrítvényekben, az enzim kezelt és fermentált mintákban.

Az említett minták előkészítését az előző fejezetekben ismertetett centrifugával 10000 rpm fordulatszámon és 20 percen keresztül végeztem.

A kísérletek elvégzéséhez TSA (tripton-szója agart) agart alkalmaztam, mely kazein és szójababliszt enzimes hidrolízisével került előállításra. A frissen elkészített baktérium kultúrákat MRD (Maximum Recovery Diluent) oldat alkalmazásával hígítottam hogy a vizsgálat elvégzéséhez szükséges 10^6 TEK /mL koncentráció biztosított legyen. Az MRD oldat elkészítéséhez 8,5 g NaCl és 1 g peptont oldottam fel 1 L desztillált vízben [HUSSEIN et al., 2019].

A 10^6 TEK/ml kultúra koncentráció kalibrációs táblázat használatával lett meghatározva, melyhez ismert standard optikai denzitását mértem 550 nm-es hullámhosszon, majd ezt követően leolvastam az adott baktérium kultúrára jellemző 10^6 TEK/ml értékét (M3 29.táblázat). Az optikai denzitást (DEN 1-B McFarland Densitometer, Bio-Science, Magyarország) denzitométerrel mértem. Az optikai denzitás értéke egyenesen arányos az élő sejtek számával. A frissen elkészített $8 \cdot 10^6$ TEK/mL koncentrációjú kultúrát TSA agaron szélesztettem petricsészében, melyekbe 5 mm átmérőjű lyukakat készítettem. Az így elkészített üregekbe 100 μL mintát pipetáztam. A beoltott mintákat 37 °C hőmérsékleten inkubáltam 48 órán keresztül (HACH, Düsseldorf, Németország). Az inkubálási idő letelte után tolómérő (UEMATSU SHOKAI CO., LTD., Sendai, Japán) segítségével lemértem a gátlási zónák átmérőjét.

3.5.6 Fehérje koncentráció meghatározása

Az élelmiszerek oldott fehérjetartalmának meghatározására számos mennyiségi módszer ismert. Doktori munkám során a fehérjekoncentráció mennyiségének meghatározását Bradford módszerrel végeztem, mely a kromogén eljárások közé tartozik, ennek során a szerves vegyület és a fehérje által létrehozott színekomplesz UV elnyelését mérjük. A Bradford módszer során Coomassie Brilliant Blue G-250 festéket alkalmaztam mely savas közegben kötődik a mintában lévő fehérjékhez ezzel megváltoztatva annak fényelnyelési maximumát.

A kísérlet során a 100 μ L-re hígított minták mindegyikéhez 3 mL Bradford-reagenst adtam majd Vortex kémcső rázó alkalmazásával összekevertem. Az előkészített mintákat ezután szobahőmérsékleten (~ 25 °C) inkubáltam 30 percig (HACH, Düsseldorf, Németország). A spektrofotometriás mérést 595 nm hullámhosszon végeztem spektrofotométerrel (Thermo ScientificTM, Waltham, MA, USA). A vizsgálat során standardként szarvasmarha-szérum albumint használtam, míg a vak minták elkészítéséhez 100 μ L desztillált vizet és 3 mL Bradford reagenst kevertem össze [BRADFORD, 1976].

3.5.7 Öntött gélen elválasztott fehérjék immunblottja

Az immunblott módszer révén egy adott primer antitest segítségével meghatározható egy biológiai mintában található fehérje relatív mennyisége. A fehérjék molekulatömegük szerinti szétválasztása után a fehérje-alegységek 0,45 μ m pórusméretű PVDF membránra (Merck Millipore, MA, USA) transzfer-pufferrel történő elektroforetikus átblottolása BIO-RAD Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell félszáraz rendszerű készülékkel történt, beállított paraméterek ($U=0,25$ V, $I=0,08$ mA/cm², blottolás ideje: 1 óra) mellett, a membránpapírhoz tartozó gyártói felhasználási útmutató szerint. (A protokoll szerint a megfuttatott gél 15 percig katód-pufferben kell áztatni (25 mM Trisz bázis, 40 mM glicin, 10% metanol). A blottolás előtt a membránt 15 másodpercig metanolban, majd 2 percig desztillált vízben, majd 5 percig anód II.-pufferben (25 mM Trisz, 10% metanol) kell átnedvesíteni. 2 db szűrőpapírt anód I.-pufferben (0,3 M Trisz, 10% metanol) 1 db szűrőpapírt anód II.-pufferben -, 3 db szűrőpapírt katód-pufferben kell átnedvesíteni.

Blottolás után a membránt 1 óráig 1%-os BSA fedőpufferben (1% BSA, 0,05% Tween-20 foszfát-pufferben - 0,14 M NaCl; 0,0027 M KCl; 0,01645 M Na₂HPO₄*2H₂O; 0,002 M KH₂PO₄) blokkoltam rázatás közben. A fehérjék blokkolása után a membránt háromszor, 10 percig PBS-oldattal (0,14 M NaCl; 0,0027 M KCl; 0,01645 M Na₂HPO₄*2H₂O; 0,002 M

KH_2PO_4) mostam. Immunreaktív fehérjéket klinikailag igazolt IgE tejpozitív, összevont humán szérummal vizsgáltam. Mosás után a membránt PBS-oldatban megfelelően hígított elsődleges antitest-oldatban (poolozott tejpozitív humánszérum, 1:100) inkubáltam 1 éjszakán át, szobahőmérsékleten. Másnap háromszor 10 percig mostam a membránt PBS-oldattal. Mosást követően a membránt PBS-oldatban megfelelően hígított másodlagos, enzimmel jelölt ellenanyag-oldatban (anti-humán IgE, HRP konjugátum 1:1000) rázattam 1,5 órán keresztül. Az inkubáció után a membránt háromszor 10 percig PBS-pufferrel mostam, majd a 4-kloro-naftol szubsztrát-oldat (4-kloro-naftol tableta (Sigma; 30mg) 10 ml etil-alkoholban) hozzáadásával előhívtam az immunreaktív fehérjesávokat. A reakciót desztillált vízzel állítottam le. Az immunblottok kiértékelése BIO-RAD Gel Doc 2000 rendszerrel történt géldokumentációs rendszerrel történt.

3.6 Statisztikai vizsgálatok

Valamennyi kísérletet háromszor végeztem el, majd a kapott eredmények átlag és szórás értékét Microsoft Excel (2013)-as program alkalmazásával számítottam ki. (Microsoft Corporation, Washington, DC, USA). A statisztikai próbákat SPSS 25.0 programmal végeztem el (IBM, Armonk, NY, USA, 2017).

3.6.1 Fluxus és fajlagos energiaszükséglet statisztikai vizsgálata

A fluxust és a fajlagos energiaszükségletet háromtényezős MANOVA-val vizsgáltam, melyben a három faktor a TMP (2 bar, 3 bar), az RFR (100 L/h, 200 L/h) és a statikus keverő alkalmazása (igen/nem), a két függő változó pedig a fluxus és a fajlagos energiaszükséglet voltak. A fluxus és energiaszükséglet esetében a hibatagok normalitása sérült, melynek kiküszöbölésére a fluxus adatoknak a természetes logaritmusát, míg az energiaszükségleteknek a reciprokát vettem. A transzformált adatokra a normalitást elfogadtam, mivel nagy mintaelemszám esetén ($N = 150$) ha a ferdeség abszolútértéke 2 alatt marad, illetve a csúcosságé 4 alatt marad akkor a normalitás elfogadható. A szóráshomogenitás mindösszesen egy esetben sérült (Levene-próba, $p < 0,05$), ám az azonos és nagy mintaelemszám miatt ez nem okozott jelentős mértékű torzítást. Szignifikáns MANOVA eredmény esetén változónkénti ANOVA modellt futtattam Bonferroni-féle korrekcióval [HIDAS et al., 2021; ENDERS, 2003].

3.6.2 Fehérjetartalom vizsgálata

A fehérjetartalom esetében kéttényezős varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztam, melynek modelljében a függő változó a fehérjetartalom volt, a két független faktorváltozó pedig a TMP (2 bar, 3 bar) és RFR (100 L/h, 200L/h) voltak. A hibatagok normalitását Shapiro-Wilk-próba segítségével ($p>0,05$) a szóráshomogenitást Levene-tesztel igazoltam ($p>0,05$) (M3 2-3. táblázat) [HIDAS et al., 2021; ENDERS, 2003].

3.6.3 Antioxidáns-tartalom vizsgálata

Az antioxidáns tartalom vizsgálata során két különböző vizsgálati módszert (FRAP, DPPH) alkalmaztam, melyben két faktort (csoportok: fehérjesűrítmény (NF), fermentált hidrolizátum (glükóz nélkül), fermentált hidrolizátum (glükóz hozzáadásával), kezelések: (NF, N1 = 0,008 g/L, N2 = 0,016 g/L, N3 = 0,032 g/L) változtattam két függő változó (FRAP, DPPH) vizsgálatával. Ebben az esetben többtényezős varianciaanalízist (MANOVA) használtam. A szóráshomogenitást Levene-próbával ($p>0,05$), a hibatagok normalitását Shapiro-Wilk-próbával ($p>0,05$) ellenőriztem (M3 5-6. táblázat). Szignifikáns MANOVA eredmény esetén ismét változónkénti ANOVA modellt futtattam Bonferroni-féle korrekcióval [HIDAS et al., 2021; ENDERS, 2003].

3.6.4 ACE-gátlás vizsgálata

Az ACE gátlás vizsgálatában két faktor szintjeit (csoportok: fehérjesűrítmény (NF), fermentált hidrolizátum (glükóz nélkül), fermentált hidrolizátum (glükóz hozzáadásával), alkalmazott enzimkoncentráció – N1, N2, N3) hasonlítottam össze egy függő változó jelenlétében (ACE-gátlás). Ebben az esetben kéttényezős varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztam, mely során a szóráshomogenitást szintén a Levene-, míg a hibatagok normalitását Shapiro-Wilk-próbával ellenőriztem ($p>0,05$). A vizsgált csoportok és enzimkoncentrációk közötti páronkénti vizsgálatot Tukey-féle post-hoc-tesztel végeztem (M3 10-11.táblázat) [HIDAS et al., 2021; ENDERS, 2003].

3.6.5 Mikrobiológiai gátlás vizsgálata

A mikrobiológiai aktivitás vizsgálata során különféle baktériumtörzsek gátlását vizsgáltam a különféle kezelések hatására. Ezen mérések során a statisztikai vizsgálatot két nagyobb csoportra osztottam.

A tejfehérjesűrítmény esetében az alkalmazott enzimkoncentrációknak (N1 – N2 – N3) a függő változókra (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*), azok gátlási zónájára gyakorolt hatását vizsgáltam. Ebben az esetben egytényezős MANOVA-t alkalmaztam, mely esetben szintén Levene-teszttel igazoltam a szóráshomogenitást és Shapiro-Wilk-próbával a normalitást ($p > 0,05$) (M3 14-17. táblázat). A minták fermentációja során kéttényezős MANOVA-át alkalmaztam, melyben három függő változót (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) és két faktort (kezelések – N1 – N2 – N3, glükóz) vizsgáltam. Ebben az esetben is elfogadható volt a szóráshomogenitás és normalitás a fenti tesztekkel. Hogy csökkentsem a többszörösen összehasonlított csoportok esetén fellépő hiba mértékét a szignifikáns MANOVA eredményt követően a változónkénti ANOVA során Bonferroni-féle korrekciót alkalmaztam [HIDAS et al., 2021; ENDERS, 2003].

3.6.6 2^P-n teljes faktoros kísérletterv

A kísérlettervezésnek kétféle módszere ismert, melynek egyik típusa az optimális kísérleteknek a tervezése. Ilyenkor a cél, hogy a változók közötti összefüggések feltárásra kerüljenek. A második fajtája, amikor kísérletes optimalizálást alkalmazunk. Ebben az esetben egyszerűbb matematikai függvények alkalmazásával kerülnek meghatározásra az optimális paraméterek értékei. A vizsgált paraméterek (Transzmembrán nyomáskülönbség, Recirkulációs-térfogatáram) fluxusra gyakorolt hatását 2^P-n típusú faktoros kísérlettervvel végeztem el [ASHFAQ és QIBLAWEY 2018; HAMD et al., 2018]. A kísérlettervezés során faktorokat (p) használunk, melyben a független változók két szinten változtathatóak (minimális, maximális), ezen beállított értékeket faktorszinteknek nevezzük. A faktorok lehetnek mennyiségi és minőségi is. A kísérleteim során a permeátumfluxust 2 faktor függvényében vizsgáltam, a tartomány határai a 12. táblázatban vannak feltüntetve [KEMÉNY és DEÁK, 1990].

12. táblázat: 2^P -n kísérlettervben vizsgált faktorok (Z_1, Z_2) vizsgálati tartománya

Hatás	Faktor	Tartomány
TMP [10^5 Pa]	Z_1	2 – 3
RFR [L/h]	Z_2	100 – 200 L/h

Ha a faktor jele „z” akkor egy tetszőleges j-edik faktor esetén a z_j faktorra felírható a faktor alapszintje, ami a következő:

$$z_j^0 = \frac{z_j^{max} + z_j^{min}}{2} \quad (22)$$

Ahol a z_j^{max} a faktor felső értéke, z_j^{min} a faktor alsó szintje. Ismerve a faktorok alsó és felső szintjét, felírható a variációs intervallum (Δz_j) az alábbiak szerint:

$$\Delta z_j = \frac{z_j^{max} - z_j^{min}}{2} \quad (23)$$

A természetes faktorokat azonban transzformálni (x_j) kell az alábbiak szerint:

$$x_j = \frac{z_j - z_j^0}{\Delta z_j} \quad (24)$$

A 2^P típusú faktoros kísérlettervekre felírható egy elméleti regressziós függvény/modell amit a következő képletben mutatok be:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_p x_p \quad (25)$$

ahol, Y egy kvalitatív vagy kvantitatív mutató (szűrletfluxus), x_i - transzformált faktor, β_0 – konstans, β_i - becült paraméter.

4. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSÜK

4.1 Tejfehérjesűrítmény előállítása membránszűrés alkalmazásával

A 3.2-es fejezetben leírt membránszűrő berendezésen végeztem az alapanyagként felhasznált UHT tej besűrítését. A membránszűrést 5 nm pórusméretű, 0,005 m² aktív felületű NF membránnal végeztem (kerámiacső membrán). Szobahőmérsékleten pH = 7-es érték mellett a tejben található kazein micellák sugara 50 nm, míg a tejsavófehérjék (α -laktalbumin, β -laktoglobulin), szarvasmarha szérum albumin (BSA) és az immunglobulinok mérete az alábbiak szerint változik: ~ 1,8 nm, ~ 1,8 nm, ~ 4 nm és ~ 6 nm [DEWIT, 1998]. Az UHT technológia során a tejet 135-145 °C közötti hőmérsékleten kezelik 1 – 8 s közötti tartózkodási idő mellett.

A tejsavófehérjék micellakomplexekhez való kapcsolódásával megnő a micellák átlagos mérete (pl. lásd, 2.2.2 Tej összetétele c. alfejezet), így a jól megválasztott pórusméretű membrán alkalmazásával a fehérjék jelentős része visszatartásra kerül, míg a kötésekben részt nem vevő savófehérjék, laktóz a membrán pórusain áthaladva a szűrletbe kerülnek. Azzal, hogy a savófehérjék jelentős részét a membrán leválasztja csökkenthető a tejfehérje allergiás reakciók kialakulása a retentátumban, mivel az allergénhatású savó fehérjék (α -laktalbuminok, β -laktoglobulinok) jelentős része eltávolításra került a permeátumban.

Doktori munkám során az allergénmentes hozzáadott értékkel rendelkező fehérjesűrítmény előállításához első lépésként, a membránszűrés során besűrítettem az UHT tejet (VCR = 2), majd az így kapott retentátumot használtam a további kísérleteim során. Az így előállított fehérjesűrítményt (retentátum) vettem alá enzimes hidrolízisnek, illetve fermentációnak.

A membránszűrés során kiemelten fontos hogy a koncentráció polarizáció hatását a lehető legkisebb mértékűre tudjuk redukálni, ugyanis a koncentráció polarizáció és a kialakuló gélréteg vastagsága a szűrés folyamat előrehaladtával folyamatosan nő melynek következtében a fluxus értéke csökkenő tendenciát mutat.

Az alábbiakban a transzmembrán nyomáskülönbség és a recirkulációs-térfogatáram értékek változtatásával vizsgáltam azon üzemelési paraméterek értékét melyen a gélréteg vastagsága csökkenthető, a fluxus értéke pedig növelhető.

A 13. táblázatban a kezdeti fluxus és a membránszűrés során a fluxus értékekben bekövetkező százalékos változást mutatom be különböző transzmembrán nyomáskülönbség és recirkulációs-térfogatáram értékek mellett. A mellékelt táblázatban a kapott eredményeknek az átlaga és szórása látható.

13. táblázat: A nyomás [bar], kezdeti fluxus [L/m² h] és a fluxus értékek százalékos [%] változása különböző transzmembrán nyomások (bar) és recirkulációs-térfogatáramok (L/h) esetén

Statikus keverő nélkül					Statikus keverővel		
TMP [Bar]	RFR [L/h]	Δp [Bar]	J_{kezdeti} [L/m ² h]	ΔJ [%]	Δp [Bar]	J_{kezdeti} [L/m ² h]	ΔJ [%]
2	100	0,1	8,06±1,0	41,69±1, 27	0,3	15,58±1,10	32,33±1,25
2	200	0,1	8,2±1,2	37,39±2, 35	0,7	15,58±1,00	31,7±2,50
3	100	0,1	13,45±1,1	36,95±1, 55	0,3	34,22±1,08	24,01±1,19
3	200	0,1	18±3,9	33,33±2, 79	0,7	34,55±1,02	23,61±2,31

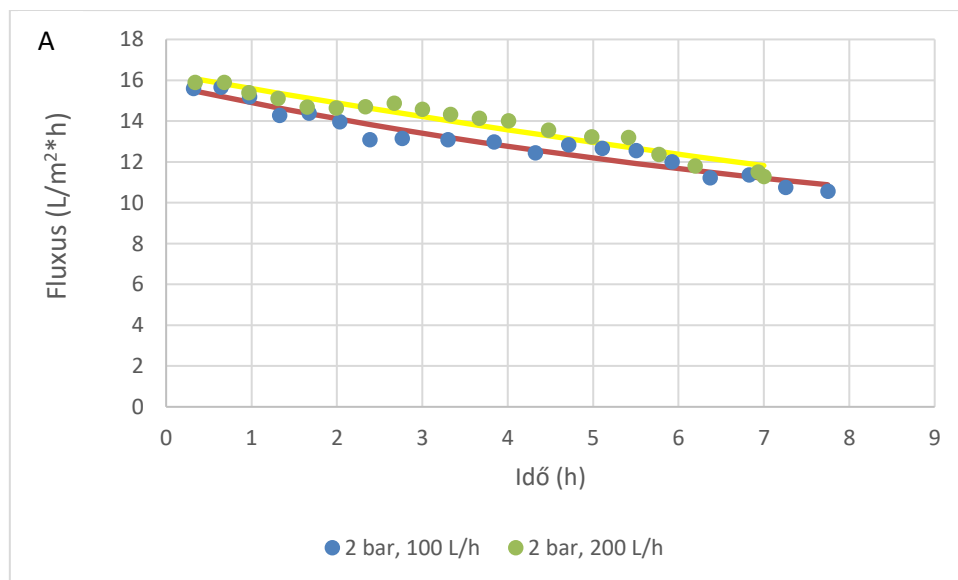
A vizsgálati eredményekből jól látható, hogy a besűrítés során mért szűrletfluxus értéke a TMP növelésével javítható. Továbbá a fluxus csökkenés a kezdeti és végállapot között százalékos értékben kifejezve alacsonyabb abban az esetben, ha a membránszűrést 3 bar nyomáson végezzük. Az állandó transzmembrán nyomáson végzett méréspárok esetében megfigyelhető, hogy a fluxus értéke minimálisan ugyan, de növekvő tendenciát mutat, azonban ez a 100 L/h és 200 L/h-ás térfogatáram értékek esetében nem nevezhető szignifikáns változásnak statikus keverő alkalmazása mellett (12. ábra).

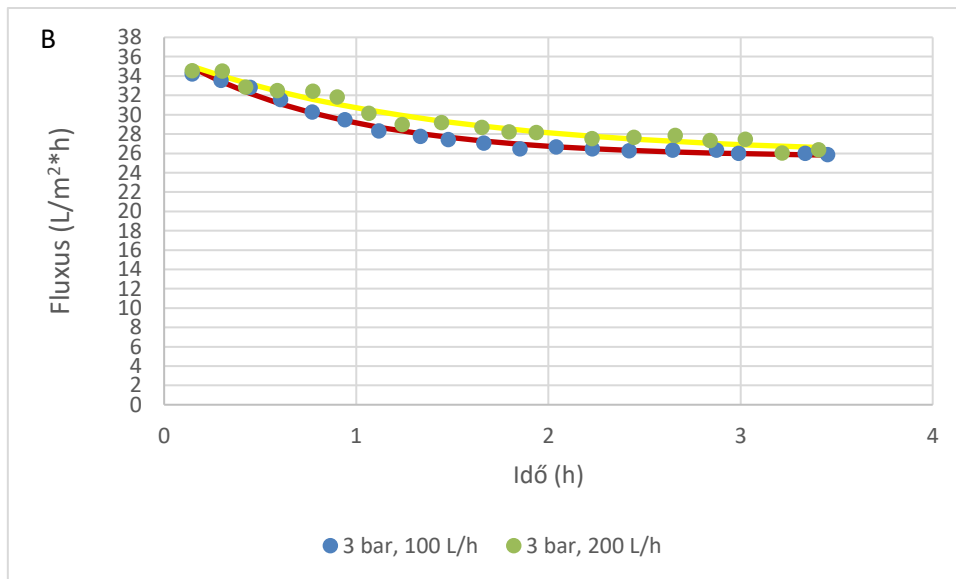
Statikus keverő alkalmazásával javult a szűrletfluxus értéke, emellett fluxus csökkenés a kezdeti és végállapot között százalékos értékben kifejezve szintén alacsonyabb volt. A 13. ábrán a fluxus alakulását ábrázoltam statikus keverő alkalmazása nélkül, mely diagramokon látszik hogy a fluxus értékek jóval alacsonyabbak, ahogy a kezdeti fluxus is.

A 12. és 13. ábrán lévő pontokra exponenciális függvény ($f(x) = A \cdot \exp(-Bx) + C$) került illesztésre, ahol a függvény három konstans értékének (A, B, C) változtatásával vizsgáltam az illesztést. A függvény transzformációt Microsoft Excel (2013) Solver bővítménnyel végeztem el [RASHID et al., 2020].

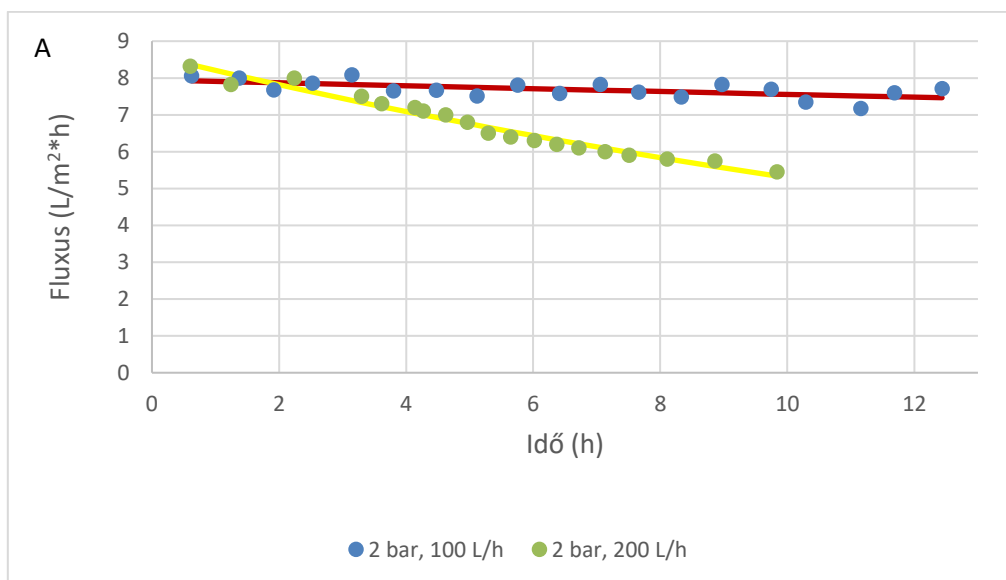
A transzformált exponenciális függvények az alábbiak szerint változtak:

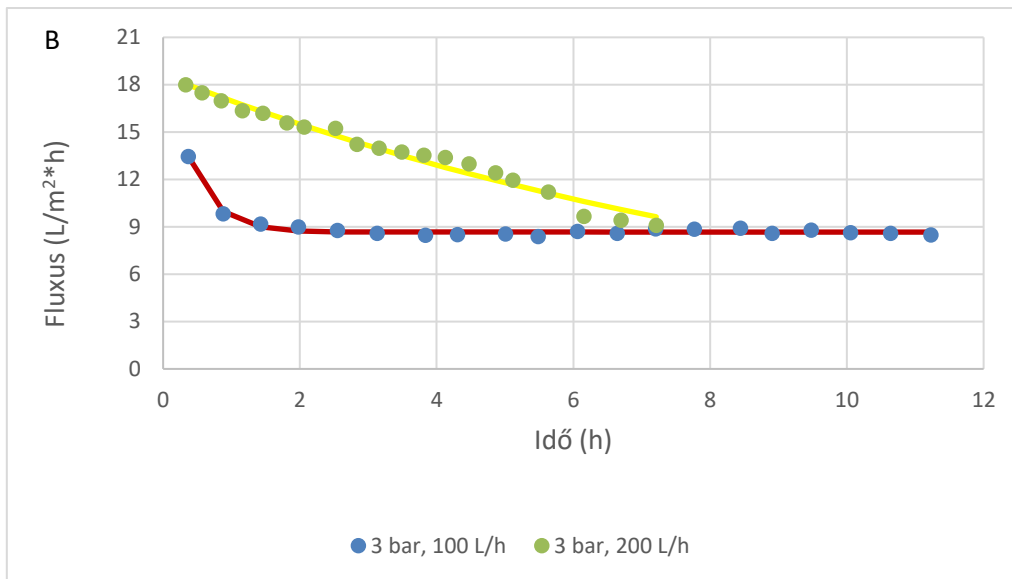
- Statikus keverő alkalmazásával:
 - 2 bar, 100 L/h: $f(x) = 8,905 \cdot \exp(-0,103x) + 6,868$
 - 2 bar, 200 L/h: $f(x) = 16,325 \cdot \exp(-0,046x) + 3,426$
 - 3 bar, 100 L/h: $f(x) = 10,934 \cdot \exp(-1,132x) + 25,607$
 - 3 bar, 200 L/h: $f(x) = 10,277 \cdot \exp(-0,733x) + 25,766$
- Statikus keverő nélkül:
 - 2 bar, 100 L/h: $f(x) = 5,408 \cdot \exp(-0,007x) + 2,541$
 - 2 bar, 200 L/h: $f(x) = 8,610 \cdot \exp(-0,0487x) + 0,006$
 - 3 bar, 100 L/h: $f(x) = 12,252 \cdot \exp(-2,541x) + 8,665$
 - 3 bar, 200 L/h: $f(x) = 18,592 \cdot \exp(-0,091x) + 0,002$





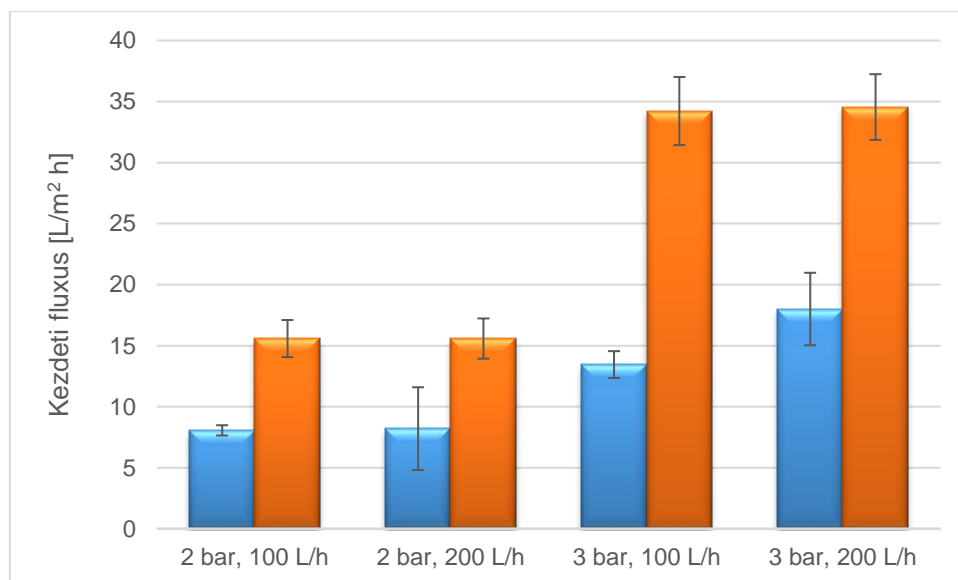
12. ábra: Fluxusgörbék (L/m²h) lefutása 100, ill 200 L/h RFR esetén, 2 bar nyomás (A), ill 3 bar nyomás (B) alkalmazásával (Statikus keverő alkalmazásával)





13. ábra: Fluxusgörbék (L/m²h) lefutása 100, ill 200 L/h RFR esetén, 2 bar nyomás (A), ill 3 bar nyomás (B) alkalmazásával (Statikus keverő alkalmazása nélkül)

A fluxus értékekben bekövetkezett változásokat a 14. ábrán mutatom be, ahol a mért adatokat statikus keverő nélkül és annak alkalmazása mellett hasonlítottam össze.



