

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Csighy Attila

Budapest

2022



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

1. A munka előzményei, célkitűzések

A 21. századi társadalomban, az élelmiszeripar számos jelentős változáson esett át. Az ipari, gyártási technológiák fejlődésével egyidejűleg az élelmiszeripari termékek is változtak. A jelen kor fogyasztója egyre nagyobb figyelmet fordít a tudatos és egészséges táplálkozásra. Bizonyított, hogy a helytelen táplálkozás hozzájárul bizonyos betegségek kialakulásához. A helytelen táplálkozás mellett az embereket érő stresszhatás és a felgyorsult életvitel számos negatív következménnyel jár, mint például a metabolikus zavarok kialakulása. Ilyen metabolikus zavarok közé tartozik az elhízás, magas vérnyomás és a szív és érrendszeri megbetegedések. Az említett metabolikus stresszhatás következtében kialakuló megbetegedések, eltolódott szabad gyökök – antioxidáns egyensúly helyreállítható, illetve számos, a szabadgyökök által indukált megbetegedés csökkenthető bioaktív peptidek fogyasztásával. Ezen bioaktív peptidek különböző élelmiszerek enzimes hidrolízise, fermentációja révén is előállíthatók. A bioaktív peptidek egyik legmeghatározóbb forrása a tej. Ezen peptidek előállításánál figyelembe kell venni az egyes allergiát okozó anyagok jelenlétét. Korunk népbetegsége az allergia, melynek számos típusa és fajtája ismert. A tej allergia, a tejben lévő fehérjékre adott ellenreakció. A fehérjék allergénitása nagymértékben függ a fehérjék összetételéből és azok felépítéséből. A hipoallergén peptidek előállítása egy új piaci szegmenst nyithat meg a fogyasztók számára. Kutató munkám során céloom olyan bioaktív peptidek előállítása, melyek növelt antioxidáns tartalmukkal, angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) gátló hatással, antimikrobiális és hipoallergén tulajdonsággal rendelkeznek.

Célkitűzések

Kutatási munkám során céloom 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.

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

1. Szakirodalmi források áttekintése a bioaktív peptidek előállításának technológiájáról, illetve a szervezetre gyakorolt pozitív élettani hatásairól.
2. 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.

3. 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.
4. A különböző enzimkoncentrációs beállításokon végzett hidrolízis hatásának vizsgálata a tejfehérjék allergenitására.
5. A membránszűrés során előállított ultraszűrt tejfehérjesűrítmény enzimes hidrolízisét követően a peptidek (*dipeptid, tripeptid, oligopeptid*) eloszlásában bekövetkező változások nyomonkövetése.
6. Az előállított tejfehérjesűrítmény és hidrolizátum fermentációja *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* és *Streptococcus thermophilus* starter kultúrával glükóz hozzáadása mellett.

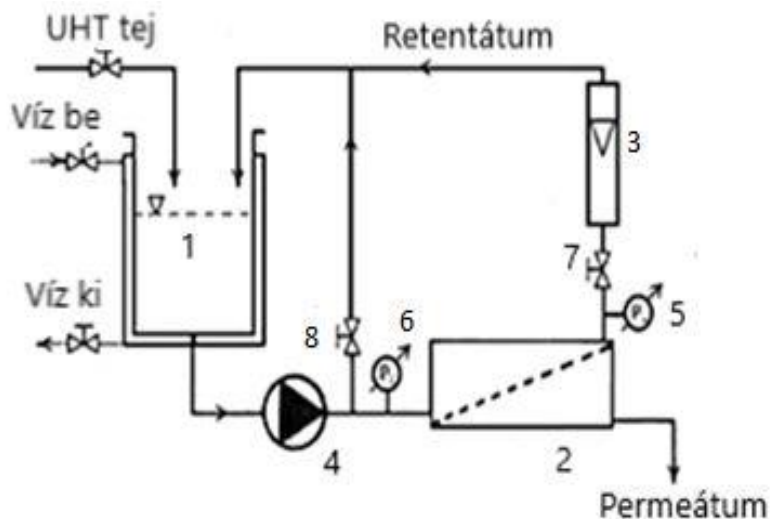
2. Anyag és módszer

2.1 Alkalmazott UHT tej

Doktori munkám során UHT tehéntejet használtam, melyet 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.