14. ábra: Kezdeti fluxus (L/m²h) értékek az egyes üzemeltetési paramétereken, statikus keverő alkalmazásával (narancssárga oszlop), illetve nélküle (kék oszlop) (TMP = 2 bar, 3 bar ; RFR = 100 L/h, 200 L/h)

A 14. ábrán jól látható hogy a statikus keverő, membránszűrés során való alkalmazása pozitív hatást gyakorol a fluxus értékére. Statikus keverő nélkül a vizsgált membránszűrés paraméterek mellett (TMP = 2 bar, 3 bar ; RFR = 100 L/h, 200 L/h) a fluxus maximális értéke 18 L/m²h volt (TMP = 3 bar, RFR = 200 L/h). Ugyanezen üzemeltetési paramétereken, statikus keverő beépítésével a maximális fluxus érték 34,55 L/m²h volt.

A kísérleti eredményekből továbbá jól látható (15. ábra), hogy a membránszűrés energetikai költségének az irányát nagyobb mértékben befolyásolja a recirkulációs térfogatáram, mint az alkalmazott transzmembrán-nyomáskülönbség. 100 L/h-ás térfogatáramon, növelt transzmembrán-nyomáskülönbségen (2 – 3 bar) az energia a felére csökkent, míg állandó transzmembrán-nyomáskülönbségen (2 bar), növelt térfogatáramon (100 – 200 L/h) az energia a kétszeresére nőtt. Statikus keverő alkalmazásával nő a membrán hosszában tapasztalható nyomásesés értéke mely szintén az energiafogyasztás növekedését okozza.

Ugyanazon a nyomáson, de növelt recirkulációs térfogatáramon jelentős mértékű energiafogyasztás növekedés tapasztalható. A 14. táblázatban az alkalmazott membránszűrés paraméterek hatását mutatom be a fluxusra és a fajlagos energiafogyasztásra. A változók közötti összefüggéseket, szignifikáns kapcsolatokat Tukey féle statisztikai próbával vizsgáltam.

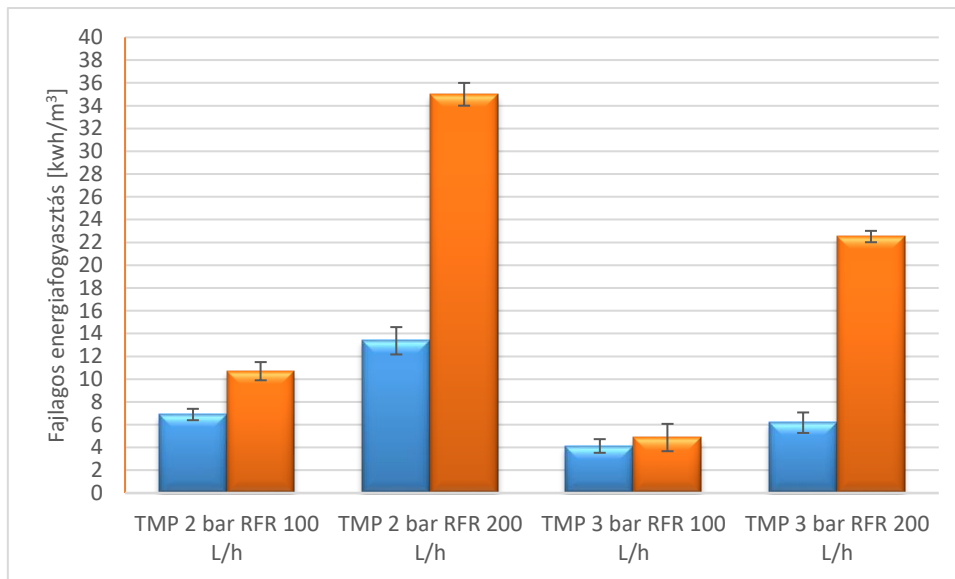
A MANOVA-teszt eredménye mind a statikus keverő, a térfogatáramok, mind pedig a különböző nyomás alkalmazásának szignifikáns hatását mutatta ki (Wilk-féle lambda értékek a statikus keverőre: 0,004; a térfogatáramra: 0,009; a nyomásra 0,176, mindegyik $p < 0,001$ szignifikanciaszinttel). Ezen felül a páros és a hármas-szintű interakciók is mind szignifikánsak voltak ($p < 0,001$).

A MANOVA-t követő változónkénti ANOVA mindhárom szignifikáns hatást mindkét változó esetében kimutatta ($F(1;142) > 270,00$; $p < 0,001$), míg az interakciók közül csak a térfogatáram*nyomás, illetve a hármas interakció nem volt szignifikáns ($p > 0,05$).

14. táblázat: Membránszűrési paraméterek/faktorok (TMP [bar], RFR [L/h]) statisztikai vizsgálata a mért fluxusra (L/m²h) és energiafogyasztásra (kWh/m³).

	Faktorok			Faktorok kódolása		
	Statikus keverő alkalmazás	RFR [L/h]	TMP [bar]	Faktor kód	RFR	TMP
Fluxus	Igen	100	2	B	α	a
			3	B	α	b
		200	2	A	β	a
			3	B	α	b
	Nem	100	2	A	α	a
			3	A	α	b
		200	2	A	β	a
			3	A	β	a
Energiafogyasztás	Igen	100	2	B	α	b
			3	A	α	a
		200	2	B	β	b
			3	B	β	a
	Nem	100	2	A	α	b
			3	B	α	a
		200	2	A	β	a
			3	A	β	a

A mellékelt táblázat tartalmazza a három párhuzamos mérés átlagát a fluxus és energiafogyasztás tekintetében. Az egyes faktorszintek közötti szignifikáns különbségek meghatározására a statikus keverő hatásának vizsgálatára rögzített RFR és TMP érték mellett az A, B, az RFR hatásra rögzített statikus keverő használata és TMP érték mellett az a, b, illetve a TMP hatásra rögzített statikus keverő használata és RFR szint mellett az α, β jeleket alkalmaztam.



15. ábra: Fajlagos energiafogyasztás (kWh/m^3) változása az egyes üzemeltetési paraméterek mellett, statikus keverő alkalmazásával (narancssárga oszlop), illetve nélküle (kék oszlop) (TMP = 2 bar, 3 bar ; RFR = 100 L/h, 200 L/h)

A 15. ábra alapján látható, hogy a legkisebb üzemelési költség 3 bar nyomáson és 100 L/h-ás recirkulációs térfogatáramon keverő elem nélkül volt mérhető. Ebben az esetben a fogyasztás $4,13 \text{ kWh/m}^3$.

A legnagyobb energiafogyasztás 2 bár nyomáson és 200 L/h-ás térfogatáramon volt tapasztalható, mely ebben az esetben 35 kWh/m^3 volt keverővel. A vizsgált eredményekből jól látszik hogy a statikus keverők alkalmazása jelentős mértékben tudja növelni a membránszűrés energiaköltségét. Besűrítési kísérleteim során céлом volt a szűrletfluxus értékének maximalizálása, így a kísérleteim során statikus keverőelem használata mellett, a legalacsonyabb recirkulációs-térfogatáramot és a legmagasabb transzmembrán nyomáskülönbséget alkalmaztam (TMP = 3 bar, RFR 100 L/h). Az említett paramétereken, keverő alkalmazása mellett, a fajlagos energiafogyasztás értéke $4,87 \text{ kWh/m}^3$ volt.

Jól látható, hogy a statikus keverő alkalmazása minden esetben többlet energiabefektetéssel jár. A mért fajlagos energiaszükséglet és a növelt fluxus tekintetében a membránszűrést TMP = 3 bar, RFR 100 L/h műveleti paramétereken végeztem.

A membrán ellenállás (R_M) számítása során a mérést desztillált vízzel végeztem, mely mérés esetében a transzmembrán nyomáskülönbség, a recirkulációs térfogatáram nincs hatással a membrán ellenállásának az értékére. A membrán ellenállásának a vizsgálatát statikus keverő

nélkül végeztem el, melynek értéke egy adott membránra nézve állandó. A továbbiakban, az átlagértéket tekintettem a membrán ellenállásának.

A 15. táblázatban mutatom be a számolt membrán ellenállás értékeket melyet a (14)-es képlet alkalmazásával számítottam. A membránszűrés során alkalmazott recirkulációs-térfogatáram 100 L/h és 200 L/h értéken történt. Mivel a membrán ellenállás értékére nincs hatással az alkalmazott TMP és RFR paraméter, ezért 100 L/h beállításon ábrázoltam az adatokat.

15. táblázat: Membránellenállás ($R_M - [1/m]$) számítása (100 L/h recirkulációs-térfogatáramon)

TMP (Pa)	η (Pa · s)	$J_{\text{átlag}}$ (m^3/m^2s)	R_M
105000	0,001	$4,28 \cdot 10^{-5}$	$2,45 \cdot 10^{12}$
210000	0,001	$7,89 \cdot 10^{-5}$	$2,66 \cdot 10^{12}$
310000	0,001	$1,08E \cdot 10^{-4}$	$2,88 \cdot 10^{12}$
415000	0,001	$1,32 \cdot 10^{-4}$	$3,15 \cdot 10^{12}$

Az átlagos membránellenállás az alkalmazott 5 nm-es membrán esetében $R_M = 2,79 \cdot 10^{12} \text{ 1/m}$

A besűrítési kísérleteket különböző transzmembrán nyomáskülönbségeken és recirkulációs-térfogatáramokon végeztem, melyek során meghatároztam a permeátum fluxusát. Az előzőekben vizsgáltam a membrán ellenállásának értékét, melynek ismeretében már meghatározható a polarizációs réteg ellenállása (R_P) az alábbi képlet alkalmazásával:

$$R_P = \frac{TMP}{\eta \cdot J_{tej}} - R_M \quad (26)$$

ahol TMP - transzmembrán nyomáskülönbség [Pa], η – a tej dinamikai viszkozitása 25 °C-on: $1,74 \cdot 10^{-3}$ [Pa s], J_{tej} - tej szűrletfluxusa [$m^3/m^2 \cdot s$]

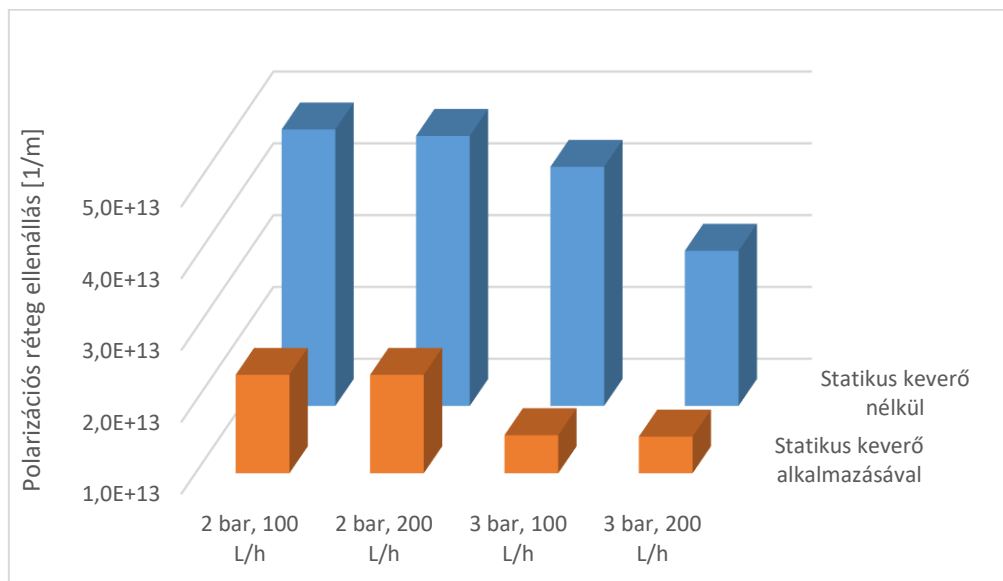
A statikus keverővel illetve nélküle végzett mérések eredményeit a 16. táblázat mutatja be. A növelt TMP hatására csökken a membránszűrés során kialakuló polarizációs réteg vastagsága.

A keresztáramú szűrés alkalmazása során a fluidum vízszintes irányban halad keresztül a membránon nagy sebességgel, ennek következtében jelentős turbulencia alakul ki, melynek hatására csökkent a membrán felületén lerakódó molekulák mennyisége, azaz a koncentráció-polarizációs réteg mértéke is csökkent.

Kutatások alapján a transzmembrán nyomáskülönbség növelése a gélréteg vastagságának csökkenésével is jár, melynek köszönhetően javul a fluxus [MÉTHOT-HAINS et al., 2016].

16. táblázat: Polarizációs réteg ellenállás (R_P – [1/m]) meghatározása statikus keverővel és statikus keverő nélkül végzett méréseknél

				Statikus keverő nélkül		Statikus keverővel	
RFR (L/h)	TMP (Pa)	η (Pa · s)	R_M (1/m)	J (m ³ /m ² s)	R_P (1/m)	J (m ³ /m ² s)	R_P (1/m)
100	200000	0,00174	$2,79 \cdot 10^{12}$	$2,24 \cdot 10^{-6}$	$4,86 \cdot 10^{13}$	$4,38 \cdot 10^{-6}$	$2,37 \cdot 10^{13}$
200	200000	0,00174	$2,79 \cdot 10^{12}$	$2,28 \cdot 10^{-6}$	$4,77 \cdot 10^{13}$	$4,38 \cdot 10^{-6}$	$2,37 \cdot 10^{13}$
100	300000	0,00174	$2,79 \cdot 10^{12}$	$3,74 \cdot 10^{-6}$	$4,34 \cdot 10^{13}$	$9,51 \cdot 10^{-6}$	$1,53 \cdot 10^{13}$
200	300000	0,00174	$2,79 \cdot 10^{12}$	$5,00 \cdot 10^{-6}$	$3,17 \cdot 10^{13}$	$9,60 \cdot 10^{-6}$	$1,52 \cdot 10^{13}$



16. ábra: Polarizációs réteg ellenállásának [1/m] változása az egyes üzemeltetési paraméterek mellett (TMP = 2 bar, 3 bar ; RFR = 100 L/h, 200 L/h), statikus keverő alkalmazásával, illetve nélküle

A 16. ábrán jól látható hogy a statikus keverő alkalmazása mellett tovább csökken a polarizációs réteg ellenállása. További kísérleteimet a választott membránszűrési paramétereken: TMP = 3 bar és RFR = 100 L/h értéken végeztem mivel ezen beállítások esetében a membránszűrés fajlagos-energiaköltsége a legalacsonyabb és maximális a szűrletfluxus.

Eközben a fajlagos energiafogyasztás 18%-al nőtt a statikus keverő nélkül alkalmazott méréshez képest, ami elenyészőnek tekinthető (4,13 – 4,87 kWh/m³).

Látható hogy a polarizációs réteg ellenállása $4,34 \cdot 10^{13}$ 1/m-ről $1,53 \cdot 10^{13}$ 1/m értékre csökken, mely 65 %-os csökkenés az eredetihez képest.

Ahogy az eddigi eredmények is mutatják nő a fluxus értéke, továbbá a membrán eltömődésének is csökken a mértéke statikus keverő használata mellett [BHATTACHARJEE et al., 2020]. BHATTACHARJEE és munkatársai 2020-as kutatása alapján látható, hogy a statikus keverők alkalmazása nem csak a permeátum fluxusát és a membránmodul felületén mérhető áramlási sebességet képes növelni, hanem jelentős mértékben csökkenti a polarizációs réteg ellenállását, melyet saját munkámban is tapasztaltam. Megállapítható tehát, hogy a statikus keverők alkalmazása a membránszűrés területén kiemelten fontos, a folyamatok intenzifikálásának az érdekében.

4.2 Permeátum fluxus 2^P-n kísérletterv alkalmazásával

A kísérletterv elvégzését a Statsoft által fejlesztett Statistica című programmal (Version 8.0) végeztem, doktori munkám során. A kísérlettervben vizsgáltam, melyek azok az ideális nyomás és térfogatáram értékek, melyeknél az 5 nm-es membrán alkalmazása során a legnagyobb fluxus érhető el. A vizsgálataim során két paramétert változtattam ahogy azt a 3.2-es fejezetben részletesen bemutatam.

A 3.6.6-as fejezetben ismertetett (22-23-24)-as képletek alapján elvégeztem az adatok transzformálását, mely adatokat a 17. táblázatban mutatok be.

17. táblázat: 2^P-n faktoros kísérletterv alapján meghatározott transzformált adatok

Faktorok	z1	z2
Középpont	150	2,5
Variációs intervallum	50	0,5
Felső szint	200	3
Alsó szint	100	2

A kísérletterv kiértékelésére, több táblázatot és diagramot alkalmaztam, köztük az egyik legfontosabbnak a 2^P -n faktoros terv összesítő táblázatát tartottam, segítségével meghatározhatóak a paraméterek közti összefüggések, kapcsolatok és az egymásra gyakorolt hatásuk. Ezt az összesítést a 18. táblázat mutatja be.

18. táblázat: Paraméterbecslés az alkalmazott 5 nm-es membrán esetében (statikus keverő alkalmazása mellett) melyben megtalálhatóak a hatások, azok szórásai, t próbastatisztika és azok értékei.

Faktor	Hatás	Hiba	t	p	Koefficiens	- 90% Konfidencia szint	+ 90% Konfidencia szint
Átlag	24,426	1,113	21,946	0,0289	24,426	10,284	38,568
Nyomás [Bar] (1)	18,805	2,488	7,556	0,0837	9,402	-12,817	50,427
Térfogatáram [L/h] (2)	0,165	2,488	0,066	0,957	0,0825	-31,457	31,787
Interakció (1) (2)	0,165	2,488	0,066	0,957	0,0825	-31,457	31,787

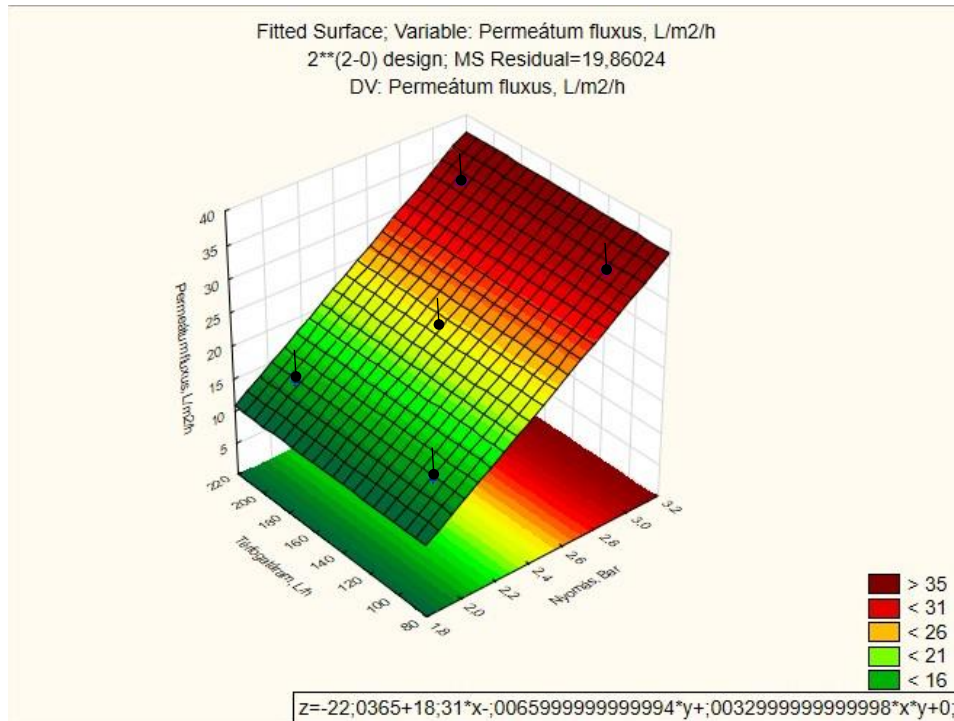
Az adatok elemzése során, majd a statisztikai együtthatók visszakódolása után a (25)-ös képlet alapján lineáris modellt állítottam, amellyel előrejelezhető a kezdeti fluxus értéke. Vizsgálataim során 90 %-os konfidencia szintet használtam.

$$J = 24,426 + 9,402 \cdot \left(\frac{TMP - 2,5}{0,5}\right) + 0,0825 \cdot \left(\frac{Q - 150}{50}\right) + 0,0825 \cdot \left(\frac{TMP - 2,5}{0,5}\right) \cdot \left(\frac{Q - 150}{50}\right)$$

A vizsgált modell érvényessége az alábbi tartományokban található: TMP = 2 – 3 [bar], RFR = 100 – 200 [L/h]. A kísérleteket 5 nm pórusméretű NF membránnal végeztem statikus keverő használata mellett 25 °C-on.

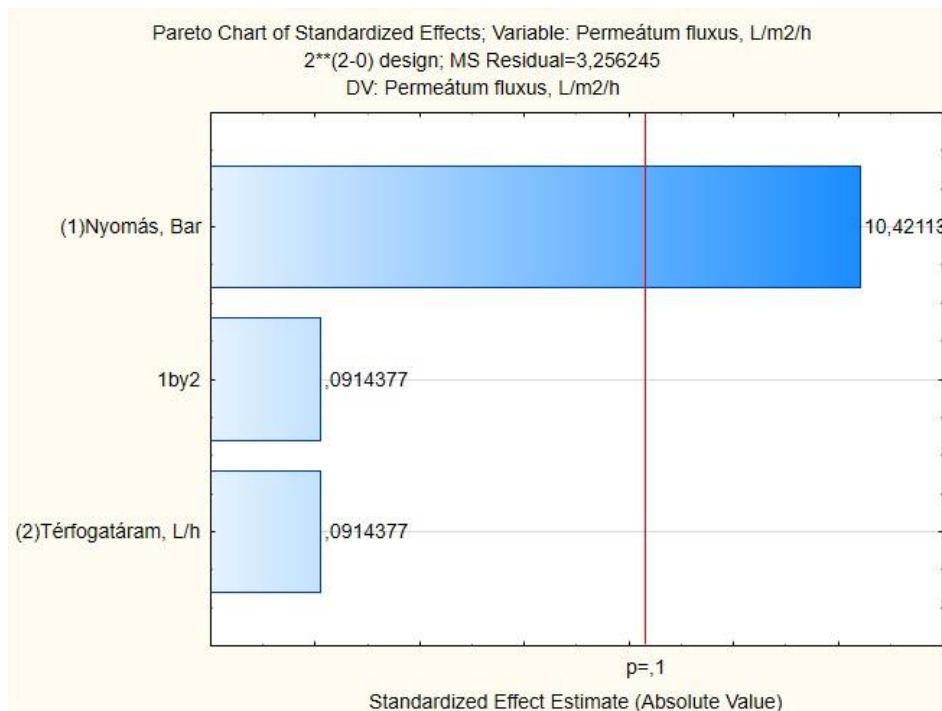
A táblázat oszlopait vizsgálva, megtalálhatóak a hatások, azok szórásai, t próbastatisztika és a szignifikancia szint. A p érték segítségével eldönthető, melyik együtthatónak van szignifikáns hatása. Minél kisebb az értéke, annál jelentősebb a hatás. A transzmembrán nyomáskülönbség hatása a fluxusra szignifikánsnak bizonyult az alkalmazott vizsgálati paraméterek mellett, azonban a recirkulációs térfogatáram fluxusra gyakorolt hatása már nem tekinthető szignifikánsnak ($p > 0,1$). A folyamat során kapott determinációs együttható (R^2) értéke 0,98. A

paraméterek egymásra gyakorolt hatását a jobb átláthatóság érdekében felületi diagramon ábrázoltam, melyet a 17. ábra mutat be.



17. ábra: A szűrletfluxus változásának leírása a transzmembrán nyomáskülönbség és a recirkulációs-térfogatáram függvényében (Statikus keverő alkalmazása mellett)

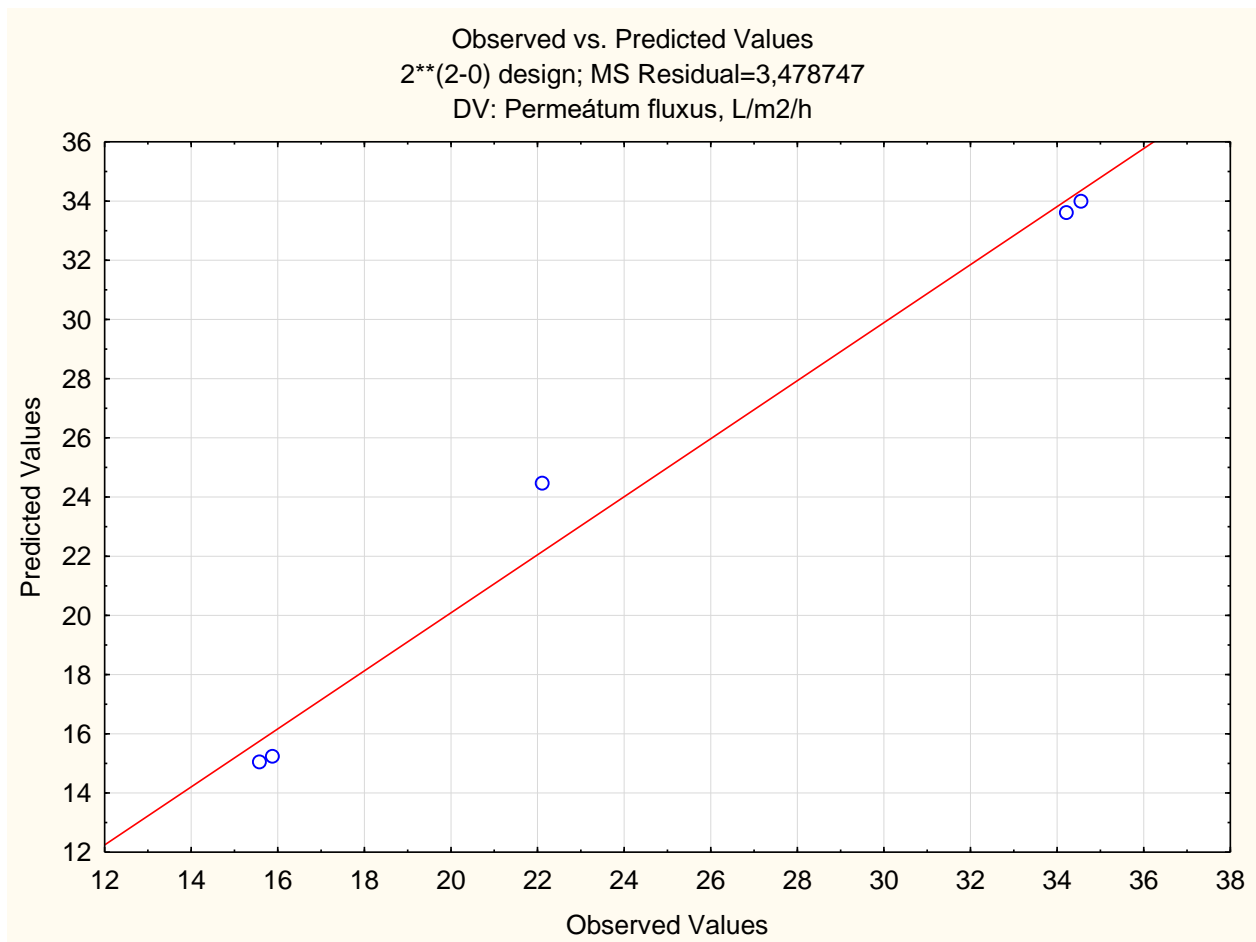
A p érték tekintetében a transzmembrán nyomáskülönbség hatása a vizsgált tartományban szignifikáns, a felületi diagram alapján megállapítható, hogy a nyomás növelésének hatására, a fluxus is jelentős mértékben növekszik. A fluxusra gyakorolt hatásokat Pareto diagramon ábrázolva is megmutatkoznak az egyes faktoroknak a hatásai, ezen hatásokat a 18. ábra mutatja be.



18. ábra: A recirkulációs-térfogatáram, a transzmembrán nyomáskülönbség és a kettő interakciójának (1by2) hatása 90%-os szignifikancia szinten (Statikus keverő alkalmazása mellett)

A Pareto diagramon is hasonló következtetést vontam le, miszerint a transzmembrán nyomáskülönbség hatása a fluxusra szignifikánsnak bizonyult, a piros függőleges vonal a 90%-os konfidenciaszintet ábrázolja $p = 0,1$ érték esetében. Abban az esetben ha ezen a szinten az egyik érték túlhalad, akkor tekinthető az adott hatás szignifikánsnak. Jól látható, hogy nagyobb hatása a fluxusra a transzmembrán nyomáskülönbségnek van, a recirkulációs térfogatáram ebből a szempontból elhanyagolható mértékű.

A következő lépésként összehasonlítottam a mért és a modell által előrejelzett (megfigyelt) adatokat, melyeket a 19. ábra mutat be.



19. ábra: Megfigyelt értékek illeszkedése a becsült értékekhez a besűrítési kísérletek során (statikus keverő alkalmazása mellett)

Látható továbbá, hogy az egyes pontok igen közel helyezkednek el egymáshoz, mivel az illesztett egyenes determinációs együtthatója $R^2=0,98$. A becsült és megfigyelt értékekre illesztett egyenes közel helyezkedik el az ideális pontot jelölő 45°-os átlóhoz.

Ugyanezen statisztikai vizsgálatokat elvégeztem statikus keverő nélkül is, melynek eredményeit a következőkben mutatom be. A paraméterek közti összefüggések, kapcsolatok és az egymásra gyakorolt hatásuk a statikus keverő nélküli besűrítési kísérletek során a 19. táblázatban kerültek bemutatásra.

19. táblázat: Paraméterbecslés az alkalmazott 5 nm-es membrán esetében (statikus keverő nélkül)

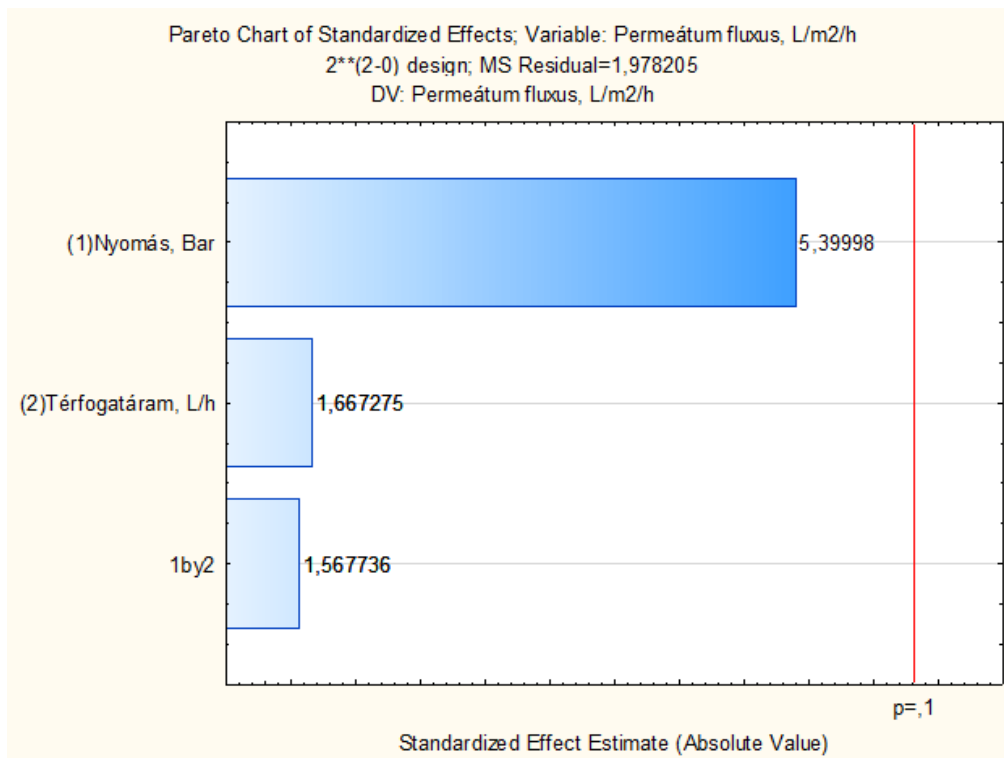
Faktor	Hatás	Hiba	t	p	Koefficiens	- 90% Konfidencia szint	+ 90% Konfidencia szint
Átlag	12,242	0,629	19,462	0,032	12,242	8,27	16,213
Nyomás [Bar] (1)	7,595	1,406	5,399	0,116	3,797	-1,285	16,475
Térfogatáram [L/h] (2)	2,345	1,406	1,667	0,344	1,172	-6,535	11,225
Interakció (1) (2)	2,205	1,406	1,567	0,361	1,102	-6,675	11,085

A vizsgált adatok visszakódolását statikus keverő alkalmazása nélkül is elvégeztem, hasonlóan az előbbiekhöz. A lineáris modell felállításához szintén a (25)-ös képletet alkalmaztam, melynek eredménye a következő volt:

$$J = 12,242 + 3,797 \cdot \left(\frac{TMP - 2,5}{0,5}\right) + 1,172 \cdot \left(\frac{Q - 150}{50}\right) + 1,102 \cdot \left(\frac{TMP - 2,5}{0,5}\right) \cdot \left(\frac{Q - 150}{50}\right)$$

A vizsgált modell érvényessége az alábbi tartományokban található: TMP = 2 – 3 [bar], RFR = 100 – 200 [L/h].

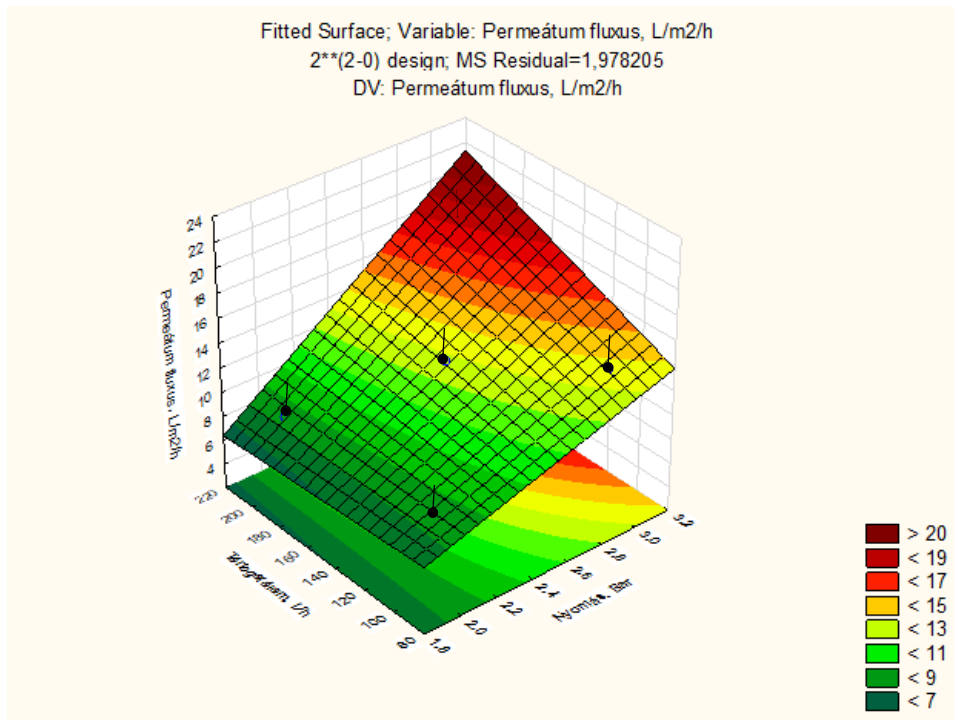
Statikus keverő használata nélkül a paraméterek fluxusra gyakorolt hatása nem tekinthető szignifikánsnak mely megállapítást 20. ábrán bemutatott Pareto diagram is igazolja ($p > 0,1$).



20. ábra: A recirkulációs-térfogatáram, a transzmembrán nyomáskülönbség és a kettő interakciójának (1by2) hatása 90%-os szignifikancia szinten (Statikus keverő nélkül)

A Pareto diagramon is ugyanazt a következtetést vontam le, miszerint a térfogatáram és a fluxus a vizsgált tartományban nincs szignifikáns hatással a fluxusra, mindkét paraméter a 0,1-et jelölő piros vonal alatt helyezkedik el.

Statikus keverő nélkül a nyomásnak közel szignifikáns hatása van a fluxusra, ugyanis közel helyezkedik el a $p = 0,1$ -es értékhez. Az eredményeket szintén ábrázoltam felületi diagramon ami a 21. ábrán látható.



21. ábra: A szűrletfluxus változásának leírása a transzmembrán nyomáskülönbség és a recirkulációs-térfogatáram függvényében (Statikus keverő nélkül)

Az ábrázolt felületi diagramon is látható hogy a recirkulációs-térfogatáram és a transzmembrán nyomáskülönbség növelése jelentős hatással van a fluxus értékének növekedésében. Azonban ezen hatások mértéke kisebb, ha a membránszűrést statikus keverő nélkül végezzük. Így mindenképpen előnyös hatást gyakorol a szűrés teljesítményére az alkalmazott statikus keverő. A megnövekedett energiafogyasztástól (15. ábra 74. o) eltekintve több előnyös tulajdonság volt megfigyelhető a statikus keverők alkalmazásával (pl. fluxus növekedés, csökkent polarizációs réteg ellenállás).

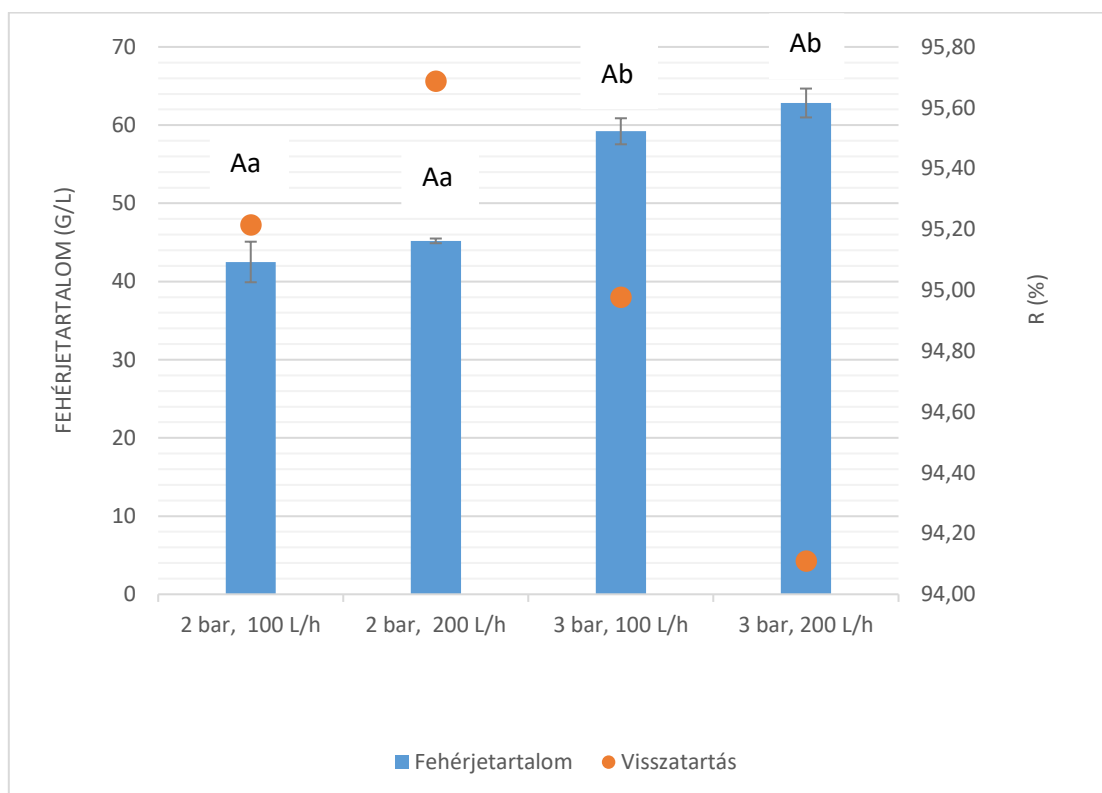
4.3 Fehérjekoncentráció meghatározása

A Bradford módszerrel végzett spektrofotometriás mérést 595 nm hullámhosszon végeztem spektrofotométerrel (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA). A 20. táblázatban látható továbbá, hogy a transzmembrán nyomáskülönbség 3 bar-ra történő növelésével, javítható a retentátumban mérhető fehérjekoncentráció értéke a membránszűrési folyamat végén (VCR = 2). 2 bar transzmembrán nyomáskülönbségen és 100 L/h recirkulációs-térfogatáramon mért fehérjekoncentráció értéke 42,5 g/L értékről 59,2 g/L-re nőtt abban az esetben, ha a besűrítést 3 bar transzmembrán nyomáskülönbségen és 100 L/h recirkulációs-térfogatáramon végeztem [BRADFORD, 1976].

20. táblázat: Bradford módszerrel végzett fehérjekoncentráció [g/L] értéke a retentátumban

Minta	1. Mérés [g/L]	2. Mérés [g/L]	3. Mérés [g/L]	Átlag	Szórás
2 bar, 100 L/h	41,70	45,40	40,40	42,50	2,59
2 bar, 200 L/h	44,90	45,50	45,20	45,20	0,30
3 bar, 100 L/h	57,80	58,79	61,05	59,21	1,67
3 bar, 200 L/h	62,99	60,91	64,59	62,83	1,85

A magasabb transzmembrán nyomáskülönbség hatására a fehérjemolekulák membrán pórusain való átjutása romlott, ami elképzelhető hogy a nagyobb transzmembrán nyomáskülönbség következtében alakult ki. A nyomás növelése (2 – 3 bar) jobban összenyomta a gélréteget, így magasabb fehérjekoncentráció volt mérhető a retentátumban. Állandó transzmembrán nyomáskülönbség mellett a recirkulációs-térfogatáram növelésével nem nőtt szignifikánsan a fehérjék koncentrációja a retentátumban. A mérési adatok alapján elmondható, hogy a legmagasabb fehérjekoncentrációt a 3 bar transzmembrán-nyomáskülönbség és a 200 L/h-ás recirkulációs-térfogatáramon mértem, 62,83 g/L. Megfigyelhető továbbá, ha ezen műveleti paraméterek alkalmazása mellett hajtom végre a membránszűrést, az energiafogyasztás értéke jóval magasabb értéket képvisel. Gazdaságossági szempontból, sokkal hatékonyabb a 3 bar transzmembrán nyomáskülönbség és 100 L/h recirkulációs-térfogatáram alkalmazása. A mért fehérjekoncentrációkat a visszatartással (R%) együtt a 22. ábrán mutatom be.



22. ábra: Fehérjekoncentráció és a visszatartás különböző transzmembrán nyomáskülönbség (bar) és recirkulációs-térfogatáram értékeknél (L/h). Az eredményeket három kísérleti eredmény átlagértékével és szórásával (\pm értékekkel) ábrázoltam. Felső indexben a – b (TMP) és A – B (RFR) jelölés jelenti az eredmények közötti szignifikáns különbséget, ahol is a kisbetűk: térfogatáram hatásának összehasonlítása adott nyomáson; nagybetű: nyomás hatásának összehasonlítása adott térfogatáram esetén

A fehérjekoncentráció retentátumban való növekedésében szignifikáns különbség tapasztalható az alkalmazott transzmembrán nyomáskülönbség esetében ($F(1;8)=272,19$; $p<0,001$). A két különálló csoportot a – b és A – B (RFR = 100 L/h, RFR = 200 L/h) jelöléssel láttam el. A 2 bar transzmembrán nyomáskülönbségen (a) végzett besűrítések során a fehérjekoncentráció értéke megközelítőleg azonos volt 42-45 g/L közötti. Azonban, ha a besűrítést 3 bar transzmembrán nyomáskülönbségen (b) végzem, a fehérjekoncentráció értéke jelentős mértékben növekszik. Nagyobb transzmembrán nyomáskülönbség alkalmazása során javul a membránszűrés során mérhető fluxus értéke melynek következtében javul az elválasztás, a retentátum koncentrációja nő. Szignifikáns különbség volt tapasztalható a két csoport között a változtatott TMP értékek esetében is ($F(1;8)=9,21$; $p<0,05$).

Megállapítható továbbá hogy a fehérjekoncentráció növekedésében nagyobb hatást gyakorol a folyamatra a nyomáskülönbség mint a recirkulációs-térfogatáram; ha ugyanis a térfogatáram hatását a 2, illetve 3 bar nyomáson külön hasonlítjuk össze, a szignifikáns különbség már nem igazolható ($p > 0,05$; M3 4. Táblázat).

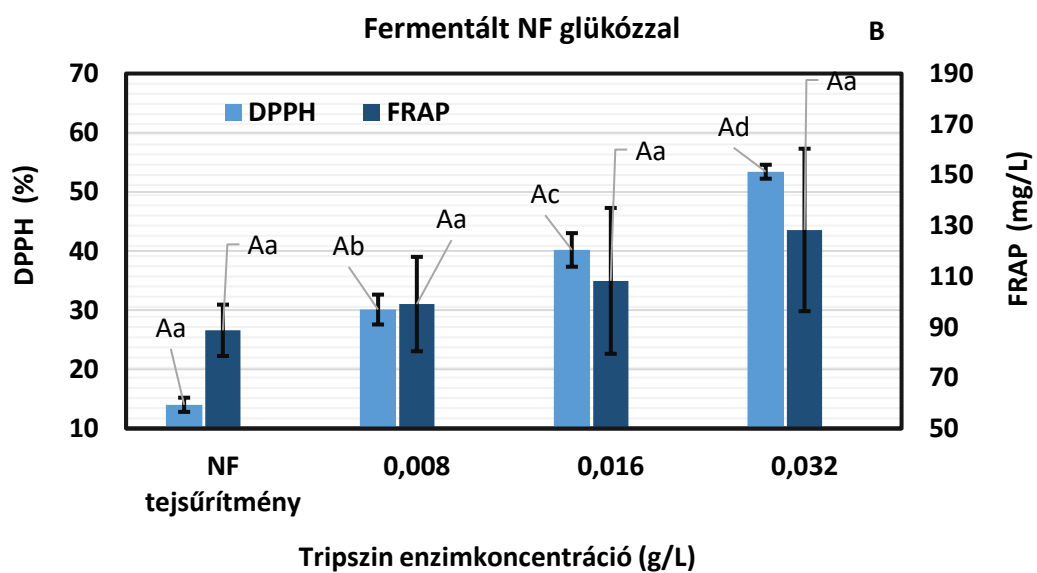
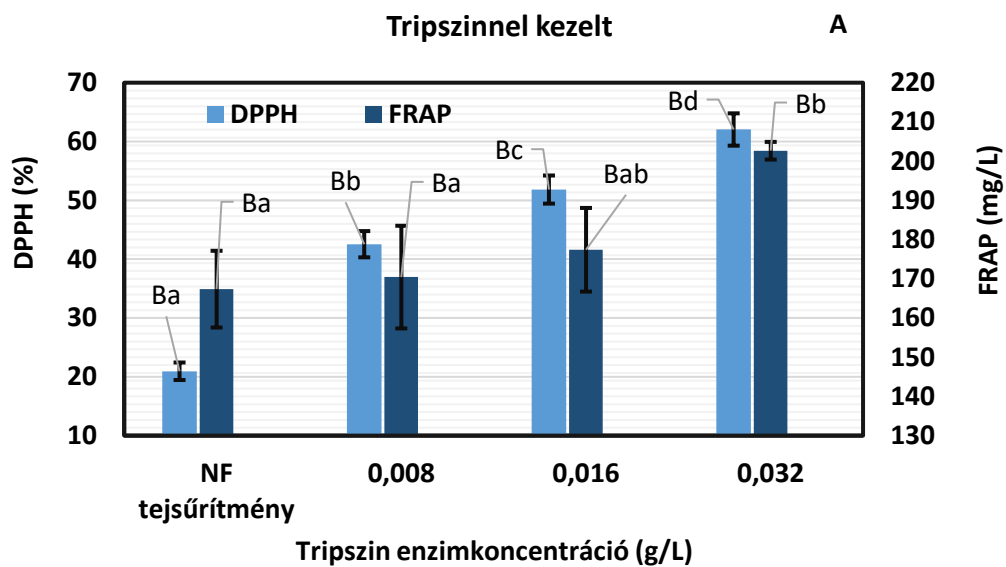
4.4 Antioxidánskapacitás meghatározása

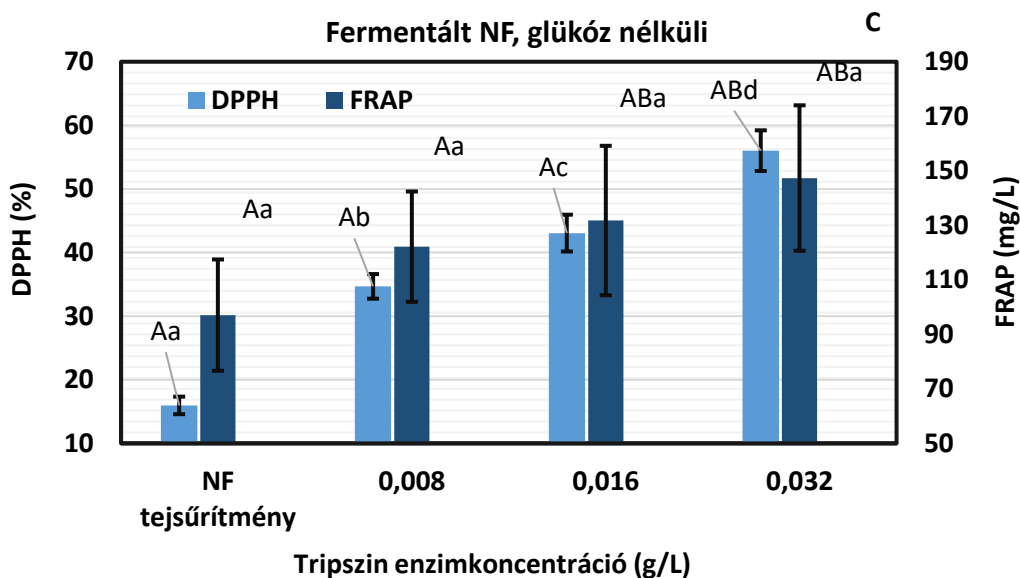
A vizsgált minták antioxidáns tartalmát két különálló módszerrel vizsgáltam, melynek eredményeit az alábbi fejezetben mutatom be. Az alkalmazott két antioxidáns tartalom vizsgáló módszerhez a FRAP és a DPPH módszert választottam [NEMES et al., 2015].

Az antioxidáns tartalom mérése során, a kezeletlen UHT tej antioxidáns kapacitása $93,3 \pm 18,77$ mg/L volt, aszkorbinsavra vonatkoztatva (FRAP). A nanoszűrt fehérjesűrítmény antioxidáns kapacitása $167,35 \pm 9,78$ mg/L volt aszkorbinsavra vonatkoztatva (FRAP). A mért eredményeken látható továbbá, hogy a 0,032 g/L-es tripszin enzimkoncentráció esetén volt mérhető a legmagasabb antioxidáns tartalom, ami 202,65 mg/L volt (FRAP), (23(A). ábra), azonban az alkalmazott enzim mennyiségének a pontos megválasztása kiemelten fontos. Hasonló eredményt tapasztaltam a DPPH módszerrel végzett vizsgálataim során. Ebben az esetben is látható, ha az alkalmazott enzim mennyiségét növeljük a mért antioxidáns tartalom is nőni fog. A DPPH módszer esetében a nanoszűrt fehérjesűrítmény antioxidáns kapacitása $20,94 \pm 1,48$ % volt, melynek értéke az 0,032 g/L-es enzimes kezelés során $62,04 \pm 2,74$ % nőtt. A 23 (B-C). ábrán láthatóak továbbá a fehérjesűrítmény mellett az enzim kezelt, fermentált minták antioxidáns tartalmi hozzáadott glükózzal (B), illetve nélküle (C). Ha az enzimkoncentráció értéke túl magas, abban az esetben a termék organoleptikus tulajdonságait is előnytelen irányba tudja befolyásolni.