2.2 Membránszűrő berendezés

A keresztáramban működtetett membránszűrő berendezésben (1. ábra) 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.



1	Táptartály
2	Membránmodul (NF)
3	Rotaméter
4	Szivattyú
5 - 6	Nyomásmérő
7 - 8	Szelep

1.ábra: UHT tej nanoszűrésére kialakított membránszűrő berendezés

Az UHT tej sűrítése kerámia csőmembrán alkalmazásával történt, amit egy rozsdamentes acélból készült egycsatornás keresztáramú membránmodulba helyeztem. A membránszűrés során egy 5 nm-es nanoszűrő membránt (Membralox[®] T1-70, Pall Corporation, Crailsheim, Németország) alkalmaztam. A kereskedelemben kapható csőmembránt módosítottam egy 6,5 mm átmérőjű, 241 mm hosszú statikus keverővel, mely a rendszerből bármikor eltávolítható, illetve cserélhető, melyet a 2. ábra mutat be.



2.ábra: Statikus keverő beépítése 5 nm-es kerámiacsőmembránba

A membránszűrést szakaszos üzemelési mód mellett végeztem. 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.

2.3 Tejfehérjesűrítmény 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. A fehérjesűrítményt 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. A vizsgált tripszin törzsoldat enzimaktivitása 15,6 AU/(s•μg) volt.

A fehérjesűrítmény enzimes hidrolízisét 40 °C-on 10 percig 175 rpm (Revolutions Per Minute) értéken, míg az inaktíválást 70 °C-on 30 percig végeztem.

2.4 Mikrobiális fermentáció

A fermentációt *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* és *Streptococcus thermophilus* mikroba törzsekkel végeztem.

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. A tejfehérje-koncentrátumhoz és enzimekkel kezelt folyékony tejfehérje-koncentrátumhoz aszeptikus körülmények között külön hozzáadtam 40% -os steril glükóz törzsoldatot.

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. A minták fermentálását 45 °C hőmérsékleten 6 órán át inkubátorban végeztem.

2.5 Analitikai vizsgálatok

2.5.1 SDS-Poliakrilamid gélelektroforézis

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 ProteinTM 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.

Az elektroforézis során alkalmazott akrilamid és biszakrilamid tartalmú futtatógél és a gyűjtőgél koncentrációja 15%, illetve 6% volt.

A gél zsebeibe a minták felvitele (10 µL) előtt futtató-pufferrel töltöttem fel az egyes zsebeket.

A gélek kiértékelése BIO-RAD Gel Doc 2000 rendszerrel történt.

2.5.2 Antioxidáns tartalom meghatározása

2.5.2.1 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 hígított 100 µL felülúszóhoz 2,9 mL reagenst adtam. Az így elkészült mintákat 35 °C-os hőmérsékleten 30 percig inkubáltam (HACH, Düsseldorf, Németország). Az inkubálási idő letelte után az abszorbanciát 517 nm-en mértem UV-Vis spektrofotométerrel (EvolutionTM 300; Thermo ScientificTM, Waltham MA, USA). Vak minták elkészítéséhez 100 µL desztillált vizet és 2,9 mL reagenst használtam.

2.5.2.2 Gyökfogó kapacitás mérése DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl - Gyökfogó kapacitás) módszer alkalmazásával

A DPPH módszer első lépéseként a mintákat 20 percig centrifugáltam 10000 rpm fordulatszámon, 20 percen keresztül. A hígított 100 μL felülúszóhoz 3,9 mL $6 \cdot 10^{-5}$ M DPPH-metanol oldatot öntöttem, majd Vortex kémcsórázó (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 inkubálást sötét szobában végeztem el. Az inkubálási idő letelte után az abszorbanciát 517 nm-en mértem UV-Vis spektrofotométerrel.