A MANOVA-teszt szerint mind a csoportok (tejfélhárjesűrítmény, fermentált hidrolizátum + glükóz, illetve fermentált hidrolizátum glükóz nélkül), mind pedig a kezelések hatása szignifikáns volt (Wilk-féle lambda a csoportokra: 0,089, a kezelésekre: 0,014, mindkettőre $p < 0,001$). A két faktor interakciója nem volt szignifikáns (Wilk-féle lambda: 0,765; $p = 0,87$).

A változónkénti ANOVA eredménye mindkét faktor esetén mindkét változóra szignifikáns hatást mutatott (FRAP: $F(2,24) = 44,39$; $p < 0,01$; DPPH: $F(2,24) = 60,31$; $p < 0,01$; M3 8-9. táblázat)





23. ábra: Antioxidáns-kapacitás mérési eredményei fehérjesűrítmény tripszin enzim hidrolízisét követően (A), enzimesen hidrolizált fehérjesűrítmény glükózzal végzett fermentációja során (B) enzimesen hidrolizált fehérjesűrítmény glükóz nélküli fermentációval (C) FRAP (mg/L)- és DPPH (%)-módszerrel. Az eredményeket három kísérleti eredmény átlagértékével és szórásával (\pm értékekkel) ábrázoltam. Felső indexben a – b – c – d (kezelések hatása csoportonként, Tukey post hoc teszttel) és A - B (csoportok közti összehasonlítás azonos kezelés mellett) jelölés jelenti az eredmények közötti szignifikáns különbséget

Azt vizsgáltam, hogy az egyes csoportok és kezelések (NF, N1 = 0,008 g/L, N2 = 0,016 g/L, N3 = 0,032 g/L) átlagai szignifikánsan különböznek-e egymástól FRAP és DPPH módszer alkalmazása során. A DPPH módszerrel való antioxidáns tartalom vizsgálat során jól látható hogy a 23-as (A – B – C) ábrák mindegyikén különálló csoportok figyelhetőek meg az egyes enzimkoncentrációk tekintetében. A (NF, N1 = 0,008 g/L, N2 = 0,016 g/L, N3 = 0,032 g/L) minták szignifikánsan különböznek egymástól, mely szignifikáns különbség a növelt enzimkoncentráció következtében alakul ki. Az enzim kezelt fehérjesűrítmény esetében jól látható hogy szignifikáns különbség mutatkozik az antioxidáns tartalomban a növelt enzimkoncentráció függvényében. Hasonló a tendencia a fermentált minták esetében, ahol a csoportok közötti szignifikáns különbség a növelt enzimkoncentráció során alakul ki.

Kijelenthető hogy a csoportok közötti szignifikáns különbség az enzimkoncentrációk növelésének köszönhető és az antioxidáns tartalom változása az enzimkoncentráció függvényében változik. Ellenben a DPPH módszerrel, a FRAP féle vizsgálatok során már nem minden csoport között áll fent szignifikáns különbség. A tejfehérjesűrítmény esetében a FRAP módszer esetében nem tapasztalható szignifikáns különbség a nanoszűrt tejfehérjesűrítmény és N1 = 0,008 g/L minták között, mely a Tukey féle teszt alapján is megerősítést nyert, az N2 = 0,016 g/L és N3 = 0,032 g/L esetében azonban megmutatkozik a szignifikáns különbség a növelt enzimkoncentrációk között. Tehát az antioxidáns-tartalom változás már szignifikánsnak tekinthető N2 és N3 esetében a FRAP módszerrel végzett mérések során. A fermentált minták esetében nem figyelhető meg a kezelések közötti szignifikáns különbség hatása, a fermentált mintáknál, ahol glükóz hozzáadása történt minden csoport homogénnek tekinthető.

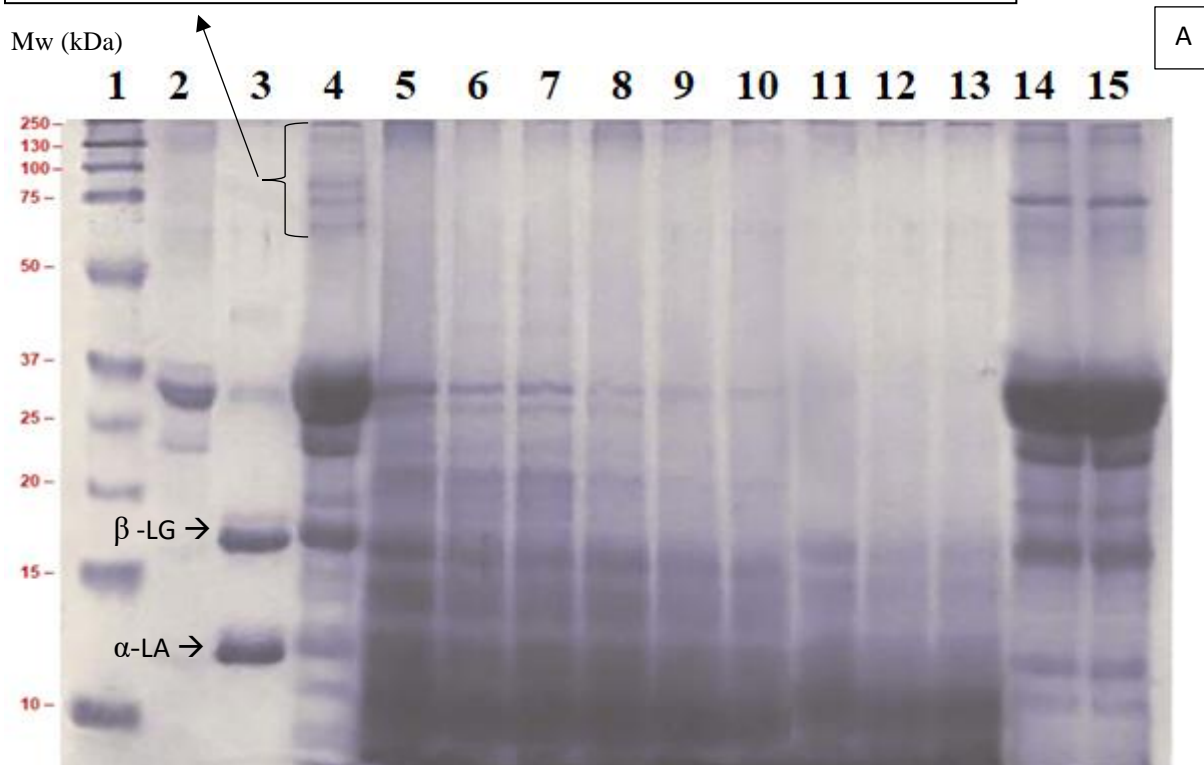
A 23 (B) és 23 (C) ábrákon a FRAP és DPPH módszerrel mért antioxidáns tartalmak csökkentek. A fermentáció hatására csökkenő érték tapasztalható az antioxidáns tartalomban, továbbá a fermentáció során hozzáadott glükóz is negatívan befolyásolja az antioxidáns kapacitást. Az antioxidáns kapacitás csökkenésére számos paraméter van hatással, melyek közül az egyik a hidrofil és hidrofób peptidek aránya. A *Lactobacillus bulgaricus* hidrofil és hidrofób peptideket szabadít fel a β -laktoglobulinból, míg a *Streptococcus thermophilus* csak hidrofil peptideket. Kazeinek esetében a *Lactobacillus bulgaricus* és a *Streptococcus thermophilus* hidrofób peptideket szabadít fel. Feltételezhető, hogy a hidrofil peptidek jelenléte csökkentheti a fermentált termék általános antioxidáns kapacitását [PESCUMA et al., 2007; TZVETKOVA et al., 2007].

Míg a 0,032 g/L tripszinnel kezelt nanoszűrt fehérjesűrítmény $202,65 \pm 2,25$ mg/L (FRAP) és $62,04 \pm 2,74$ % (DPPH) volt az antioxidáns tartalom, fermentáció után ez az érték $147,34 \pm 26,68$ mg/L (FRAP) és $56,02 \pm 3,19$ % (DPPH)-re, hozzáadott glükóz után $128,3 \pm 32,04$ mg/L (FRAP) és $53,4 \pm 1,17$ % (DPPH)-re csökkent.

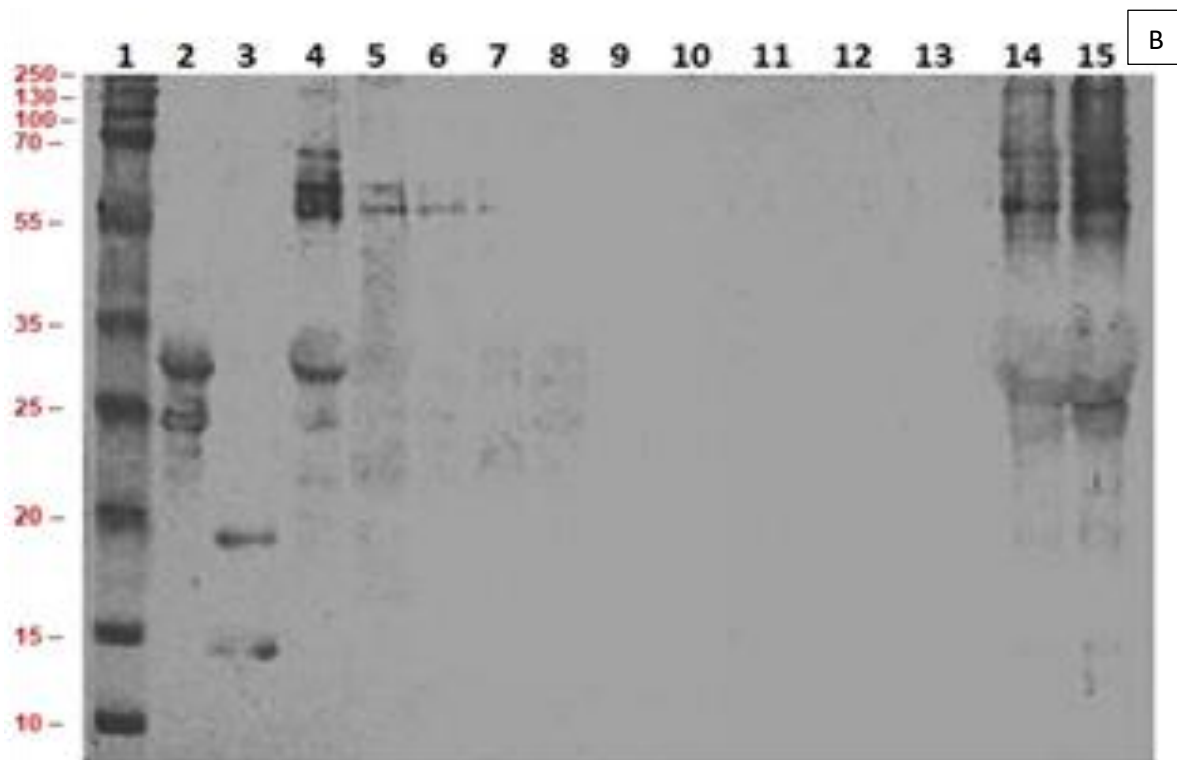
4.5 A tej-sűrítmények fehérje-eloszlásában bekövetkező változások nyomonkövetése a különböző koncentrációban használt tripszines hidrolízis hatására

A molekulatömeg szerinti fehérje-eloszlásnak a meghatározására poliakrilamid gélelektroforézis módszert használtam. Ahogyan a 2.3-as fejezetben bemutatásra került, a tejfehérjék 80%-át kazeinek és 20%-át savófehérjék alkotják, mely csoportokon belül az egyes kazein és savófehérje frakciók molekulatömege változó értéket képvisel (2.5.2-es fejezet). Jelen fejezetben az enzimes hidrolízis előtt, majd azt követően vizsgáltam a minták fehérje-eloszlásának, illetve allergénitálásának a változását. Az allergéntartalom változásának a vizsgálatához tejpozitív humánszérumot alkalmaztam, mely esetben a tej fő allergén komponenseinek (kazeinek, α -laktalbumin, β -laktoglobulin) jelenlétét mértem az egyes mintákban. A western blot vizsgálat során az anti-kazein IgE, anti- α -laktalbumin és anti- β -laktoglobulin reakcióba lép a humánszérum IgE ellenanyagával.

A felső nagymolekulatömegű sávban az alábbi fehérjék voltak leolvashatóak: BSA, (67 kDa), a laktoferrin (76–80 kDa) és az immunglobulinok (kb. 160 kDa).



Mw (kDa)



24. ábra: A különböző koncentrációban alkalmazott tripszines hidrolízissel előállított tejsűrítmények SDS-PAGE (A) és tejpozitív humánszérummal végzett immunblot képe (B)

1. Mw (BioRad, Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, 1610374)
2. kazein (20-30 kDa)
3. α -laktalbumin (α -LA, 14,4 kDa) és β -laktoglobulin (β -LG, 18 kDa)
4. NF tejsűrítmény – [NF]
5. 0,008 g/L tripszinnel kezelt NF tejsűrítmény – [N1]
6. 0,008 g/L tripszinnel kezelt fermentált NF tejsűrítmény [N1Y]
7. 0,008 g/L tripszinnel kezelt fermentált NF tejsűrítmény + Glükóz - [N1Y + G]
8. 0,016 g/L tripszinnel kezelt NF tejsűrítmény - [N2]
9. 0,016 g/L tripszinnel kezelt fermentált NF tejsűrítmény – [N2Y]
10. 0,016 g/L tripszinnel kezelt fermentált NF tejsűrítmény + Glükóz – [N2Y + G]
11. 0,032 g/L tripszinnel kezelt NF tejsűrítmény – [N3]
12. 0,032 g/L tripszinnel kezelt fermentált NF tejsűrítmény – [N3Y]
13. 0,032 g/L tripszinnel kezelt fermentált NF tejsűrítmény + Glükóz – [N3Y + G]
14. Fermentált NF tejsűrítmény – [NFY]
15. Fermentált NF tejsűrítmény + Glükóz – [NFY + G]

A hidrolízis hatásfoka az enzimkoncentrációk növelésével javult, minél nagyobb volt az alkalmazott enzim mennyisége annál hatékonyabb volt a fehérjék hidrolízise a folyamat során.

A 24./A ábrán jól látható, hogy a tripszines kezelés hatására a fehérjemintázat megváltozott, a fehérjék nagymértékben lebomlottak, továbbá a felső nagymolekulatömegű sávokban a fehérjék mennyisége jelentősen lecsökkent, eltűnt, már a 0,008 g/L tripszin koncentráció hatására. Irodalomból ismert a kazeinek esetében, hogy az α -kazein a micella belsejében helyezkedik el, így a tripszin enzim számára nem hozzáférhető melynek következtében nem tud részt venni a hidrolízisben. Ezzel szemben a κ -kazein a kazein micella külső részén helyezkedik el, így könnyen részt tudott venni az enzimátikus reakcióban [CHEEMA et al., 2015]. Az alsó, alacsonyabb molekulatömeg tartományban több peptid / fehérje látható (eddigie meglevőek, illetve újonnan keletkezettek). Több esetben diffúz zóna is megjelent, ami egyértelműen a hidrolízisre utal.

Az nanoszűrt fehérjesűrítmenyből előállított fermentált készítmények (NFY, NFY + G) esetében is hasonló fehérjemintázat látható mint a normál nanoszűrt fehérjesűrítmenynél. Megfigyelhető továbbá, hogy a hozzáadott glükóz nem befolyásolja a tejsűrítmenyben található fehérjék hidrolízisét a folyamat során.

24/B ábrán jól látható hogy az allergiás betegszérum a fő allergénfehérjékkel reakcióba lépett, mely az erősen megfestett immunreaktív sávokon is jól megfigyelhető. Az egyes sávok intenzív elszíneződése az adott allergén fehérje jelenlétére utal. Az immunblot vizsgálat során a 2 - 3 sávra kerültek felvitelre a vizsgálandó allergén fehérjék, míg a 4 – 15 közötti sávok az előállított mintákban lévő fehérjék allergéntartalmát mutatják be.

A hőkezelése során (NF tejsűrítmeny – 4. sáv) a fehérjéket rendkívül magas hőterhelés éri ennek következtében az α -laktalbumin és β -laktoglobulin fehérjék szerkezete felnyílik, a fehérjeláncok felhasadnak. Ez köszönhető annak, hogy a fehérjék térbeli szerkezetének a megváltozásával az epitópok jelentős része inaktívvá válik így csökken az allergénhatás mértéke. [WRÓBLEWSKA és KALISZEWSKA, 2012].

Már az első kezelés (0,008 g/L) során megfigyelhető volt, hogy az α -laktalbumin nem mutatott immunreaktivitást a humán tej-allergiás szérummal szemben. Azonban a κ -kazeinokban és a konjugált β -laktoglobulinban és α -laktalbuminban még mindig jelen van a fennmaradó allergén hatás a 2. kezelést (0,016 g/L – 8. sáv) követően, melyet egy halvány immunreaktív sávot jelez 20 – 35 kDa között.

A kazeinfehérjék esetében a gélkép alapján látható, hogy a 3. kezelés (0,032 g/L – 11. sáv) hatására a hidrolízis során a sávintenzitás jelentősen lecsökkent ugyan, de még immunreaktivitást (halvány immunreaktív fehérjesávot) mutatott. A hidrolízis hatására a keletkező – alsó tartományban lévő – peptidek esetében nem volt megfigyelhető immunreaktivitás a szérummal szemben.

A fermentált tejsúrítmények (NFY, NFY + G) esetében jól látható az allergénfehérje sávok intenzív megfestődése, ezen minták esetében az allergénhatás jelentős.

Megfigyelhető, hogy az allergén hatás tovább csökkenthető abban az esetben ha az enzimesen hidrolizált mintákat tejsavbaktériumokkal fermentáljuk, mely jól látható például az N1, N1Y és N1Y + G minták esetében. Ez a tendencia szintén megfigyelhető a 0,016 és 0,032 g/L enzimkoncentrációnál is.

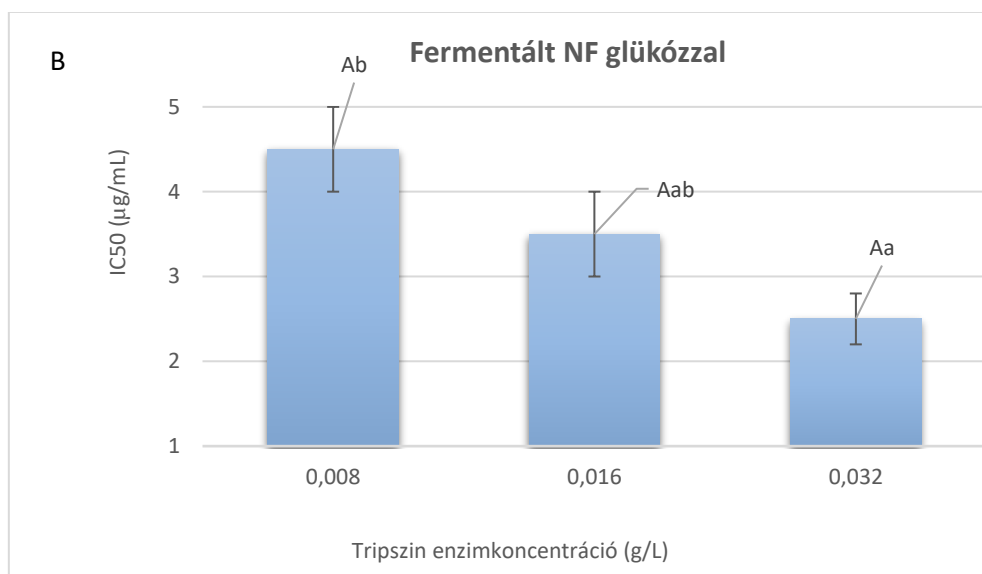
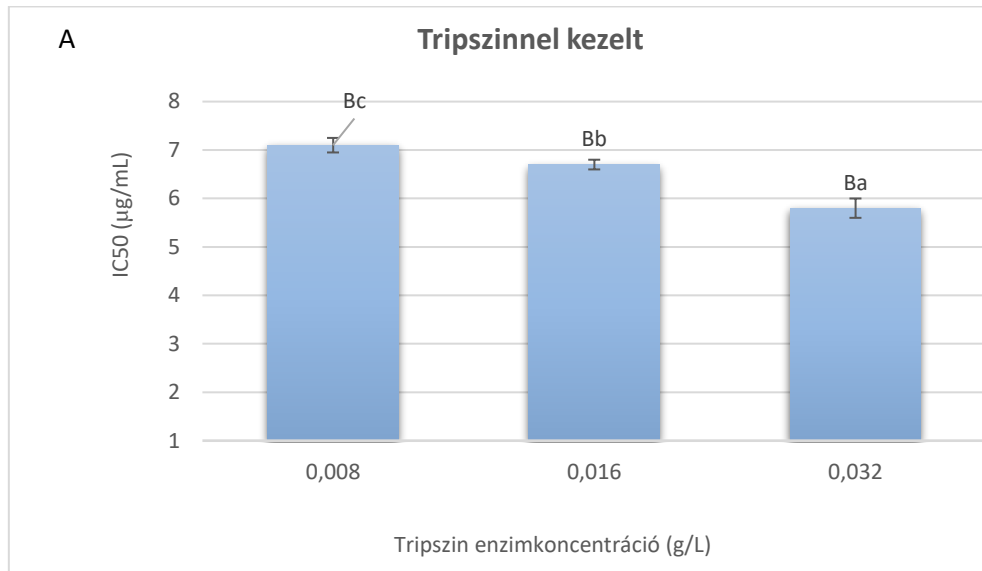
LIANG 2020-as kutatásai nyomán is megállapítható hogy az enzimes kezelés hatására jelentősen csökken a fehérjék allergénitása. A hidrolízis következtében jelentősen nőtt a kis molekulatömegű (<3 kDa) peptidek mennyisége, melynek hatására az allergénhatás is csökkent. A kutatások alapján a kombinált enzimekkel (protamex, alkaláz) végzett hidrolízis tovább csökkentheti az adott minta allergén hatását.

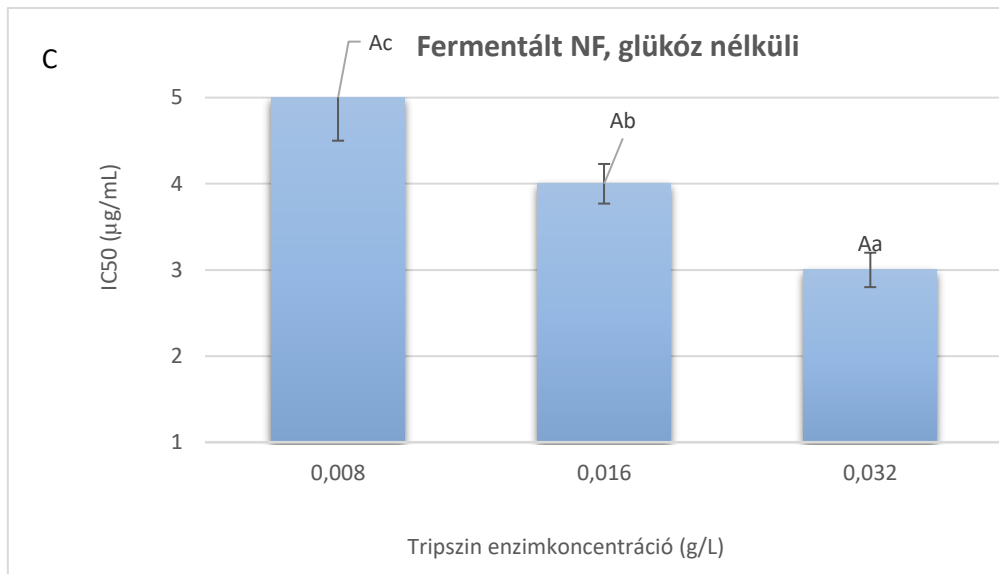
4.6 Angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) gátlás aktivitásának vizsgálata

A 2.4-es fejezetben bemutatott angiotenzin-konvertáló enzim gátlásának jelentős szerepe van az egészség megőrzésében, gátlásával csökkenthetőek a magas vérnyomás okozta káros szív és érrendszeri megbetegedések kockázata. A gátló peptidek segítik a vérnyomás szabályozását, az ACE I – II konverzió gátlásával, melynek következtében a vérnyomás alacsony értéken tartható. Jelen fejezetben a kezelt minták inhibíciós képességét vizsgáltam az enzimes kezelések és a fermentáció függvényében.

Az ACE gátlás során kapott eredményeket a 25. ábrán foglaltam össze. A bemutatásra kerülő diagramot több részre/csoportra osztottam fel, melyek az alábbiak voltak: (A) tripszinnel kezelt folyékony tejfehérje-koncentrátum angiotenzin-konvertáló enzim aktivitására kifejtett gátlóhatását, (B) esetben a fermentált fehérje-koncentrátum angiotenzin-konvertáló enzim gátlóhatása (IC_{50}) látható hozzáadott glükózzal, illetve nélküle (C). A 26. ábra (D) esetében szintén az angiotenzin-konvertáló enzim aktivitására kifejtett gátlóhatásának (IC_{50}) eredményei láthatóak a különböző koncentrációk esetében, míg a 26. ábra (E – F) esetében a gátlóhatás értékei láthatóak hozzáadott glükózzal és nélküle.

Az ANOVA alapján az egyes csoportok között (tejfehérjesűrítmény, fermentált hidrolizátum + glükóz, illetve fermentált hidrolizátum glükóz nélkül) és az egyes kezelések között is szignifikáns különbség mutatható ki ($F(2,18) = 213,08$; $F(2,18) = 63,05$, mindkét esetben $p < 0,01$) (M3 12. táblázat). A Tukey-féle post hoc tesz eredményét az M3 melléklet 13. táblázata mutatja be.