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

A vizsgálatra szánt mintákat 20 percig, 10000 rpm fordulatszámon centrifugáltam laboratóriumi berendezésen. A kísérletek elvégzéséhez szükséges reakcióelegyet a megadott protokoll alapján készítettem el. A centrifugálás során keletkező felülúszót és a fermentlevet hígítani kellett, hogy a mérési tartományon belül vizsgálhatóak legyenek, mely hígítási érték $10 \cdot 10^7$ közötti volt.

A reakció a szubsztrát hozzáadása után kezdődött el. A fluoreszcens jelintenzitásban történő változást fluoreszcens lemezolvasóban (BMG Novostar, BMG Labtech, Németország) végeztem 37 °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.

2.5.4 Enzimaktivitás vizsgálata

Az enzimaktivitás meghatározása során 10 μL tripszin törzsoldatból (tripszin koncentrációja 0,009 g/mL) indultam ki. Ezt követően elkészítettem a TRIS puffer oldatot a megadott leírás szerint. A szubsztrát oldat készítését követően az elkészített szubsztrát oldatból 1,63 μL -t összekevertem 1,3 mL TRIS puffer oldattal. A reakció elegy összeállításához 10 μL tripszin törzsoldatot, 10 μL TRIS puffer oldatot és 80 μL 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 (2.5.3-as fejezet), $\lambda = 340$ nm az emissziós hullámhossz $\lambda = 405$ nm volt. Vak minták elkészítéséhez 10 μ L desztillált vizet és 90 μ L szubsztrátot használtam.

2.5.5 Mikrobiológiai aktivitás vizsgálata

A mikrobiológiai aktivitás vizsgálata során, fejezetben a tej, illetve tejtermékekben leggyakrabban előforduló patogén mikrobák (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* CCM 4699) gátlását vizsgáltam. A minták előkészítését az előző fejezetekben ismertetett centrifugával 10000 rpm fordulatszámom és 20 percen keresztül végeztem. A frissen elkészített baktérium kultúrákat MRD (Maximum Recovery Diluent) oldat alkalmazásával hígítottam hogy a vizsgálat elvégzéséhez szükséges 10^6 TEK/mL koncentráció biztosított legyen.

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 μ L mintát pipettáztam. 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.

2.5.6 Fehérje koncentráció meghatározása

A fehérje koncentráció vizsgálata során a 100 μ L-re hígított minták mindegyikéhez 3 mL Bradford-reagenst adtam majd Vortex kéneső 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 Scientific™, 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.

2.5.7 Öntött gélen elválasztott fehérjék immunblottja

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.

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 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 Eredmények és értékelésük

3.1 Tejfehérjesűrítmény előállítása membránszűrés alkalmazásával

Az alábbi fejezetben a transzmembrán nyomáskülönbség és a recirkulációs-térfogatáram értékek hatását vizsgáltam a gélréteg vastagságára illetve a fluxus értékére.

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 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.

A statikus keverő alkalmazása mellett csökken a polarizációs réteg ellenállása. További kísérleteimet a választott membránszűrés 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.

3.2 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 kísérletterv kiértékelése során, az egyik legfontosabbnak a 2^P-n faktoros terv összesítő táblázatát tartottam, segítségével meghatározhatóak a paraméterek közti összefüggések, kapcsolatok és az egymásra gyakorolt hatásuk.

Az adatok elemzése során, majd a statisztikai együtthatók visszakódolása után lineáris modellt állítottam, amellyel előre jelezhető 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 (statikus keverő mellett) érvényessége csak megadott tartományon belül érvényes: TMP = 2 – 3 [bar], RFR = 100 – 200 [L/h].

A statisztikai mutatók transzformálását ebben az esetben is elvégeztem, majd modell (statikus keverő nélkül) egyenletet állítottam, szintén 90 %-os konfidencia szintet alkalmazva.