25. ábra: Az angiotenzin-konvertáló enzim aktivitására kifejtett gátlóhatását (IC₅₀) [µg/mL] a membránszűrőssel előállított fehérjesűrítvény enzimes hidrolízisét követően (A), enzimesen hidrolizált fehérjesűrítvény glükózzal (B) illetve nélküle (C) végzett fermentációja során. Az eredményeket három kísérleti eredmény átlagértékével és szórásával (± értékekkel) ábrázoltam. Felső indexben a – b – c a kezelések (N1 – N2 – N3), az A – B a csoportok (fehérjesűrítvény (NF), fermentált hidrolizátum (glükóz hozzáadásával), fermentált hidrolizátum (glükóz nélkül) között jelenti az eredmények közötti szignifikáns különbséget. A kisbetűk: kezelések hatásának összehasonlítása adott csoportban; nagybetű: csoportok hatásának összehasonlítása kezeléseken során

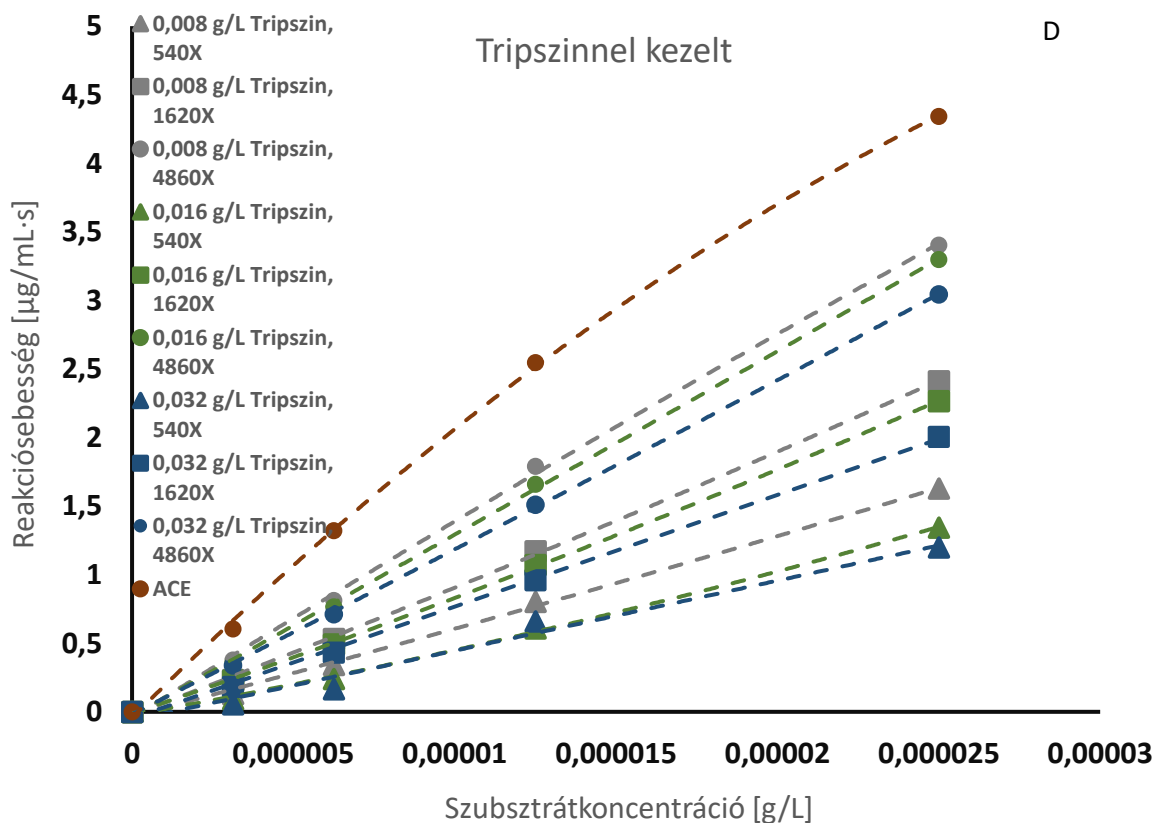
A Tukey-féle eljárással vizsgáltam, hogy az egyes minták kezelése (N1 = 0,008 g/L, N2 = 0,016 g/L, N3 = 0,032 g/L) és a csoportok átlagai között mérhető-e szignifikáns különbség. Jól látható hogy a vizsgált csoportoknál minden esetben szignifikáns különbség mutatkozik az enzimmel kezelt minták között. Az enzimkoncentráció növelésével minden esetben csökken az IC₅₀ értéke.

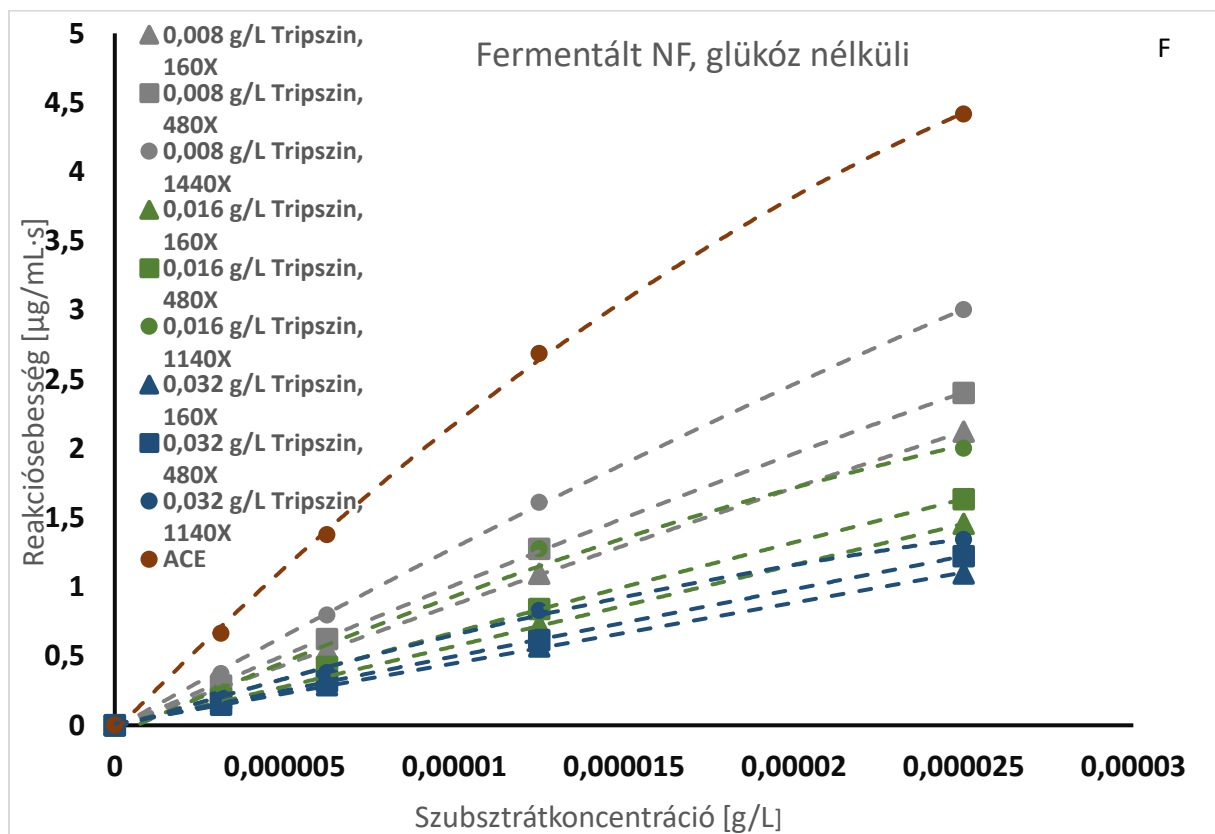
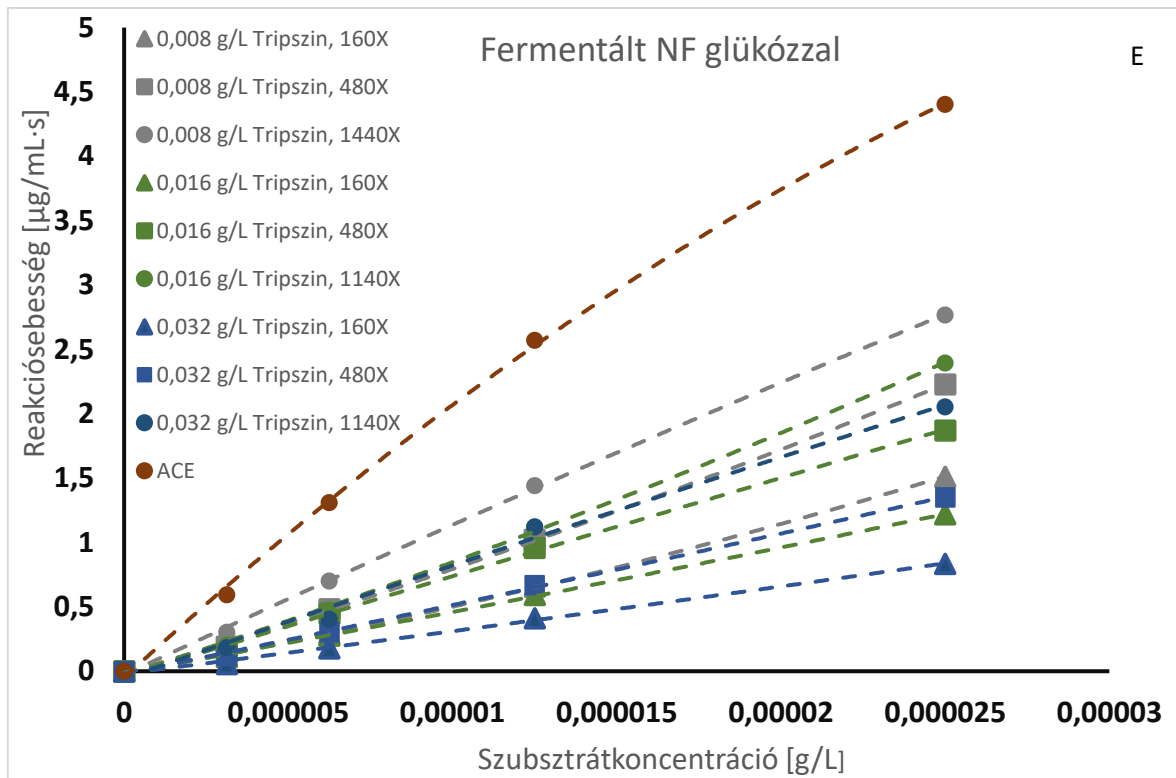
Az IC₅₀ érték azt az inhibitor koncentrációt adja meg melynek értéke elégséges ahhoz, hogy az angiotenzin-konvertáló enzim működése gátolva legyen a folyamat során. A tejfehérjék, különösen a kazeinek hidrolízise során a tejsavbaktériumok ACE gátló peptideket szabadítanak fel [MINERVINI et al., 2003].

Megállapítható továbbá hogy a hozzáadott glükóz is hatással van a folyamat során mért IC₅₀ értékre, ugyanis azokban a mintákban, ahol glükózt adtam a mintákhoz kisebb IC₅₀ értéket kaptam mint azoknál, ahol nem adtam glükózt a mintákhoz. Ez azzal magyarázható, hogy a hozzáadott szénhidrát elősegíti a baktérium sejtek növekedését, melyek hatással vannak a fehérjék proteolízisére [RAMCHANDRAN és SHAH, 2009; VERMEIRSEN et al., 2003].

Az alacsony zsírtartalmú tej fermentációja inulin jelenlétében, illetve exopoliszacharidok tejsavbaktériumokkal történő alkalmazása esetén alacsonyabb IC₅₀-értéket kapunk, ellenben a szénhidrátok nélküli fermentációhoz [SHAKERIAN et al., 2013].

Az ACE gátlás mértéke a tejfehérje-koncentrátumban szignifikánsan nőtt az alkalmazott enzimkezelés hatására, melynek mértéke arányosan nőtt a tripszin koncentrációjával. Más kutatások is jelen eredményeket tapasztalták a vizsgált témakörben [ABD EL-FATTAH et al., 2017].





26. ábra: Az angiotenzin-konvertáló enzim [$\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{s}$] aktivitás vizsgálata eltérő fehérje hidrolizátum koncentrációk mellett előállított fehérjesűrítmény enzimes hidrolízise (D), enzimesen hidrolizált fehérjesűrítmény glükózzal (E) illetve nélküle (F) végzett fermentációja során.

Az ábrázolt diagram (D) esetében a K_S Michaelis-Menten állandó értéke $77 \mu\text{M}$. Az eredmények az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) tejfehérjék általi gátlásának nem kompetitív mechanizmusát mutatták, ilyenkor a V_{max} csökken, de a K_S értéke nem változik. Hasonló nem kompetitív gátlás látható a (E – F) ábrák esetében is, ahol is K_S Michaelis-Menten állandó értéke 60 és $85 \mu\text{M}$. A 26. ábrán látható továbbá hogy az enzimes hidrolízis következtében csökkenő tendencia figyelhető meg az egyes minták reakciósebességében, ami reakciósebesség csökkenés egyenes arányos az inhibíció növekedésével vagy ACE enzim gátlásával. A D – E – F ábrákon látható piros színnel jelölt (ACE) görbe esetében a szubsztrát mellett csak ACE enzim került alkalmazásra, ahol is látható a kiindulási reakciósebesség, illetve ACE gátlás mértéke.

Abban az esetben ha a fehérjesűrítményt $0,008 \text{ g/L}$ koncentrációjú tripszin enzimmel kezelem 540 , - 1620 , - 4860 , - as hígítási sor mellett megfigyelhető hogy a kiindulási $4,34 \mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{s}$ reakciósebesség $3,4 \mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{s}$ -re csökken. Ez a csökkenő tendencia a nagyobb enzimkoncentrációk esetében is jól látható, ugyanis ha a tripszin enzim mennyiségét $0,016$ és $0,032 \text{ g/L}$ -re növelem a mért reakciósebesség tovább csökken. Ha az enzimesen hidrolizált fehérjesűrítményt ($0,008$, - $0,016$, - $0,032 \text{ g/L}$) fermentálom (F) 160 , - 480 , - 1440 , -es hígítás mellett, a reakciósebesség csökkenése folytatódik. Megállapítható hogy a fermentáció elősegíti az ACE gátlás mértékét, ugyanis a fermentáció előrehaladtával nő a mintákban az ACE gátló peptideknek a mennyisége.

A hidrolizált tejfehérje-koncentrátum mikrobiális fermentációjával előállított ACE gátló peptidek megváltoztatják az ACE enzim felépítését, valamint az aktív centrum szerkezetét, melynek hatására a szubsztrát és az ACE enzim közötti reakciósebesség csökken vagy leáll [MEDEIROS et al., 2013].

A hidrofób aminosavakat tartalmazó peptidek, mint például a fenilalanin, prolin, triptofán és tirozin a C-terminális helyzetben kötődhetnek az angiotenzin konvertáló enzimmel, ezzel elősegítve a gátló hatás kialakulását [LÓPEZ-FANDIÑO et al., 2006].

4.7 Mikrobiológiai aktivitás vizsgálata enzimes hidrolízissel előállított minták esetében

Az élelmiszer eredetű megbetegedések kialakulásában jelentős szerepet képviselnek az élelmiszerekben található mikroorganizmus törzsek. Számos mikroba törzs természetes módon is jelen van az élelmiszerekben, jelenlétük sok esetben létfontosságú a végtermék jellegének kialakulásában. Azonban a jótékony/hasznos baktériumok mellett patogén törzsekkel is találkozhatunk, melyek számos veszélyforrás és megbetegedés forrásai lehetnek.

Számos kutatás vizsgálta a tejfehérjék antibakteriális hatását, képességét bizonyos patogén mikroorganizmus törzsek esetében. Az esetek jelentős részében a tejfehérje-koncentráció nem mutatott antibakteriális aktivitást, az alkalmazott agarlemezen nem volt gátlási zóna megfigyelhető.

Néhány esetben megfigyelhető volt hogy a savófehérjék közül a laktoferrin és a laktoperoxidáz mutat némi antibakteriális aktivitást, de ennek mértéke elenyészőnek tekinthető. Antibakteriális aktivitás mérhető továbbá az α_{s2} -kazein tripszin enzimes hidrolízise után felszabaduló Casocidin-I esetében *Staphylococcus carnosus* nézve [WANG et al., 2020; ZUCHT et al., 1995; SEIFU et al., 2005].

Mivel a membránszűrés során a savófehérjék mennyisége alacsony volt a mintákban, így a tejfehérjesűrítőanyagban nem volt mérhető antibakteriális aktivitás, gátlási zóna nem volt megfigyelhető.

Azonban a tripszinnel végzett enzimes hidrolízis során már megfigyelhető volt az antibakteriális aktivitás *Bacillus cereus* és a *Staphylococcus aureus* mikroba törzsekkel szemben.

A peptidek és a baktériumok sejtmembránja közötti kapcsolat számos paramétertől függ, mely többek között az egyes peptidek koncentrációjától és annak aminosav szekvenciájától [PATRZYKAT és DOUGLAS, 2005].

Megállapítható továbbá, hogy a Gram + mikrobák érzékenyebbek a tejsavófehérjékből származó peptidekre, ellentétben a Gram - mikrobákkal. Az antibakteriális aktivitással kapcsolatos mérési eredményeimet a 27. ábra mutatja be, melyben az enzimesen hidrolizált tejfehérjesűrítőanyag, továbbá a fermentált minták (glükóz hozzáadásával, illetve nélküle) során mért gátlási zónák láthatóak.

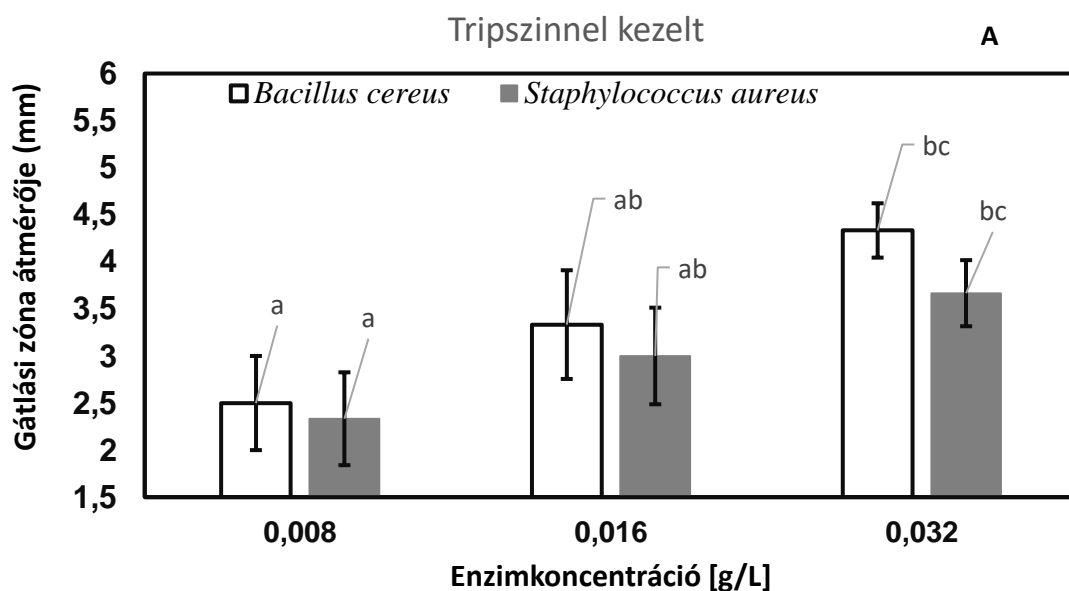
Az eredményeket három párhuzamos mérés során kapott átlag és szórás értékekkel mutatom be, továbbá az egyes csoportok közötti szignifikáns különbségeket is vizsgáltam Tukey statisztikai próba használatával.

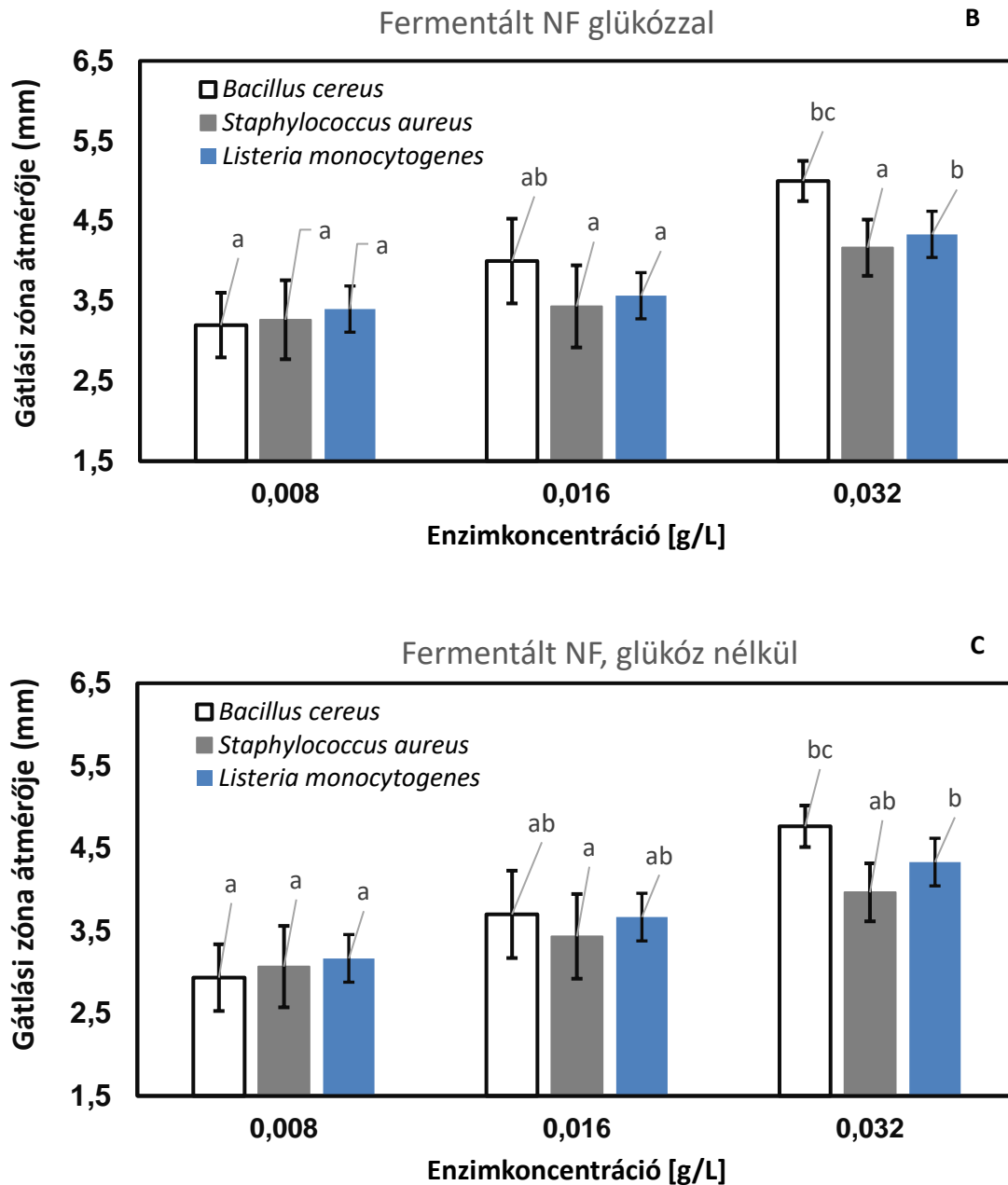
Ahogy a 27. ábrán is látható az enzim kezelt, illetve a fermentált minták esetében mérhető gátlási zóna volt megfigyelhető *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* és *Staphylococcus aureus* törzseknél.

A MANOVA szignifikáns kezeléshatást mutatott ki tejfehérjesűrítményre (Wilk-féle lambda=0,079; $p < 0,01$; M3 18 – 19. táblázat). *Bacillus cereus* és *Staphylococcus aureus* esetén is szignifikáns volt a kezeléshatás ($F(3,8) = 21,63$; $p < 0,001$, illetve $F(3,8) = 15,46$; $p < 0,01$).

A fermentált minták esetében a kezelésre szignifikáns MANOVA eredményt kaptunk, ám a hozzáadott glükózra nem (Wilks-féle lambda: 0,03; $p < 0,001$, illetve 0,82; $p = 0,42$).

A változónkénti ANOVA a kezelésre mindhárom esetben szignifikáns eredményt adott (*Bacillus cereus*: $F(3,16) = 47,52$, *Staphylococcus aureus*: $F(3,16) = 24,39$, *Listeria monocytogenes*: $F(3,16) = 104,99$, mindhárom esetben $p < 0,001$). A páronkénti összehasonlítást Tukey-féle post hoc teszttel végeztem (27. ábra, M3 20-28. táblázat).

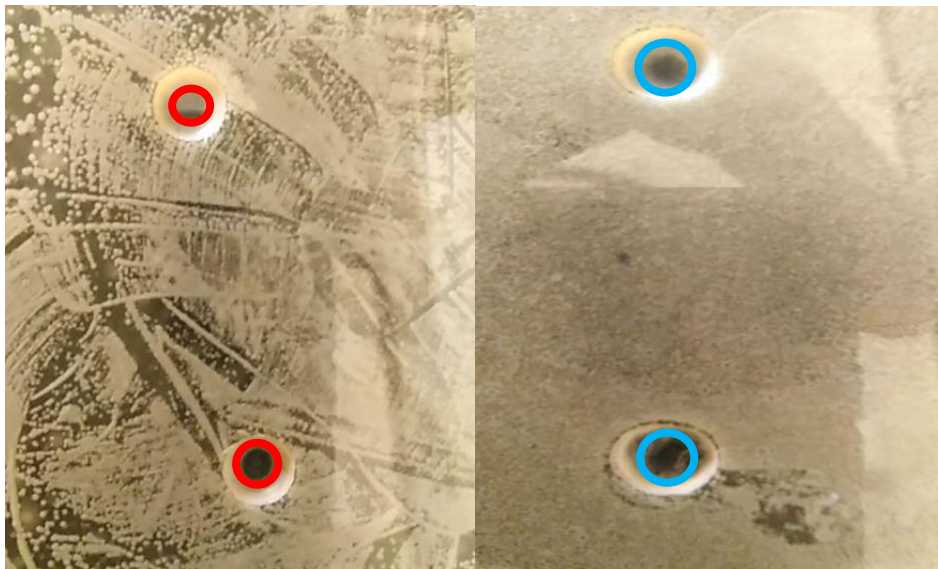




27 .ábra: Mikrobiológiai aktivitás (gátlási zóna) [mm] vizsgálata eltérő tripszin koncentrációk mellett előállított fehérjesűrítmény (A), hidrolizátum fermentációja glükózzal (B) és a hidrolizátum fermentációja glükóz hozzáadása nélkül (C). Az eredményeket három kísérleti eredmény átlagértékével és szórásával (\pm értékekkel) ábrázoltam. Felső indexben a – b – c jelölés jelenti a kezelések (N1 = 0,008 g/L – N2 = 0,016 g/L – N3 = 0,032 g/L) közötti szignifikáns különbséget.

Látható továbbá, hogy a tripszin koncentrációjának 0,008 g/L értékről 0,032 g/L-re (N1 – N3) való növelésével a gátlási zóna mérete növekvő tendenciát mutat az alkalmazott baktérium törzsek mindegyikénél.

Bacillus cereus esetében vizsgált gátlási zóna mérete az alábbiak szerint változott: az enzim koncentráció 0,008 - 0,032 g/L-re történő növelésével a gátlási zóna 2,5 mm-ről 4,3 mm-re nőtt. Ugyanezen koncentrációkat vizsgálva a *Staphylococcus aureus* esetében is nőtt a gátlási zóna mértéke, mely ebben az esetben 2,3 mm-ről 3,6 mm-re változott, melynek eredményeit a 28. ábra mutatja be.



28. ábra: Mikrobiológiai aktivitás (gátlási zóna) [mm] vizsgálata *Staphylococcus aureus* mikrobatorzs esetében a hidrolizátum fermentációja során, alacsony és magas enzimkoncentrációnál (N1 (piros) – N3 (kék)).

Listeria monocytogenes esetében a gátlást csak a fermentált minták esetében vizsgáltam 29. ábra (B – C), ahol is a 0,008 – 0,032 g/L enzimkoncentráció alkalmazása során a gátlási zóna 3,2 mm-ről 4,3 mm-re nőtt (29. ábra). Az ábrázolt diagrammokon jól látható, hogy a fermentáció elősegíti a baktériumtörzsekkel szembeni gátló peptidek vagy bakteriocinek termelődését, ezzel együtt a gátlási zónák növekedését [GOMEZ et al., 1997].



29. ábra: Mikrobiológiai aktivitás (gátlási zóna) [mm] vizsgálata *Listeria monocytogenes* mikrobatorzs esetében a hidrolizátum fermentációja során, alacsony és magas enzimkoncentrációnál (N1 (piros) – N3 (kék)).

Megfigyelhető továbbá hogy a gátlási zónák nemcsak az enzimkoncentrációk növelésével változnak, abban az esetben ha a fermentációt hozzáadott glükózzal végezzük (27. ábra – B) a gátlási zónák átmérője tovább nő, mivel a fermentációs közeghez hozzáadott glükóz elősegíti a tejsavbaktériumok növekedését ezzel pedig a fehérjék proteolízisét.

A tejfehérjesűrítmény (27. ábra - A) esetében nem látható szignifikáns különbség az adott enzimkoncentráción (N1 – N2 – N3) vizsgált törzsek között (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*), ugyanis N1 esetén, vagyis a gátlási zóna változását a növekvő enzimkoncentráció határozza meg. Hasonló következtetéseket vonhatunk le a fermentált minták esetében is (27. ábra – B – C) ahol a gátlási zóna alakulása és az enzimkoncentráció növelése között látható szignifikáns kapcsolat.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Kutatásaim során sikerült egy olyan egészségmegőrző tejipari terméket előállítanom, melynek a jövőben széleskörű alkalmazása válik lehetségessé. Nagy figyelmet fordítottam a termék allergéntartalmának a csökkentésére, ugyanis a tejfehérjék okozta allergia évről évre növekvő tendenciát mutat, így nem elhanyagolható az allergénmentes termék előállítás fogalma. A jövőben minden bizonnyal kiemelt figyelmet kapnak az allergénmentes termék előállítási technológiák, nemzeti egészségügyi szempontból fontos lenne ezen technológiák (membránszűrés, enzimes hidrolízis) piacának a fejlesztése. A termék előállításához egy új gyártási technológiát dolgoztam ki, optimalizáltam laboratóriumi körülmények között. Az új gyártási technológia részét képezte a membránszűrés, enzimes hidrolízis és fermentáció kombinált alkalmazása.

Az allergénmentes termék előállítása során alapanyagként UHT tejet használtam, melyet első lépésben membránszűréssel besűrítettem. Itt célom volt a fehérjetartalom növelése, mely jelen vizsgálataim során kétszeres volt. A membránszűrés során sikerült a permeátum fluxus értékét az alkalmazott membránszűrési paraméterek mellett maximalizálni. Azonban későbbi vizsgálatok során érdemes lenne a TMP (2 – 3 bar) és RFR (100 – 200 L/h) értékek intervallumát bővíteni, vizsgálva a további fluxus és fajlagos energiafogyasztás értékét. A választott 3 bar TMP és 100 L/h RFR érték mellett sikerült a kezdeti 31 g/L fehérjetartalmat a közel kétszeresére növelni, ami mellett minimális volt a fajlagos energiafogyasztás. A fehérjetartalom növelésével a későbbi hidrolízis során növelhető a keletkező termék antioxidáns tartalma, bioaktív peptidok mennyisége, melyek közvetlenül hatnak a fehérjesűrítvény ACE gátló és antibakteriális hatására.

Vizsgálataim során tripszin enzimet alkalmaztam melynek aktivitása hosszú időn át fenntartható továbbá a fehérjék hidrolízisének a mértéke is jelentős azon fehérjék esetében, melyek allergén aktivitással rendelkeznek. A későbbi vizsgálatok során érdemes lenne más enzimeket is kipróbálni, vizsgálni a hidrolízis határfokát, illetve a keletkező peptidok allergénhatását. Érdekes lenne annak a vizsgálata is, hogy az egyes enzimek milyen koncentráció alkalmazása mellett érnék el a termék allergénmentességét, illetve az alkalmazott enzim milyen organoleptikus tulajdonságokat kölcsönözne a terméknek. Számos kutatás szerint a hidrolízis során némely esetben olyan peptidok szabadulnak fel, melyek keserű ízt kölcsönözhetnek a hidrolizátumnak.

Megállapítást nyert vizsgálataim során hogy az enzimkoncentráció növelésével nő az antioxidáns tartalom, ACE gátlás és antibakteriális hatás, érdemes lenne ezeket is más enzimek alkalmazása mellett vizsgálni.

A növelt ACE enzim gátlás és némely patogén mikroba törzssel szembeni gátlás mindenképpen egy új hozzáadott értéket képvisel a fehérjesűrítvény esetében mely későbbi termékek előállítása során egy új funkcionális piaci szektort nyithatna meg. Mivel a magas vérnyomás civilizációs betegségnek számít napjainkban az ACE enzim gátlása jelentős figyelmet igényel a jövőben is. Ahogy azt már említettem, a Doktori munkám kiemelt részét képezte a tejfehérje allergia megszüntetése az előállított hidrolizátum esetében, ennek érdekében sikeresen csökkentettem/megszüntettem a fehérjék allergénitását melyet humán szérum jelenlétében is vizsgáltam immunblot mérések kivitelezésével. A közepes és nagy enzimkoncentráció sikeresen megszüntette a fehérjék immunreaktivitását a folyamat során melyet az immunblot vizsgálatok is igazoltak. Számos kutatás szerint a fehérjék molekulatömegének csökkentése megszünteti a fehérjék allergénitását, mely esetben az emberi szervezet már nem ismeri fel allergén összetevőként az adott komponenst. Ebben az esetben is fontosnak tartanám más enzimek kipróbálását, hogy azok milyen koncentrációnál szüntetik meg az allergénhatást, illetve más típusú tejek esetében hogyan változnának a vizsgált analitikai paraméterek.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK – TÉZISEK

1. **Statisztikai módszerrel modellt állítottam fel spirális statikus keverővel (lásd, 3.2 Membránszűrő berendezés c. alfejezet) végzett membránszűrés (NF, 5 nm, lásd 3.2.) kezdeti fluxusának becsléséhez/számításához:**

Statikus keverő alkalmazása mellett -

$$J = 24,426 + 9,402 \cdot \left(\frac{TMP - 2,5}{0,5}\right) + 0,0825 \cdot \left(\frac{Q - 150}{50}\right) + 0,0825 \cdot \left(\frac{TMP - 2,5}{0,5}\right) \cdot \left(\frac{Q - 150}{50}\right)$$

Statikus keverő nélkül -

$$J = 12,242 + 3,797 \cdot \left(\frac{TMP - 2,5}{0,5}\right) + 1,172 \cdot \left(\frac{Q - 150}{50}\right) + 1,102 \cdot \left(\frac{TMP - 2,5}{0,5}\right) \cdot \left(\frac{Q - 150}{50}\right)$$

2-3 bar TMP és 100-200 L/h RFR közötti, állandó hőmérséklet (25°C) tartományban modelleztem a térfogatáram, nyomás, visszatartás, fluxusra kifejtett hatását.

2. **Vizsgálataim során sikerült maximalizálnom a szűrletfluxust, ami mellett a membránszűrés fajlagos-energiaköltsége is a legalacsonyabb volt, az alkalmazott üzemi paraméterek mellett (TMP = 3 bar és RFR = 100 L/h).**

A laboratóriumi membránszűrés során spirális kialakítású statikus keverőt (lásd, 3.2 Membránszűrő berendezés c. alfejezet) alkalmaztam. Szűrési kísérleteimet állandó 25°C-on végeztem. Az alkalmazott membránszűrési paraméterek mellett a fluxus $34,22 \pm 1,08$ L/m² h, míg a fajlagos-energiafogyasztás 4,87 kWh/m³ volt.

(A membránszűrés során, mint nyersanyagot UHT technológiával előállított, homogenizált 1,5%-os tehéntejet használtam, melyet helyi szupermarketből vásároltam. Az alkalmazott tej fehérje-, laktóz- és zsírkoncentrációja átlagosan $31 \pm 0,1$ g/L, $47 \pm 0,84$ g/L és $1 \pm 0,12$ g/L

3. **Egyszerűsített kompromisszumos optimalizálással megállapítottam, hogy adott NF (5 nm) kerámia membránnal, cross-flow módban történő besűrítésnél az optimális üzemi paraméterek TMP = 3 bar és RFR = 100 L/h, ezen értékeknél biztosítható a legmagasabb fehérje koncentráció a retentátumban (59,21 g/L).**

Állandó nyomás (TMP = 3 bar) és változó térfogatáram (RFR = 100 - 200 L/h) mellett, a retentátum fehérjetartalmában (g/L) nem mérhető szignifikáns különbség, azonban magasabb RFR mellett a membránszűrés fajlagos-energiafogyasztása nagyobb volt (35 kWh/m³), így gazdaságossági szempontból vizsgálataim során az RFR = 100 L/h-t alkalmaztam (lásd, 4.1 Tejfehérjesűrítvény előállítása membránszűrés alkalmazásával c. alfejezet).

4. **Mérésekkel igazoltam, hogy az NF fehérjesűrítvény enzimatis hidrolízise után az antioxidáns tartalom az enzimkoncentráció kétszeresére történő emelésével szignifikánsan nő a vizsgált mintákban.**

Analitikai vizsgálataim alapjául a membránszűrés során kapott fehérjesűrítvény szolgált, melyet különféle enzim koncentrációk mellett hidrolizáltam. A tripszin enzimmel végzett hidrolízis során az egyes enzim koncentrációkhoz tartozó enzimaktivitás értékek a következőképpen alakultak: 0,008 g/L (0,014 AU/(s•µg), N2=0,016 g/L (0,028 AU/(s•µg), N3=0,032 g/L (0,056 AU/(s•µg).

A fehérjesűrítvény enzimatis hidrolízisét 40 °C-on 10 percig, az inaktiválást 70 °C-on 30 percig végeztem.

DPPH esetében a növekedés több mint háromszoros, míg a FRAP vizsgálat során 20 – 50 %-os növekedés volt mérhető, a membránszűrés során kapott tejfehérjesűrítvényéhez képest. Az N3-as enzimkoncentráció mellett a 0,032 g/L-es enzimatis kezelés során $62,04 \pm 2,74$ % volt a minta antioxidáns tartalma a DPPH módszer során. Ugyanez a növekvő tendencia volt megfigyelhető a FRAP módszer során is ahol az N3 enzimkoncentráció mellett $202,65 \pm 2,25$ mg/L volt. Változónkénti ANOVA mindkét faktor (kezelések, csoportok) esetén mindkét változóra (FRAP, DPPH) szignifikáns hatást mutatott FRAP: $F(2,24) = 44,39$; $p < 0,01$; DPPH: $F(2,24) = 60,31$; $p < 0,01$

A minták antioxidáns tartalma a fermentáció és a hozzáadott glükóz hatására csökkenő tendenciát mutat. DPPH módszer esetén $53,4 \pm 1,17$ %, ami 15 %-os, míg FRAP esetén $128,3 \pm 32,04$ mg/L, ami 15 %-os csökkenést jelent az antioxidáns tartalom értékében.

5. **Megállapítottam, hogy a felső nagymolekulatömegű sávokban a fehérjék mennyisége jelentősen lecsökkent, megváltozott a fehérjemintázat.**

Az általam alkalmazott legmagasabb enzimkoncentrációnál (0,032 g/L) hidrolizálódott az összes jelentős allergén reakciót kiváltó protein (α -laktalbumin, β -laktoglobulin, kazeinek: α - β - és κ , immunglobulinok, laktoferrinek, laktoperoxidázok).

Az allergén hatás tovább csökkenthető abban az esetben ha az enzimesen hidrolizált mintákat tejsavbaktériumokkal fermentáljuk (N1, N1Y és N1Y + G). Összeségében elmondható hogy 0,032 g/L tripszin koncentráció esetén már nem figyelhető meg immunreaktivitás a szérummal szemben. Az immunblot vizsgálatok során megállapítottam azt, hogy az enzimkoncentráció növelésével (0,008 – 0,032 g/L) csökkenthető az allergén epitópok aktivitása melynek közvetlen hatásaként csökken a fehérjék allergénhatása. Az alkalmazott enzimkoncentrációk során látható, hogy a 0,032 g/L tripszin koncentráció mellett a fehérjék allergénhatása megszűnik, az enzimes hidrolízis megszüntette az immunreaktív fehérjéket. A 0,008 és 0,016 g/L enzimkoncentráció mellett még főleg a kazeinfehérjék mutattak immunreaktivitást, illetve a felső molekulasávban néhány fehérje.

6. **Vizsgálataim során megállapítottam hogy, a fermentált mintákon elvégzett ACE gátlás analitikai vizsgálatai alapján az enzimkoncentráció növelésével (0,008 – 0,032 g/L) szignifikánsan nő (ANOVA - $F(2,18) = 213,08$; $F(2,18) = 63,05$, $p < 0,01$) az ACE gátlás mértéke az egyes mintákban (csökkenő IC_{50} érték).**

A csökkenés mértéke 20 – 40 % közötti, a fermentáció és az enzimes hidrolízis kombinálása elősegíti az inhibíció mértékét. Minél kisebb IC_{50} érték volt mérhető annál nagyobb volt a mintákban mért ACE gátlás mértéke.

A fermentáció, illetve a hozzáadott glükóz pozitívan hatott az ACE gátlásra, ugyanis ezen esetekben az IC_{50} érték tovább csökkent. 0,032 g/L enzimkoncentráció és fermentáció hatására az 5,8 mg/mL érték 3 (hozzáadott glükóz nélkül), illetve 2,5 mg/mL (hozzáadott glükózzal) értékre csökkent.

7. **Vizsgálataim során megállapítottam hogy a tejfehérjék tripszines hidrolízisének során felszabaduló peptidek a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* és *Listeria monocytogenes* szemben szignifikánsan antibakteriális hatást nyújtanak (ANOVA -*Bacillus cereus*: $F(3,16) = 47,52$, *Staphylococcus aureus*: $F(3,16) = 24,39$, *Listeria monocytogenes*: $F(3,16) = 104,99$, mindhárom esetben $p < 0,001$).**

Az enzimkoncentráció fokozatos növelésével (0,008 g/L-ről 0,032 g/L-re növelt koncentráció során) a gátlási zóna (2,5 mm-ről 4,3 mm-re – 72 %) nőtt *Bacillus cereus* esetén, míg ugyanezen koncentrációk esetén a *Staphylococcus aureus* mikroba törzs esetében is nőtt a gátlási zóna mértéke, mely (2,3 mm-ről 3,6 mm-re – 56 %) változott. A gátlási zónák átmérője a fermentáció hatására tovább nőtt (10 – 20 %), ami a hozzáadott glükóz hatására további kismértékű (5 – 10 %) javulást mutatott, ugyanis a hozzáadott glükóz elősegítette a starter kultúra növekedését/metabolizmusát. A fermentáció során *Bacillus cereus* esetén 4,76 mm (hozzáadott glükóz nélkül) és 5 mm (hozzáadott glükóz) volt a gátlási zóna értéke. Hasonló változás volt megfigyelhető *Staphylococcus aureus* esetén is, ahol a fermentáció során 3,97 mm (hozzáadott glükóz nélkül) és 4,17 mm (hozzáadott glükóz) volt a gátlási zóna értéke.

Fermentált minták esetén *Listeria monocytogenes* törzsre is elvégeztem a vizsgálatokat, ahol minimális mértékben (5%) szintén nőtt a gátlási zóna átmérője $N1 = 0,008$ g/L enzimes kezelés hatására 3,4 mm-re.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A 21. századi társadalomban az élelmiszeripar és a fogyasztói igények, illetve elvárások jelentős változásokon estek át, mely a felgyorsult és egyben stresszesebb életvitelnek a negatív következménye. A jelen kor emberét több stressz és negatív hatás éri élete során, melyek hosszútávú, állandó fennállása esetén káros metabolikus folyamatok indulhatnak meg az emberi szervezetben. Ezek a káros metabolikus folyamatok (elhízás, magas vérnyomás és szív érrendszeri megbetegedések) elősegíthetik a szabadgyökök képződését, melyek a rákos megbetegedések kockázatát növelik. Az utóbbi évtizedekben ezen káros hatások mérséklésére egyre nagyobb igény mutatkozik, így olyan hozzáadott értékkel rendelkező élelmiszerek fejlesztése válik szükségessé, melyek egy vagy több komponense bizonyítottan egészségmegőrző tulajdonsággal rendelkeznek. Ilyen egészségmegőrző komponensek a bioaktív peptidek, melyek a fehérjék enzimés hidrolízise, fermentációja révén képződnek, hatásuk lévén képesek a szabadgyökök által indukált megbetegedések kockázatának a csökkentésére. A tej és tejtermékekben található aminosavak fontos szerepet játszanak az érzékszervi és szerkezeti tulajdonságok kialakításában. A tejben lévő bioaktív peptidek ismert, megalapozott élettani funkciókkal rendelkeznek számos élelmiszeripari alkalmazás számára funkcionális tulajdonságú anyagok forrását biztosíthatják. A bioaktív peptidek előállítása során figyelembe kell venni az élelmiszer allergia jelenlétét. A leggyakoribb élelmiszerallergia típusok között a búza és glutént tartalmazó gabonafélék, a tehéntej és tejtermékek, valamint a kukorica termékek találhatóak. A tej allergia, a tejben lévő fehérjékre adott káros immunválasz, így ennek megszüntetése kiemelten fontos a tejfehérje alapú bioaktív peptidek előállítása során.

A laboratóriumi kísérleteket a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE), Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet Élelmiszeripari Műveletek és Folyamattervezés Tanszékén összeállított membránszűrő, bioreaktor/fermentor berendezéseken végeztem. Az így előállított fehérje hidrolizátumot számos analitikai vizsgálatnak vetettem alá.

Doktori munkám alapanyagaként UHT (Ultra High Temperature) technológiával előállított tejet használtam, melyet helyi üzletből szereztem be. Kísérleteim első lépéseként az UHT tejet membránszűrés (NF – 5 nm) használatával a kétszeresére sűrítettem be (VCR – Volume Concentration Ratio = 2). Céloom a fehérjetartalom növelése volt mely alapját képezte további vizsgálataimnak.

Az alkalmazott kísérletterv során sikerült olyan TMP – 3 bar (Transzmembrán nyomáskülönbség) és RFR – 100 L/h (Recirkulációs térfogatáram) értéket választanom mely esetben a fluxus értéke magas viszont a membránszűrés során mért fajlagos energiafogyasztás alacsony statikus keverő alkalmazása mellett.

Amellett, hogy a membránszűrés során sikerült a fluxus értékét magasán tartani, az alkalmazott membránszűrés paraméterek mellett a sűrítmény fehérjetartalma is közel a kétszeresére nőtt, ellentétben a többi RFR és TMP paraméter mellett. Az alkalmazott RFR és TMP értékek mellett a fehérjetartalom a sűrítményben elérte a $59,21 \pm 1,26$ g/L értéket. A fehérjesűrítmény előállítása után a minta hidrolízisét három különböző enzimkoncentráció (N1 = 0,008 g/L, N2 = 0,016 g/L, N3 = 0,032 g/L) mellett végeztem tripszin enzim alkalmazása mellett. Vizsgálataim során megállapítottam hogy az enzimkoncentráció növelésével szignifikánsan nő a hidrolizátum antioxidáns tartalma mind a FRAP és DPPH módszerek mellett. Azonban a fermentáció során a tejfehérjesűrítményben mért antioxidáns tartalom enyhe csökkenő tendenciát mutat az eredeti értékekhez képest mindkét módszer esetében.

A növelt enzimkoncentráció nem csak az antioxidáns tartalom értékére hat pozitívan, nő a hidrolizátumban az ACE gátlás mértéke, és annak antibakteriális aktivitása. Az angiotenzin-konvertáló enzim gátló peptidek jelentős szerepet töltenek be a magas vérnyomás kezelésében, ugyanis hatásukra csökken a kardiovaszkuláris nyomás mely az értágító hatásnak köszönhető. Az angiotenzin-konvertáló enzim gátló peptidek jelenléte, a növelt antioxidáns tartalom és az antibakteriális hatás együttesen jellemzik a bioaktív peptidek egészségre gyakorolt pozitív hatását, és a bennük lévő fejlesztési, kutatási potenciált.

Az enzim hidrolízis eredményeit vizsgálva megállapítható hogy az allergénaktivitással rendelkező fehérjék (kazeinek, α -laktalbuminok és a β -laktoglobulinok) 0,032 g/L tripszin koncentráció mellett elveszítik immunreaktivitásukat és már allergénmentesnek tekinthetők az adott hidrolizátumok.

Doktori munkám során sikerült egy olyan egészségmegőrző tejipari terméket előállítanom mely olyanok számára is alternatív fogyasztási lehetőséget kínál, akiknél tejfehérje allergia diagnosztizálható. Az előállított fehérjehidrolizátum alkalmas új, hozzáadott értékkel rendelkező/funkcionális termékek előállítására. Az alkalmazott technológia laboratóriumi körülmények közötti implementálása sikeres volt, így a jövőbeni kutatások elősegíthetik a folyamat félüzemi technológiában való létrejöttét.

8. SUMMARY

In the 21st century, the food industry, the customer's needs and expectations are significantly changed due to accelerated stressful lifestyle. Nowadays, people are highly touched by stress which have negative impacts on them. When it's a continuous long-term condition, it can initiate metabolic process in the human body. Harmful metabolic progresses such as obesity, hypertension and cardiovascular diseases could cause the formation of free radicals which increase the risk of cancer. In the last decades, the need for reducing these harmful effects is growing, this is why the development of value-added foods is necessary with one or more components which have health-preserving properties. These health-preserving components are the bioactive peptides which are formed by enzymatic hydrolysis and fermentation of proteins. Thanks to their effects, the risk of free radical induced diseases are reduceable. The amino acid which are findable in food and dairy products as well, have an important role in the development of sensory and structural properties. Bioactive peptides in milk have known with well-established physiological functions which can provide a source of functional substances for food industry. The presence of food allergenicity must always be considered in the production of bioactive peptides. The most common types of food allergies are the wheat and gluten-containing cereals, cow's milk and dairy products, and corn products. Milk allergy is an adverse immune response to proteins in milk, this is why the elimination of it is extremely important in production of milk protein-based bioactive peptides.

The laboratory experiments were performed at the Institute of Food Science and Technology Department of Food Process Engineering of the Hungarian University of Agriculture and Life Sciences (MATE) by membrane filtration and bioreactor/fermentor equipment. The produced protein hydrolysate was examined by many analytical tests. As a row material for my doctoral work, I used UHT (Ultra High Temperature) produced milk which was obtained from a local store. The first step of my experiment was doubling the protein content of UHT milk (VCR – Volume Concentration Ratio = 2) by using membrane filtration (NF – 5 nm). My goal was increasing the protein content which formed the basis of my further research.

During the applied experimental plan, I managed to choose the values of TMP – 3 bar (transmembrane pressure) and RFR – 100 L/h (recirculation flowrate) in which case the value of flux is extremely high, while during the membrane filtration measured specific energy consumption is low beside of using static turbulence promoter.

Beside of the fact that keeping the high value of the flux during the membrane filtration was successful and thanks to the applied membrane filtration parameters, the protein content of the concentrate almost doubled, in contrast to the other RFR and TMP parameters.

In addition, next to the used RFR and TMP values, the protein content in the concentrate reached the $59,21 \pm 1,26$ g/L. After the production of protein concentrate, the hydrolysis of the sample was performed at three different enzyme concentrations (N1=0.008 g/L, N2 = 0.016 g/L, N3 = 0.032 g/L) with applying trypsin enzyme. In my research, I found that the increasing enzyme concentration significantly increases the antioxidant content of the hydrolysate at the FRAP and DPPH methods as well.

However, the measured antioxidant content in the milk protein concentrate during fermentation shows a slight decreasing tendency compared to the original values at both methods. The increased enzyme concentration has a positive effect on the antioxidant capacity, but also increases the degree of angiotensin-converting enzyme inhibition in the hydrolysate. The angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides play an important role in the treatment of hypertension by reducing cardiovascular pressure.

Due to the tryptic digestion of liquid milk protein concentrate, antibacterial activity against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* was shown. Furthermore, when liquid milk protein concentrate was fermented with lactic acid bacteria, antimicrobial activity was additionally found against *Listeria monocytogenes*. Antibacterial activity against mentioned microbes was increased in liquid milk protein concentrate after fermentation treatment.

Furthermore, the enzymatic hydrolysis show that proteins with allergenic activity (caseins, α -lactalbumins and β -lactoglobulins) lose their immunoreactivity at a concentration of 0.032 g/L trypsin and are considered allergen-free hydrolysates.

During my doctoral work, I have succeeded in developing a protein hydrolysate which is suitable for the production of new value added/functional products. The implementation of the technology under laboratory conditions was successful, so future research may facilitate the development of the process in an industrial scale

MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

1. AGUERO, R. BRINGAS, E. ROMÁN, M. F. S. ORTIZ, I., IBAÑEZ, R. (2017): Membrane Processes for Whey Proteins Separation and Purification. A Review. *Current Organic Chemistry*. 21 (17). 1740-1752.p. doi:10.2174/1385272820666160927122523
2. AKHTARUZZAMAN, M. MOZUMDER, R. RAHMAN, T. JAMAL, R. RAHMAN, A. RAHMAN, T. (2012): Isolation and characterization protease enzyme from leguminous seeds. *Agricultural Science Research Journal*.. 2. (8). 434-440.p. ISSN-L: 2026-607
3. AKIYAMA, H. IMAI, T. EBISAWA, M. (2011): Japan Food Allergen Labeling Regulation—History and Evaluation. *Advances in Food and Nutrition Research*, 139–171.p. doi: 10.1016/b978-0-12-385989-1.00004-1
4. ANTAL, P. (2013): A tejfehérje-összetétel és az allergén jelleg változása sav, illetve enzim jelenlétében. MSc Diplomamunka. Budapesti Corvinus Egyetem.
5. ARFAOUI, L. (2020): Total polyphenol content and radical scavenging activity of functional yogurt enriched with dates. *Czech Journal of Food Sciences*. 38. 287–292.p. doi: 10.17221/28/2020-CJFS
6. ASHFAQ, M. Y. QIBLAWEY, H. (2018): Laundry wastewater treatment using ultrafiltration under different operating conditions. *AIP Conference Proceedings*. doi: 10.1063/1.5060682
7. BAIRD, T. T. (2013): Trypsin. Editor(s): Stanley Maloy, Kelly Hughes, *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*. Academic Press. 216-219.p. ISBN 9780080961569.
8. Barłowska, J. Sz wajkowska, M. Litwińczuk, Z. Król, J. (2011): Nutritional Value and Technological Suitability of Milk from Various Animal Species Used for Dairy Production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10. (6). 291–302.p. doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00163.x
9. BÉLAFINÉ, B. K. (2002): *Membrános műveletek*, Veszprém, Veszprémi Egyetemi Kiadó

10. 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. (1). 70-6.p. doi: 10.1006/abio.1996.0292
11. BESHKOVA, D. SIMOVA, E. FRENGOVA, G. SIMOV, Z. (1998): Production of flavour compounds by yogurt starter cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* volume. 20 180–186.p. doi: 10.1038/sj.jim.2900504
12. BHATTACHARJEE, C. SAXENA, V. K. DUTTA, S. (2020): Static turbulence promoters in cross-flow membrane filtration: a review. *Chemical Engineering Communications*, 207 (3) 413 - 433.p. doi: 10.1080/00986445.2019.1587610
13. BIRÓ, G. (2014): Tejtermelési higiénia - Tej összetétele és egyes tulajdonságai. Budapest, Agroinform Kiadó 287-299. p.
14. BRADFORD, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
15. CAIRA, S. PIZZANO, R. PICARIELLO, G. PINTO, G. CUOLLO, M. CHIANESE, L. ADDEO, F. (2012): Allergenicity of Milk Proteins. *Milk Protein*. (Ed Walter L. H.) 1-43.p. doi: 10.5772/52086
16. CHEEMA, M. MOHAN, M. S. CAMPAGNA, S. R. JURAT-FUENTES, J. L. HARTE, F.M. (2015): The association of low-molecular-weight hydrophobic compounds with native casein micelles in bovine milk. *Journal of Dairy Science*. 98 (8). 5155–5163.p. doi: 10.3168/jds.2015-9461
17. CHEISON, S. C. SCHMITT, M. LEEB, E. LETZEL, T. KULOZIK, U. (2010): Influence of temperature and degree of hydrolysis on the peptide composition of trypsin hydrolysates of β -lactoglobulin: Analysis by LC–ESI-TOF/MS. *Food Chemistry*. 121. (2). 457–467.p. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.12.065
18. CHIURAZZI, M. COZZOLINO, M. REINELT, T. NGUYEN, T. D. ELKE CHIE, S. NATALUCCI, G. MILETTA, M. C. (2021): Human Milk and Brain Development in Infants. *Reproductive Medicine*, 2. (2). 107–117.p. doi: 10.3390/reprodmed2020011
19. CLAEYS, W. L. VERRAES, C. CARDOEN, S. BLOCK, J. D. HUYGHEBAERT, A. RAES, K. DEWETTINCK, K. HERMAN, L. (2014): Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control* 42. 188–201.p. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.01.045

20. COELHO, A. I. BERRY, G. T. RUBIO-GOZALBO, M. E. (2015): Galactose metabolism and health. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 18. (4). 422–427.p. doi: 10.1097/mco.000000000000189
21. CUI, Q. SUN, Y. ZHOU, Z. CHENG, J. GUO, M. (2021): Effects of Enzymatic Hydrolysis on Physicochemical Properties and Solubility and Bitterness of Milk Protein Hydrolysates. *Foods*. 10. (10). 2462.p. doi: 10.3390/foods10102462
22. CSAPÓ, J. CSAPÓNÉ, K. ZS. (2002): *Tej és tejtermékek szerepe a táplálkozásban*. Budapest. Mezőgazda kiadó. 173-296 p. 464. p. ISBN 963 9358 68 1
23. CSÉFALVAY, E. MIKA, L. T. (2008): *Vegyipari Művelettan*, ELTE Kémiai Intézet, Budapest
24. DALGLEISH, D. G. (1990): Denaturation and aggregation of serum proteins and caseins in heated milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38 (11). 1995–1999.p. doi: 10.1021/jf00101a001
25. DEWIT, J. N. (1998): Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. *Journal of Dairy Science*. 81 (3). 597– 608.p.
26. DIXON, M. WEBB, E. C. (1964): *Enzymes*. Academic Press New York.
27. DOYON, M. LABRECQUE, J. (2008): Functional foods: a conceptual definition. In: *British Food Journal*, 110 (11) 1133 – 11496. p.
28. DUDEJA, P. GUPTA, R. K. (2017): Nutraceuticals. In: *Food Safety in the 21st Century*. Elsevier, 491–96. p. doi:10.1016/B978-0-12-801773-9.00040-6.
29. DUKE, M. VASILJEVIC, T. (2015): Whey Ultrafiltration. In: Drioli E., Giorno L. (eds) *Encyclopedia of Membranes*. 58-60.p. Springer, Berlin, Heidelberg. ISBN: 978-3-642-40872-4 https://doi.org/10.1007/978-3-642-40872-4_2053-1
30. ELFAGM, A. A. WHEELOCK, J. V. (1978): Interaction of Bovine α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin during Heating. *Journal of Dairy Science* 61. 28–32.p.
31. EL-FATTAH, A. M. A. SAKR, S. S. EL-DIEB, S. M. ELKASHEF, H. A. S. (2017): Bioactive peptides with ACE-I and antioxidant activity produced from milk proteolysis. *International Journal of Food Properties*. 20 (12). 3033-3042.p. doi: 10.1080/10942912.2016.1270963
32. ENDERS, C. K. (2003): Performing Multivariate Group Comparisons Following a Statistically Significant MANOVA. *Measurement and Evaluation in Counseling and Development*, 36 (1). 40–56.p. doi: 10.1080/07481756.2003.12069079
33. ERDEI, A. SÁRMAY, G. PRECHL, J. (2012): *Immunológia*. Citokinek Szerk: Glória, L. Medicina Könyvkiadó Zrt. 130.p. ISBN: 978-963-226-370-0

34. FAGYAS, M. ÚRI, K. SIKET, I. M. DARAGÓ, A. BOCZÁN, J. BÁNYAI, E. ÉDES, I. PAPP, Z. TÓTH, A. (2014): New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) I: endogenous angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition. *PloS one*. 9 (4). 1-11.p. doi: 10.1371/journal.pone.0087843
35. FANE, A. G. WANG, R. JIA, Y. (2010): Membrane Technology: Past, Present and Future. *Membrane and Desalination Technologies*. 13. 1–45.p. doi:10.1007/978-1-59745-278-6_1
36. FONYÓ, ZS. FÁBRY, GY. (1998): Vegyipari művelettani alapismeretek. Nemzeti Tankönyvkiadó Rt., Bp
37. GÁSPÁR, I. (2016): Membránműveletek anyagátadásának intenzifikálása az élelmiszeriparban és környezetvédelemben statikus keverő alkalmazásával. Ph.D. értekezés, Szent István Egyetem
38. GAUCHERON, F. (2011): Milk and Dairy Products: A Unique Micronutrient Combination. *Journal of the American College of Nutrition*, 30 (5). 400–409.p. doi:10.1080/07315724.2011.10719983
39. GHANEM, A. THIERRY, L. DOMINIQUE, D.V. HASSAN, P. (2013): Static mixers: Mechanisms, applications, and characterization methods – A review. *Chemical Engineering Research and Design*. doi: 10.1016/j.cherd.2013.07.013
40. GIMMELSHTEIN, M. SEMIAT, R. (2005): Investigation of flow next to membrane walls. *Journal of Membrane Science*. 264. (1-2). 137–150.p. doi: 10.1016/j.memsci.2005.04.033
41. GOMEZ, S. COSSON, C. DESCHAMPS, A. (1997): Evidence for a bacteriocin-like substance produced by a new strain of *Streptococcus* sp., inhibitory to Gram-positive food-borne pathogens. *Research in Microbiology*. 148 (9). 757–766.p. doi: 10.1016/s0923-2508(97)82451-5
42. GONZÁLEZ-BUITRAGO, J. M. FERREIRA, L. ISIDORO-GARCÍA, M. SANZ, C. LORENTE, F. DÁVILA, I. (2007): Proteomic approaches for identifying new allergens and diagnosing allergic diseases. *Clinica Chimica Acta*. 385. (1–2). 21–27.p. doi: 10.1016/j.cca.2007.07.010
43. GUANG, C. PHILLIPS, R. D. JIANG, B. MILANI, F. (2012): Three key proteases – angiotensin-I-converting enzyme (ACE), ACE2 and renin – within and beyond the renin-angiotensin system. *Archives of Cardiovascular Diseases*. 105. (6–7). 373–385.p. doi: 10.1016/j.acvd.2012.02.010

44. GUINÉ, R. P. F. FLORENÇA, S. G. BARROCA, M. J. ANJOS, O. (2020): The Link between the Consumer and the Innovations in Food Product Development. *Foods*. 9.(9). 1317.p. doi: 10.3390/foods9091317
45. GUNESER, O. KARAGUL YUCEER, Y. (2012): Effect of ultraviolet light on water- and fat-soluble vitamins in cow and goat milk. *Journal of Dairy Science*. 95. (11). 6230–6241.p. doi: 10.3168/jds.2011-5300
46. HAMD, M. M. THIRU, I. S. GZARA, L. BIN MAHFOUZ, A. (2018): Application of factorial design for modeling reverse osmosis process using thin film composite polyamide membrane: a theoretical analysis and experimental validation. *Desalination and water treatment*. 124. 37–52.p. doi: 10.5004/dwt.2018.22749
47. HENNING, D. R. BAER, R. J. HASSAN, A. N. DAVE, R. (2006): Major advances in concentrated and dry milk products, cheese and milk fat-based concepts. *Journal of Dairy Science*. 89. 1179–1188.p. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72187-7
48. HENRY, C. J. (2010): Functional Foods. In: *European Journal of Clinical Nutrition*, 64. (7) 657–59. p. doi:10.1038/ejcn.2010.101.
49. HIDAS, K. I. NÉMETH, C. VISY, A. TÓTH, A. FRIEDRICH, L. F. NYULAS-ZEKE, I. C. (2021): Comparison of different thawing methods effect on the calorimetric and rheological properties of frozen liquid egg yolk. *Progress in Agricultural Engineering Sciences*. 16 (S2). 37–44.p. doi: 10.1556/446.2020.20005
50. HOMONNAY, ZS., KONCZ, K. (2005): A tejsavóról másképpen. 1. rész: A tejsavó tápanyag összetétele. *Élelmezési Ipar*, 59 (6) 129-133. p.
51. HUFFMAN, L. M. HARPER, W. J. (1999): Maximizing the value of milk through separation technologies. *Journal of Dairy Science* 82 (10) 2238–2244.p. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75471-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75471-8)
52. HUSSEIN, K. FRIEDRICH, L. KISKO, G. AYARI, E. NEMETH, C. DALMADI, I. (2019): Use of allyl-isothiocyanate and carvacrol to preserve fresh chicken meat during chilling storage. *Czech Journal of Food Sciences*. 37. 417-424.p. doi: 10.17221/80/2019-CJFS
53. ISMAHAN, B. D. HANANE, K. OMAR, K. DJAMEL, S. (2014): Microwave irradiation of bovine milk reduces allergic response in mouse model of food allergy. *Frontiers in Immunology*. 10.
54. JÄKÄLÄ, P. VAPAATALO, H. (2010): Antihypertensive Peptides from Milk Proteins. *Pharmaceuticals*. 3.(1). 251–272.p. doi: 10.3390/ph3010251

55. JANG, H. L. SHIN, S. R. YOON, K. Y. (2017): Hydrolysis conditions for antioxidant peptides derived from enzymatic hydrolysates of sandfish (*Arctoscopus japonicus*). *Food Science and Biotechnology*, 26. (5). 1191–1197.p. doi: 10.1007/s10068-017-0178-z
56. JENNESS, R. (1988): Composition of Milk. In: Wong, N.P. Jenness, R. Keeney, M. Marth, E.H. *Fundamentals of Dairy Chemistry*. 1-38. p. doi:10.1007/978-1-4615-7050-9_1
57. JORDE, R. BŘNAA, K. H. (2000): Calcium from dairy products, vitamin D intake, and blood pressure: the Tromsø study. In: *American Society for Clinical Nutrition*. 71. 1530-1535. p.
58. KEMÉNY, S. DEÁK, A. (1990): Mérések tervezése és eredményeik értékelése - 2. kiadás. Műszaki könyvkiadó. Budapest. ISBN 963 10 9787 0
59. KILARA, A. VAGHELA, M.N. (2018): 4 - Whey proteins. Editor(s): Rickey Y. Yada, In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Proteins in Food Processing (Second Edition)*, 93-126.p. ISBN 9780081007228. <https://doi.org/10.116/B978-0-08-100722-8.00005-X>.
60. KIM, S. B. KI, K. S. KHAN, M. A. LEE, W. S. LEE, H. J. AHN, B. S. KIM, H. S. (2007): Peptic and tryptic hydrolysis of native and heated whey protein to reduce its antigenicity. *Journal of Dairy Science*. 90 (9). 4043-50.p.
61. KLEBER, N. HINRICHS, J. (2007): Antigenic response of β -lactoglobulin in thermally treated bovine skim milk and sweet whey. *Milchwissenschaft* 62. 121–124.p.
62. KLEBER, N. MAIER, S. HINRICHS, J. (2007): Antigenic response of bovine β -lactoglobulin influenced by ultra-high pressure treatment and temperature. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 8. 39–45.p.
63. KORHONEN, H., PIHLANTO, A. (2006): Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*. 16. (9). 945–960.p. doi: 10.1016/j.idairyj.2005.10.012
64. KOSTYRA, E. SIENKIEWICZ-SZŁAPKA, E. JARMOŁOWSKA, B. KRAWCZUK, S. KOSTYRA, H. (2004): Opioid peptides derived from milk proteins. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 54. (1s). 25-35.p. doi:
65. KRÓLCZYK, J. DAWIDZIUK, T. JANISZEWSKA-TURAK, E. AND SOŁOWIEJ, B. (2016): Use of Whey and Whey Preparations in the Food Industry – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 66. (3). 157-165.p. doi: 10.1515/pjfn-2015-0052

66. KRSTIĆ, D.M. TEKIĆ, M.N. CARIĆ, M.D. MILANOVIĆ, S. D. (2002): The effect of tubulence promoter on cross-flow microfiltration of skim milk, *Journal of Membrane Science*. 208. 303-314.p.
67. KUKOVICS, S. (2009): A tej szerepe a humán táplálkozásban. Melánia Kiadói Kft. Budapest. 531-541. p.
68. KUMAR, P. SHARMA, N. RANJAN, R. KUMAR, S. BHAT, Z. F. JEONG, D. K. (2013): Perspective of membrane technology in dairy industry: a review. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 26 (9). 1347–1358.p. doi: 10.5713/ajas.2013.13082
69. KUNJI, E. R. S. MIERAU, I. HAGTING, A. POOLMAN, B. KONINGS, W. N. (1996): The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(2–4), 187–221.p. doi: 10.1007/bf00395933
70. LEE, Y. R. HONG, Y. H. (2003): Electrophoretic Behaviors of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin Mixtures Caused by Heat Treatment. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 16 (7). 1041–1045.p. doi: 10.5713/ajas.2003.1041
71. LEIROS, H. K. BRANDSDAL, B. O. ANDERSEN, O. A. OS, V. LEIROS, I. HELLAND, R. OTLEWSKI, J. WILLASSEN, P. N. SMALAS, O. (2004): Trypsin specificity as elucidated by LIE calculations, X-ray structures, and association constant measurements. *Protein Science*. 13 (4). 1056–70.p. doi:10.1110/ps.03498604
72. LI, S. TANG, S. HE, Q. HU, J. ZHENG, J. (2019): Changes in Proteolysis in Fermented Milk Produced by *Streptococcus thermophilus* in Co-Culture with *Lactobacillus plantarum* or *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* During Refrigerated Storage. *Molecules*, 24 (20). 3699. doi: 10.3390/molecules24203699
73. LIANG, X. YANG, H. SUN, J. CHENG, J. LUO, X. WANG, Z. YANG, M. BING TAO, D. YUE, X. ZHENG, Y. (2020): Effects of enzymatic treatments on the hydrolysis and antigenicity reduction of natural cow milk. *Food Science & Nutrition*. 9. (2). 985–993.p. doi: 10.1002/fsn3.2066
74. LIFSCHITZ, C. SZAJEWSKA, H. (2015): Cow's milk allergy: Evidence-based diagnosis and management for the practitioner. *The European Journal of Pediatrics*. 174. (2) 141–150.p. doi: 10.1007/s00431-014-2422-3
75. LÓPEZ-FANDIÑO, R. OTTE, J. VAN CAMP, J. (2006): Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*. 16 (11). 1277–1293.p. doi: 10.1016/j.idairyj.2006.06.004

76. MAHASHI, K. MATANO, M. WANG, H. VO, L. A. YAMAMOTO, Y. HUANG, L. (2008): Bitter peptides activate hTAS2Rs, the human bitter receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 365. (4). 851–855.p. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.11.070
77. MATHUR, B. N. SHAHANI, K. M. (1979): Use of total whey constituents for human food. *Journal of Dairy Science*. 62. 99-105.p.
78. MCGREGOR, R. A. POPPITT, S. D. (2013): Milk protein for improved metabolic health: a review of the evidence. *Nutrition & Metabolism (London)* 10 (46) 2-13.p. doi: 10.1186/1743-7075-10-46
79. MEDEIROS, V. RAINHA, N. PAIVA, L. LIMA, E. BAPTISTA, J. (2013): Bovine Milk Formula Based on Partial Hydrolysis of Caseins by Bromelain Enzyme: Better Digestibility and Angiotensin-Converting Enzyme-Inhibitory Properties. *International Journal of Food Properties*. 17 (4). 806–817.p. doi: 10.1080/10942912.2012.675607
80. MEHTANI, P. SHARMA, C. BHATNAGAR, P. (2013): Proteases: The Industrial Biocatalyst. Project: UGC sponsored Minor Research Project entitled Isolation and generation of hyper producing strains of bacteria by using immobilization techniques IIS University of Science and Technology. 2. (1) 1-12.p.
81. MEISEL, H. FITZGERALD, R. J. (2000): Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *British Journal of Nutrition*, 84. (S1). 27–31.p. doi: 10.1017/s000711450000221x
82. MEISEL, H. FITZGERALD, R.J. (2003): Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*. 9. (16). 1289-95.p. doi: 10.2174/1381612033454847.
83. MÉTHOT-HAINS, S. BENOIT, S. BOUCHARD, C. DOYEN, A. BAZINET, L. POULIOT, Y. (2016): Effect of transmembrane pressure control on energy efficiency during skim milk concentration by ultrafiltration at 10 and 50°C. *Journal of Dairy Science*, 99. (11). 8655–8664.p. doi: 10.3168/jds.2016-11504
84. MINERVINI, F. ALGARON, F. RIZZELLO, C. G. FOX, P. F. MONNET, V. GOBBETTI, M. (2003): Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied and environmental microbiology*, 69 (9) 5297–5305.p. doi: 10.1128/aem.69.9.5297-5305.2003

85. MOHANTY, D.P. MOHAPATRA, S. MISRA, S. SAHU, P.S. (2016): Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 23. (5). 577-583.p. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.06.005.
86. MONACI, L. TREGOAT, V. HENGEL, A. J. (2006): Anklam E. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *European Food Research&Technology*. 223. (2). 149-179.p. doi: 10.1007/s00217-005-0178-8
87. MORR, C. V. HA, E. Y. W. (1993): Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 33(6). 431-476.p. doi: 10.1080/10408399309527643
88. MOURAD, G. BETTACHE, G. SAMIR, M. (2014): Composition and nutritional value of raw milk. *Biological Sciences and Pharmaceutical Research*. 2 115-122.p. doi:10.15739/ibspr.005.
89. NAIK, L. (2012): Technofunctional Properties of Whey Protein Hydrolysates Prepared Using Trypsin. *Indian Journal of Dairy Science*. 65. (2). 141-145.p.
90. NATALE, M. BISSON, C. MONTI, G. PELTRAN, A. PERONO GAROFFO, L. VALENTINI, S. FABRIS, C. BERTINO, E. COSCIA, A. CONTI, A. (2004): Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry. *Molecular Nutrition & Food Research*. 48. (5). 363–369.p. doi: 10.1002/mnfr.200400011
91. NATH, A. SZÉCSI, G. CSEHI, B. MEDNYÁNSZKY, Z. KISKÓ, G. BÁNYAI, É. DERNOVICS, M. KORIS, A. (2017): Production of Hypoallergenic Antibacterial Peptides from Defatted Soybean Meal by a Membrane Associated Bioreactor: A Bioprocess Engineering Study with Comprehensive Product Characterization. *Food Technology and Biotechnology*. 55. (3) 308–324.p. doi: 10.17113/ft b.55.03.17.5040
92. NEMES, A. STEFANOVITS-BÁNYAI, É. REMENYIK, J. (2015): Új mérési eljárás fejlesztése a növényi antioxidáns státusz meghatározására. *Agrártudományi közlemények*. 63. 105-112.p.
93. NÉMETH, J. (1995): Statikus keverés I. *Magyar Kémikusok Lapja*, 50. évf. 11. szám
94. NONGONIERMA, A. B. FITZGERALD, R. J. (2017): Enhancing bioactive peptide release and identification using targeted enzymatic hydrolysis of milk proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410. (15). 3407–3423.p. doi: 10.1007/s00216-017-0793-9

95. O'REGAN, J., ENNIS, M., & MULVIHILL, D. (2009): Milk proteins. *Handbook of Hydrocolloids. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* 298–358.p. doi: 10.1533/9781845695873.298
96. PAHUD, J. J. MONTI, J. C. JOST, R. (1985): Allergenicity of whey protein: Its modification by tryptic in vitro hydrolysis of the protein. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. Nutr. 4. 408–413.p.
97. PARK, Y. W. NAM, M. S. (2015): Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 35 (6). 831–840.p. doi : 10.5851/kosfa.2015.35.6.831
98. PATRZYKAT, A. DOUGLAS, S. (2005): Antimicrobial Peptides: Cooperative Approaches to Protection. *Protein & Peptide Letters*. 12 (1). 19–25.p. doi: 10.2174/0929866053406057
99. PAULOVÁ, L. BRÁNYIK, T. PATÁKOVÁ, P. (2013): Advanced Fermentation Processes. In book: *Engineering Aspects of Food Biotechnology Chapter: Advanced Fermentation Processes* Publisher: Taylor & Francis Group Editors: Teixeira J. and Vicente A.A. 89-105.p. doi: 10.1201/b15426-6.
100. PENFIELD, M. P. CAMPBELL, A. M. (1990): Chapter 8 —Milk and Milk Products. In *Food Science and Technology*. 3rd ed. Penfield, M.P. Campbell, A.M. Eds. Academic Press: San Diego. CA. USA. 162–183.p. ISBN 978-0-12-157920-3.
101. PESCUA, M. HÉBERT, E. MOZZI, F. VALDEZ, G. F. D. (2007): Hydrolysis of whey proteins by *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Journal of Applied Microbiology*. 103. (5). 1738–1746.p. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03404.x
102. PINTADO, M. E. PINTADO, A. E. MALCATA, F. X. (1999): Controlled whey protein hydrolysis using two alternative proteases. *Journal of Food Engineering*. 42. (1). 1-13.p. ISSN 0260-8774. doi: 10.1016/S0260-8774(99)00094-1.
103. POLGÁR, L. (2005): The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62 (19–20): 2161–72.p. doi:10.1007/s00018-005-5160-x
104. RAFIQ, S. HUMA, N. PASHA, I. SAMEEN, A. MUKHTAR, O. KHAN, M. I. (2015): Chemical Composition, Nitrogen Fractions and Amino Acids Profile of Milk from Different Animal Species. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29. (7). 1022–1028.p. doi: 10.5713/ajas.15.0452

105. RAMCHANDRAN, L. SHAH, N. P. (2009): Effect of exopolysaccharides on the proteolytic and angiotensin-I converting enzyme-inhibitory activities and textural and rheological properties of low-fat yogurt during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*. 92. (3). 895-906.p. doi: 10.3168/jds.2008-1796.
106. RAMOS, Ó. L. SILVA, S. I. SOARES, J. C. FERNANDES, J. C. POÇAS, M. F. PINTADO, M. E. MALCATA, F. X. (2012): Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. *Food Research International*. 45. (1). 351–361.p. doi:10.1016/j.foodres.2011.09.016
107. RASHID, U. KUMARI, N. SIGNAL, N. TAYLOR, D. VANDAL, A. C. (2020): On Nonlinear Regression for Trends in Split-Belt Treadmill Training. *Brain Sciences*. 10. (10). 737.p. doi: 10.3390/brainsci10100737
108. RAUTENBACH, R. (1997): Membranprozesse. *Membranverfahren*, 1–33.p. doi: 10.1007/978-3-662-08655-1_1
109. RAVESCHOT, C. CUDENNEC, B. COUTTE, F. FLAHAUT, C. FREMONT, M. DRIDER, D. DHULSTER, P. (2018): Production of Bioactive Peptides by *Lactobacillus* Species: From Gene to Application. *Frontiers in Microbiology*. 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.02354
110. RELKIN, P. MULVIHILL, D.M. (1996): Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 36 (6). 565–601.p. doi: 10.1080/10408399609527740
111. RINCÓN-LEÓN, F. (2003): Functional Foods. in: Caballero, B. (Ed.). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. 2827–2832.p. doi: 10.1016/B0-12-227055-X/01328-6
112. ROMÁN, A. (2010): Tejsavó nano- és diaszűrésének vizsgálata. Ph.D. értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem
113. SALEH, T. A. GUPTA, V. K. (2016): An Overview of Membrane Science and Technology. *Nanomaterial and Polymer Membranes*, 1–23.p. doi:10.1016/b978-0-12-804703-3.00001-2
114. SAWYER, W. H. (1969): Complex Between β -Lactoglobulin and k-Casein. A Review. *Journal of Dairy Science*. 52. 1347–1355.p.
115. SCHRÖDER, M. (1982): Effect of oxygen on the keeping quality of milk: I. Oxidized flavour development and oxygen uptake in milk in relation to oxygen availability. *Journal of Dairy Research*. 49 (3). 407-424.p. doi:10.1017/S002202990002255X

116. SEIFU, E. BUYS, E. M. DONKIN, E. F. (2005): Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 16. 137–154.p. doi: 10.1016/j.tifs.2004.11.002
117. SHAKERIAN, M. RAZAVI, S. H. ZIAI, S. A. KHODAIYAN, F. YARMAND, M. S. MOAYEDI, A. (2013): Proteolytic and ACE-inhibitory activities of probiotic yogurt containing non-viable bacteria as affected by different levels of fat, inulin and starter culture. *Journal of Food Science and Technology*. 52. (4). 2428–2433.p. doi: 10.1007/s13197-013-1202-9
118. SHARMA, S. KUMAR, P. BETZEL, C. SINGH, T. P. (2001): Structure and function of proteins involved in milk allergies. *Journal of Chromatography B*. 756. (1-2). 183-187.p. doi: 10.1016/s0378-4347(01)00107-4
119. SHU, G. HUANG, J. BAO, C. MENG, J. CHEN, H. CAO, J. (2018): Effect of Different Proteases on the Degree of Hydrolysis and Angiotensin I-Converting Enzyme-Inhibitory Activity in Goat and Cow Milk. *Biomolecules*, 8.(4). 101. doi: 10.3390/biom8040101
120. SICHERER, S. H. SAMPSON, H. A. (2010): Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125. (2). 116-125.p.
121. SLAVIN, J., & CARLSON, J. (2014). Carbohydrates. *Advances in Nutrition*, 5.(6). 760–761.p. doi: 10.3945/an.114.006163
122. STENDER, S. DYERBERG, J. HOLMER, G. OVESEN, L. SANDSTRÖM, B. (1995): The influence of trans fatty acids on health: A report from the Danish Nutrition Council. *Clinical science (London, England : 1979)*. 88 (4) 375-92.p. doi: 10.1042/cs0880375.
123. STRATHMANN, H. GIORNO, L. DRIOLI, E. (2006): An Introduction to Membrane Science and Technology. CNR-Servizio Pubblicazioni.
124. SURÁNYI, B. (2015): A tej és tejtermékek múltja és jelene. Debrecen: Debreceni Egyetemi Kiadó. 107. p. ISBN: 978-963-318-504-9
125. SZAKÁLY, S. (SZERK.) (2001): Tejgazdaságtan. Budapest: Dinasztia Kiadó. 478 p.
126. UCHINO, T., SAKURAI, Y., NISHIGAI, M., TAKAHASHI, T., ARAKAWA, H., IKAI, A., & TAKAHASHI, K. (1993): Isolation and characterization of a novel serine proteinase complexed with alpha 2-macroglobulin from porcine gastric mucosa. *Journal of Biological Chemistry*. 268. (1). 527–533.p. doi: 10.1016/s0021-9258(18)54183-1
127. TAVANO, O.L. BERENQUER-MURCIA, A. SECUNDO, F. FERNANDEZ-LAFUENTE, R. (2018): Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 17. (2). 412-436.p. doi: 10.1111/1541-4337.12326

128. TAYLOR, S. L. (1992): Chemistry and detection of food allergens. *Food Technology*. 46. 146-152.p.
129. TEKIC, M. N. KURJACKI, J. VATAI, GY. (1996): Modelling of batch ultrafiltration. *The Chemical Engineering Journal*. 61. 157-159.p.
130. THAKUR, R.K., VIAL, C., NIGAM, K.D.P., NAUMAN, E.B., DJELVEH, G. (2003). Static mixers in the process industries – a review. *Transf. IChemE* 81, 787–826.
131. TONOLO, F. MORETTO, L. FERRO, S. FOLDA, A. SCALCON, V. SANDRE, M. FIORESE, F. MARIN, O. BINDOLI, A. RIGOBELLO, M. P. (2019): Insight into antioxidant properties of milk-derived bioactive peptides in vitro and in a cellular model. *Journal of Peptide Science*. 25. (5). doi: 10.1002/psc.3162.
132. TZVETKOVA, I. DALGALARRONDO, M. DANOVA, S. ILIEV, I. IVANOVA, I. CHOBERT, J. M. HAERTLÉ, T. (2007): Hydrolysis of major dairy proteins by lactic acid bacteria from bulgarian yogurts. *Journal of Food Biochemistry*. 31. (5). 680–702.p. doi: 10.1111/j.1745-4514.2007.00137.x
133. UENO, H. M. KATO, T. OHNISHI, H. KAWAMOTO, N. KATO, Z. KANEKO, H. KONDO, N. NAKANO, T. (2018): Hypoallergenic casein hydrolysate for peptide-based oral immunotherapy in cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 142. (1). 330-333.p. doi: 10.1016/j.jaci.2018.04.005.
134. UMEYAMA, H. S. HIRONO, S. NAKAGAWA. (1984): Charge State of His-57-Asp-102 Couple in a Transition State Analogue-Trypsin Complex: A Molecular Orbital Study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81. (20). 6266–70.p.
135. VAHČIĆ, N. HRUŠKAR, M. MARKOVIĆ, K. BANOVIĆ, M. COLIĆ BARIĆ, I. (2010): Essential minerals in milk and their daily intake through milk consumption. *Mljekarstvo* 60. 77-85.p.
136. VAN DER BRUGGEN, B. (2018): Microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration, reverse osmosis, and forward osmosis. *Fundamental Modelling of Membrane Systems*, 25–70.p. ISBN: 978-0-12-813483-2. doi:10.1016/b978-0-12-813483-2.00002-2
137. VARGA, Á., GÁSPÁR, I., JUHÁSZ, R., LADÁNYI, M., HEGYES-VECSERI, B., KÓKAI, Z., MÁRKI, E. (2019): Beer microfiltration with static turbulence promoter: Sum of ranking differences comparison. *Journal of Food Process Engineering* 42. (1). Article number: e12941. doi: 10.1111/jfpe.12941
138. VERMEIRSSSEN, V. VAN CAMP, J. DECROOS, K. VAN WIJMELBEKE, L. VERSTRAETE, W. (2003): The Impact of Fermentation and In Vitro Digestion on the

- Formation of Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Activity from Pea and Whey Protein. *Journal of Dairy Science*. 86. (2). 429–438.p. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(03)73621-2
139. WANG, C. TU, M. WU, D. CHEN, H. CHEN, C. WANG, Z. JIANG, L. (2018): Identification of an ACE-Inhibitory Peptide from Walnut Protein and Its Evaluation of the Inhibitory Mechanism. *International journal of molecular sciences*, 19 (4). 1156.p. doi: 10.3390/ijms19041156
 140. WANG, R. HAN, Z. JI, R. XIAO, Y. SI, R. GUO, F. HE, J. HAI, L. MING, L. YI, L. (2020): Antibacterial Activity of Trypsin-Hydrolyzed Camel and Cow Whey and Their Fractions. *Animals*. 10 (2). 337.p. doi: 10.3390/ani10020337
 141. WIDYASTUTI, Y. ROHMATUSSOLIHAT, R. FEBRISANTOSA, A. (2014): The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. *Food and Nutrition Sciences*. 05. 435-442.p. doi: 10.4236/fns.2014.54051.
 142. WRÓBLEWSKA, B. KALISZEWSKA, A. (2012): Cow's milk proteins immunoreactivity and allergenicity in processed food. *Czech Journal of Food Sciences*. 30 (3). 211–219.p. doi: 10.17221/525/2010-cjfs
 143. YERLIKAYA, O. (2014): Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks. *Food Science and Technology (Campinas)*. 34. (2). 221–229.p. doi: 10.1590/fst.2014.0050
 144. YILMAZ-ERSAN, L. OZCAN, T. AKPINAR-BAYIZIT, A. SAHIN, S. (2018): Comparison of antioxidant capacity of cow and ewe milk kefir. *Journal of Dairy Science*. 101.(5). 3788–3798.p. doi: 10.3168/jds.2017-13871
 145. YU, D. WANG, C. SONG, Y. ZHU, J. ZHANG, X. (2019): Discovery of Novel Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Peptides from *Todarodes pacificus* and Their Inhibitory Mechanism: In Silico and In Vitro Studies. *International Journal of Molecular Sciences*. 20. (17). 4159.p. doi: 10.3390/ijms20174159
 146. ZUCHT, H. D. RAIDA, M. ADERMANN, K. MÄGERT, H. J. FORSSMANN, W. G. (1995): Casocidin-I: a casein- α 2-derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Letters*, 372 (2–3). 185–188.p. doi: 10.1016/0014-5793(95)00974-e

M2. Géplista – Berendezések

M2 1. Laboratóriumi centrifuga - Z206A; Hermle Labortechnik ;Wehingen, Németország

M2 2. Bioreaktor – Solida Biotech; München, Németország

M2 3. Inkubátor (Fermentáció) - HACH, Düsseldorf, Németország

M2 4. Bio-Rad (Gélelektroforézis) – Bio-Rad Mini Protean 3 Cell; Bio-Rad Hungary Ltd

BioRad power PAC1000 feszültségadó készülék

BIO-RAD Gel Doc 2000 leolvasó

M2 5. Spektrofotométer (UV – VIS) - EvolutionTM 300; Thermo ScientificTM; Waltham MA, USA

M2 6. Fluoreszcens lemezolvasó - BMG Novostar, BMG Labtech; Németország

M2 7. Elektroforetikus blottoló - BIO-RAD Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell

M2 8. Optikai denzitométer - DEN 1-B McFarland Densitometer, Bio-Science, Magyarország

M3. Post Hoc teszt - Táblázatok

M3 1. Táblázat: Fluxus és energiafogyasztás adatok statisztikai kiértékelése

		Statistic	Std. Error
Residual for ln_F	Mean	0,0000	0,00934
	95% Confidence Interval for Mean		
	Lower Bound	-0,0185	
	Upper Bound	0,0185	
	5% Trimmed Mean	0,0077	
	Median	0,0107	
	Variance	0,013	
	Std. Deviation	0,11441	
	Minimum	-0,50	
	Maximum	0,21	
	Range	0,71	
	Interquartile Range	0,12	
	Skewness	-1,369	0,198
	Kurtosis	3,969	0,394
Residual for rec_E	Mean	0,0000	0,00105
	95% Confidence Interval for Mean		
	Lower Bound	-0,0021	
	Upper Bound	0,0021	
	5% Trimmed Mean	0,0005	
	Median	0,0003	
	Variance	0,000	
	Std. Deviation	0,01282	
	Minimum	-0,05	
	Maximum	0,04	
	Range	0,09	
	Interquartile Range	0,01	
	Skewness	-0,933	0,198
	Kurtosis	3,749	0,394

M3 2-3. Táblázat: Fehérjetartalom adatok statisztikai kiértékelése (Levene, Shapiro Wilk)

Levene's Test of Equality of Error Variances^{a,b}

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Prot	Based on Mean	2,342	3	8	0,149
	Based on Median	0,754	3	8	0,550
	Based on Median and with adjusted df	0,754	3	4,690	0,568
	Based on trimmed mean	2,197	3	8	0,166

**Tests of
Normality**

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Residual for Prot	0,173	12	.200*	0,950	12	0,630

M3 4. Táblázat: Fehérjetartalom adatok statisztikai kiértékelése (Post-hoc teszt - Tukey)

Descriptive Statistics

Dependent Variable:		Prot					
TFA		Mean	Std. Deviation	N	TFA	nyom	
100 L/h	2 bar	42,50	2,59	3	A	a	Aa
	3 bar	59,21	1,67	3	A	b	Ab
	Total	50,86	9,36	6			
200 L/h	2	45,20	0,30	3	A	a	Aa
	3	62,83	1,85	3	A	b	Ab
	Total	54,02	9,73	6			

M3 5-6. Táblázat: Antioxidáns adatok statisztikai kiértékelése (Levene, Shapiro Wilk)

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
FRAP	Based on Mean	1,746	11	24	0,123
	Based on Median	0,493	11	24	0,889
	Based on Median and with adjusted df	0,493	11	13,416	0,877
	Based on trimmed mean	1,624	11	24	0,155

DPPH	Based on Mean	1,343	11	24	0,262
	Based on Median	0,151	11	24	0,999
	Based on Median and with adjusted df	0,151	11	16,711	0,999
	Based on trimmed mean	1,158	11	24	0,364

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Residual for FRAP	0,066	36	.200*	0,983	36	0,838
Residual for DPPH	0,159	36	0,022	0,957	36	0,172

M3 7. Táblázat: Antioxidáns adatok statisztikai kiértékelése (F-próba)

Tests of Between-Subjects Effects

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	FRAP	46961,286 ^a	11	4269,208	10,289	0,000
	DPPH	8404,011 ^b	11	764,001	147,909	0,000
Intercept	FRAP	#####	1	#####	1601,726	0,000
	DPPH	54007,570	1	54007,570	10455,722	0,000
gr	FRAP	36837,552	2	18418,776	44,391	0,000
	DPPH	620,160	2	310,080	60,031	0,000
tr	FRAP	9504,524	3	3168,175	7,636	0,001
	DPPH	7751,377	3	2583,792	500,215	0,000
gr * tr	FRAP	619,210	6	103,202	0,249	0,955
	DPPH	32,474	6	5,412	1,048	0,420
Error	FRAP	9958,134	24	414,922		
	DPPH	123,969	24	5,165		
Total	FRAP	#####	36			
	DPPH	62535,549	36			
Corrected Total	FRAP	56919,420	35			
	DPPH	8527,979	35			

M3 8-9. Táblázat: Antioxidáns adatok statisztikai kiértékelése (Post-hoc teszt - Tukey)

		FRAP					
gr		Mean	Std. Deviation	gr	treatm		
M	N1	170,42	13,09	B	a	Ba	
M	N2	177,39	10,67	B	ab	Bab	
M	N3	202,65	2,25	B	b	Bb	
M	NF	167,35	9,79	B	a	Ba	
Y	N1	122,16	20,25	A	a	Aa	
Y	N2	131,75	27,42	AB	a	ABa	
Y	N3	147,34	26,68	AB	a	ABa	
Y	NF	97,05	20,41	A	a	Aa	
YG	N1	99,08	18,61	A	a	Aa	
YG	N2	108,22	28,76	A	a	Aa	
YG	N3	128,31	32,04	A	a	Aa	
YG	NF	78,72	10,12	A	a	Aa	

		DPPH					
gr		Mean	Std. Deviation	gr	treatm		
M	N1	42,54	2,23	B	b	Bb	Ba
M	N2	51,83	2,39	B	c	Bc	Bb
M	N3	62,04	2,75	B	d	Bd	Bc
M	NF	20,94	1,49	B	a	Ba	Bd
Y	N1	34,69	1,94	A	b	Ab	Aa
Y	N2	43,06	2,89	A	c	Ac	Ab
Y	N3	56,02	3,20	AB	d	ABd	Ac
Y	NF	15,97	1,38	A	a	Aa	ABd
YG	N1	30,10	2,52	A	b	Ab	Aa
YG	N2	40,18	2,84	A	c	Ac	Ab
YG	N3	53,40	1,18	A	d	Ad	Ac
YG	NF	14,01	1,20	A	a	Aa	Ad

M3 10-11. Táblázat: Az ACE gátlás adatok statisztikai kiértékelése (Levene, Shapiro Wilk)

Levene's Test of Equality of Error Variances^{a,b}

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Angiotensin	Based on Mean	0,928	8	18	0,517
	Based on Median	0,928	8	18	0,517
	Based on Median and with adjusted df	0,928	8	9,998	0,533
	Based on trimmed mean	0,928	8	18	0,517

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Residual for Angiotensin	0,167	27	0,052	0,942	27	0,134

M3 12. Táblázat: ACE gátlás adatok statisztikai kiértékelése (F-próba)

Dependent Variable: Angiotensin

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	62.267 ^a	8	7,783	69,674	0,000
Intercept	590,803	1	590,803	5288,671	0,000
gr	47,607	2	23,803	213,08	0,000
conc	14,087	2	7,043	63,05	0,000
gr * conc	0,573	4	0,143	1,28	0,313
Error	2,011	18	0,112		
Total	655,081	27			
Corrected Total	64,277	26			

M3 13. Táblázat: ACE gátlás adatok statisztikai kiértékelése (Post-hoc teszt - Tukey)

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Angiotensin

gr	conc	Mean	Std. Deviation	N	gr		conc	
					gr	conc	gr	conc
milk	0,01	7,10	0,15	3	B	c	Bc	
	0,02	6,70	0,10	3	B	b	Bb	
	0,03	5,80	0,20	3	B	a	Ba	
Ny	0,01	5,00	0,50	3	A	c	Ac	
	0,02	4,00	0,23	3	A	b	Ab	
	0,03	3,00	0,20	3	A	a	Aa	
NyG	0,01	4,50	0,50	3	A	b	Ab	
	0,02	3,50	0,50	3	A	ab	Aab	
	0,03	2,50	0,30	3	A	a	Aa	

M3 14-15.táblázat: Mikrobiológiai gátlás adatok statisztikai kiértékelése (Levene, Shapiro Wilk - Bacillus cereus, Staphylococcus aureus)

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Bacillus cereus	Based on Mean	0,978	3	8	0,450
	Based on Median	0,190	3	8	0,900
	Based on Median and with adjusted df	0,190	3	5,158	0,899
	Based on trimmed mean	0,876	3	8	0,493
Staphylococcus aureus	Based on Mean	0,267	3	8	0,848
	Based on Median	0,333	3	8	0,802
	Based on Median and with adjusted df	0,333	3	8,000	0,802
	Based on trimmed mean	0,275	3	8	0,842

Tests of Normality

	Kolmogorov- Smirnov ^a Statistic	df	Sig.	Shapiro- Wilk Statistic	df	Sig.
Residual for Bacillus cereus	0,174	12	.200 [*]	0,940	12	0,499
Residual for Staphylococcus aureus	0,101	12	.200 [*]	0,941	12	0,511

M3 16-17: Mikrobiológiai gátlás adatok statisztikai kiértékelése (Levene, Shapiro Wilk - Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes)

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Bacillus cereus	Based on Mean	0,751	7	16	0,634
	Based on Median	0,152	7	16	0,991
	Based on Median and with adjusted df	0,152	7	10,764	0,990
	Based on trimmed mean	0,683	7	16	0,685
Staphylococcus aureus	Based on Mean	0,383	7	16	0,899

	Based on Median	0,094	7	16	0,998
	Based on Median and with adjusted df	0,094	7	13,035	0,998
	Based on trimmed mean	0,349	7	16	0,918
Listeria monocytogenes	Based on Mean	1,722	7	16	0,174
	Based on Median	0,100	7	16	0,998
	Based on Median and with adjusted df	0,100	7	10,121	0,997
	Based on trimmed mean	1,410	7	16	0,268

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a Statistic	df	Sig.	Shapiro-Wilk Statistic	df	Sig.
Residual for Bacilluscereus1_A	0,182	24	0,038	0,937	24	0,141
Residual for Staphylococcus aureus1_A	0,174	24	0,058	0,938	24	0,148
Residual for Listeriamonocytogenes	0,180	24	0,044	0,931	24	0,103

M3 18. táblázat: Mikrobiológiai gátlás adatok statisztikai kiértékelése - Bacillus cereus, Staphylococcus aureus (F-próba)

Tests of Between-Subjects Effects

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Bacillus cereus	12,167 ^a	3	4,056	21,630	0,000
	Staphylococcus aureus	7,729 ^b	3	2,576	15,458	0,001
Intercept	Bacillus cereus	176,333	1	176,333	940,444	0,000
	Staphylococcus aureus	136,688	1	136,688	820,125	0,000
tr	Bacillus cereus	12,167	3	4,056	21,63	0,000
	Staphylococcus aureus	7,729	3	2,576	15,46	0,001
Error	Bacillus cereus	1,500	8	0,188		
	Staphylococcus aureus	1,333	8	0,167		
Total	Bacillus cereus	190,000	12			
	Staphylococcus aureus	145,750	12			
Corrected Total	Bacillus cereus	13,667	11			
	Staphylococcus aureus	9,063	11			

M3 19. táblázat: Mikrobiológiai gátlás adatok statisztikai kiértékelése - Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes (F-próba)

Tests of Between-Subjects Effects

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Bacillus cereus	23,630 ^a	7	3,376	20,720	0,000
	Staphylococcus aureus	11,940 ^b	7	1,706	10,633	0,000
	Listeria monocytogenes	17,293 ^c	7	2,470	45,608	0,000
Intercept	Bacillus cereus	456,754	1	456,754	2803,604	0,000
	Staphylococcus aureus	367,384	1	367,384	2290,184	0,000
	Listeria monocytogenes	419,170	1	419,170	7738,531	0,000
tr1_A	Bacillus cereus	23,225	3	7,742	47,52	0,000
	Staphylococcus aureus	11,738	3	3,913	24,39	0,000
	Listeria monocytogenes	17,061	3	5,687	104,99	0,000
gluk	Bacillus cereus	0,400	1	0,400	2,458	0,137
	Staphylococcus aureus	0,150	1	0,150	0,938	0,347
	Listeria monocytogenes	0,070	1	0,070	1,300	0,271

tr1_A * gluk	Bacillus cereus	0,005	3	0,002	0,009	0,999
	Staphylococcus aureus	0,051	3	0,017	0,106	0,955
	Listeria monocytogenes	0,161	3	0,054	0,992	0,422
Error	Bacillus cereus	2,607	16	0,163		
	Staphylococcus aureus	2,567	16	0,160		
	Listeria monocytogenes	0,867	16	0,054		
Total	Bacillus cereus	482,990	24			
	Staphylococcus aureus	381,890	24			
	Listeria monocytogenes	437,330	24			
Corrected Total	Bacillus cereus	26,236	23			
	Staphylococcus aureus	14,506	23			
	Listeria monocytogenes	18,160	23			

M3 20-28. táblázat: Mikrobiológiai gátlás adatok statisztikai kiértékelése (Post-hoc teszt - Tukey)

MILK
Bacillus cereus

Tukey HSD^{a,b}

tr	N	Subset			
		a	b	c	
N1	3	2,5000			a
N2	3	3,3333	3,3333		ab
N3	3		4,3333	4,3333	bc
Sig.					

Staphylococcus aureus

Tukey HSD^{a,b}

tr	N	Subset			
		1	2	3	
N1	3	2,3333			a
N2	3	3,0000	3,0000		ab
N3	3		3,6667	3,6667	bc
Sig.					

gluk=NG

Tukey HSD^{a,b}

tr	N	Subset			
		1	2	3	
N1	3	2,9333			a
N2	3	3,7000	3,7000		ab
N3	3		4,7667	4,7667	bc
Sig.		0,178	0,051	0,178	

gluk=WG

Tukey
HSD^{a,b}

tr	N	Subset			
		1	2	3	
N1	3	3,2000			a
N2	3	4,0000	4,0000		ab
N3	3		5,0000	5,0000	bc
Sig.		0,142	0,060	0,163	

gluk=NG

Tukey
HSD^{a,b}

tr	N	Subset		
		1	2	
N1	3	3,0667		a
N2	3	3,4333		a
N3	3	3,9667	3,9667	ab
Sig.		0,139	0,139	

gluk=WG

Tukey
HSD^{a,b}

tr	N	Subset		
		1	2	
N1	3	3,2667		a
N2	3	3,4333		a
N3	3	4,1667		a
Sig.		0,054	1,000	

gluk=NG

Tukey
HSD^{a,b}

tr	N	Subset			
		1	2	3	
N1	3	3,1667			a
N2	3	3,6667	3,6667		ab
N3	3		4,3333		b
Sig.		0,225	0,085	1,000	

gluk=WG

Tukey
HSD^{a,b}

tr	N	Subset		

		1	2	3	
N1	3	3,4000			a
N2	3	3,5667			a
N3	3		4,3333		b
Sig.		0,593	1,000	1,000	

M3 29. táblázat: Mikrobiológiai aktivitás – Kalibrációs táblázat (TEK/ml)

Standard	Baktérium koncentráció ($\cdot 10^6/\text{ml}$)	Optikai denzitás (550 nm)
0,5	150	0,125
1	300	0,25
2	600	0,5
3	900	0,75
4	1200	1
5	1500	1,25

M4. Alkalmazott vegyszerek

UHT tej: Riska Zero UHT tartós tej 1 l - 0,1%

Tripszin enzim: Sigma-Aldrich (EC 3.4.21.4) T8658 (CAS 9002-07-7)

Starterkultúra: Chr Hansen FD-DVS YF-L812 Yo-Flex® (Nienburg, Germany)

Membránszűrés (Vegyszeres tisztítás): Ultrasil P3-11, Citromsav (≥99%)

Antioxidáns tartalom vizsgálat reagentjei (FRAP): 20 mM Vas-klorid, 10 mM 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazin, 40 mM Sósav, 300 mM Nátrium-acetát puffer, desztillált víz

Antioxidáns tartalom vizsgálat reagentjei (DPPH): 2,2-Difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazin-1 (DPPH), Metanol (99,7%)

ACE gátlás vizsgálata: 100 mM HCl (pH 7), 50 mM Nátrium-klorid, 10 μM Cink-klorid, 15 μM Abz-FRK(Dnp)-P hordozó

Mikrobiális aktivitás vizsgálata: Bacillus cereus, Staphylococcus aureus ATCC 6538 and Listeria monocytogenes CCM 4699 ,Nátrium-klorid, Pepton, Desztillált víz

Fehérjetartalom vizsgálat: Bradford reagens, Desztillált víz

15%-os öntött gélen történő gélelektroforézis reagentjei:

molekulastandard (BioRad 1610374): Precision Plus Protein™ Dual Color Standards

mintaoldó-puffer (BioRad 1610737): Laemmlí Sample Buffer, 2x + 10% β-merkaptó-etanol

A-oldat (BioRad 1610156), 30% Acrylamide/Bis Solution, 29:1, 500 ml

B-oldat (pH 8,8): 2 M Trisz-HCl

C-oldat: 0,347 M SDS

E-oldat (pH 6,8): 0,5 M Trisz-HCl

ammónium-perszulfát-oldat: 0,44 M ammónium-perszulfát ((NH₄)₂S₂O₈)

15%-os elválasztó gél-oldat, 2 kis géltre: 4 ml A-oldat; 1,8 ml B-oldat; 50 μl C-oldat; 2,06 ml desztillált víz; 6 μl TEMED; 50 μl ammónium-perszulfát-oldat.

6%-os gyűjtőgél, 2 kis géltre: 0,5 ml A-oldat; 27,5 μl C-oldat; 0,33 ml E-oldat; 1,6 ml desztillált víz; 3 μl TEMED; 25 μl ammónium-perszulfát-oldat

Futtató-puffer: 0,025 M Trisz, 0,0035 M SDS, 0,193 M glicin

Fehérjedetektálás reagentjei:

20% TCA

differenciál-oldat: 10% etil-alkohol (96%-os), 5% ecetsav (96%-os)

Festékoldat: 0,2% Coomassie Brilliant Blue R-250 festék, 9% ecetsav (96%-os), 45% etil-alkohol (Felhasználás előtt 30 percig mágneses keverőn kevertetve)

festékmosó-oldat: 10% ecetsav

15%-os öntött gélről PVDF membránra történő immunblott reagensei:

foszfát-puffer (PBS, 0,15 M, pH 7,4): 0,14 M NaCl; 0,0027 M KCl; 0,01645 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,002 M KH_2PO_4

anód I.-puffer (pH 10,4): 0,3 M Trisz, 10% metanol

anód II.-puffer (pH 10,4): 25 mM Trisz, 10% metanol

katód-puffer (pH 9,4): 25 mM Trisz bázis, 40 mM glicin, 10% metanol

fedő-puffer: 1% BSA, 0,05% Tween-20 foszfát-pufferben

Transzfer utáni immunreaktív fehérjék detektálásának reagensei:

foszfát-puffer (PBS, 0,15M, pH 7,4) Lásd feljebb!

1.-oldat: 0,4% H_2O_2 -oldat (30%-os) foszfát pufferben

2.-oldat: 1 db. 4-kloro-naftol tableta (Sigma; 30mg) 10 ml etil-alkoholban

4-kloro-naftol/ H_2O_2 szubsztrát-oldat: 1.-oldat + 2.-oldat

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőimnek **Dr. Koris Andrásnak** és **Dr. Arijit Nathnak** akik széleskörű szakmai tudásukkal és tanácsaikkal segítették doktori munkám elkészülését.

Hálásan köszönöm **Dr. Vatai Gyulának** a szakmai támogatását kutatási témám megválasztásában és PhD-s éveim során kapott rengeteg támogatást.

Köszönettel tartozom **Dr. Takács Krisztinának** a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ (NAIK) tudományos főmunkatársának szakmai segítségért az SDS-Page és immunblott vizsgálatokban, illetve az eredmények kiértékelésében.

Köszönettel tartozom **Dr. Ladányi Mártának** a Matematika és Természettudományi Intézet tanszékvezetőjének szakmai segítségért a doktori munkám eredményeinek statisztikai vizsgálatában nyújtott segítségéért.

Külön szeretném megköszönni a **Élelmiszeripari Műveletek és Folyamattervezés Tanszék dolgozóinak, kollégáimnak** azt a rengeteg segítséget amit betegségem idején nyújtottak nekem, nélkülük doktori munkám nem valósulhatott volna meg.

Köszönettel és hálával tartozom **családomnak és barátaimnak** akik végtelen türelmet és megértést mutattak felém a dolgozat írása közben.