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

3.3 Fehérjekoncentráció meghatározása

A transzmembrán nyomáskülönbség 3 bar-ra történő növelésével, javul 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.

A magasabb transzmembrán nyomáskülönbség hatására a fehérjemolekulák membrán pórusain való átjutása romlott, ami elképzelhető, hogy a nagyobb transzmembrán nyomáskülönbség következtében alakult ki. 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.

3.4 Antioxidánskapacitás meghatározása

A vizsgált minták antioxidáns tartalma két különálló módszerrel (FRAP, DPPH) került meghatározásra. Az antioxidáns kapacitást egyaránt mértem a fehérjesűrítvényben, továbbá az enzim kezelt, fermentált minták esetében is hozzáadott glükózzal, illetve nélküle. Az enzimkoncentráció értékének megválasztása kiemelten fontos, ugyanis ha az enzimkoncentráció túl magas, abban az esetben a termék organoleptikus tulajdonságait is negatív irányba tudja befolyásolni.

A mért eredményeken jól látható, hogy nanoszűrt fehérjesűrítvény antioxidáns kapacitása $167,35 \pm 9,78$ mg/L volt aszkorbinsavra vonatkoztatva (FRAP), míg a 0,032 g/L-es tripszin enzimkoncentráció esetén volt mérhető a legmagasabb antioxidáns tartalom, ami 202,65 mg/L volt (FRAP). Hasonló eredményt tapasztaltam a DPPH módszerrel végzett vizsgálataim során.

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 fermentáció hatására csökkenő érték tapasztalható az antioxidáns tartalomban, továbbá a fermentáció során hozzáadott glükóz is negatívan befolyásolja az antioxidáns kapacitást, melynek egyik oka a hidrofil és hidrofób peptidok aránya. Feltételezhető, hogy a hidrofil peptidok jelenléte csökkentheti a fermentált termék általános antioxidáns kapacitását.

3.5 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, míg 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 hidrolízis hatásfoka az enzimkoncentrációk növelésével javult, minél nagyobb volt az alkalmazott enzim mennyisége annál hatékonyabb volt a fehérjék hidrolízise a folyamat során. A tripszines kezelés hatására a fehérjemintázat megváltozott, a fehérjék nagymértékben lebomlottak, továbbá a felső nagymolekulatömegű sávokban a fehérjék mennyisége jelentősen lecsökkent, a 0,008 g/L tripszin koncentráció hatására. A hozzáadott glükóz nem befolyásolja a tejsűrítményben található fehérjék hidrolízisét a folyamat során.

Az egyes sávok intenzív elszíneződése az adott allergén fehérje jelenlétére utal. 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) követően. Megfigyelhető, hogy az allergén hatás tovább csökkenthető abban az esetben, ha az enzimesen hidrolizált mintákat tejsavbaktériumokkal fermentáljuk. Ez a tendencia szintén megfigyelhető a 0,016 és 0,032 g/L enzimkoncentrációnál is.

3.6 Angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) gátlás aktivitásának vizsgálata

Az angiotenzin-konvertáló enzim gátlásának jelentős szerepe van az egészség megőrzésében, gátlásával csökkenthetőek a magas vérnyomás okozta káros szív és érrendszeri megbetegedések kockázata.

Az enzimkoncentráció növelésével csökkenő IC_{50} érték figyelhető meg a hidrolízis, illetve a fermentáció kombinált alkalmazása során.

Megállapítható továbbá, hogy a hozzáadott glükóz is hatással van a folyamat során mért IC_{50} értékre, ugyanis azokban a mintákban, ahol glükózt adtam a mintákhoz kisebb IC_{50} 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.

3.7 Mikrobiológiai aktivitás vizsgálata enzimes hidrolízissel előállított minták esetében

A tripszinnel végzett enzimes hidrolízis során megfigyelhető volt az antibakteriális aktivitás *Bacillus cereus* és a *Staphylococcus aureus* mikroba törzsekkel szemben. Megállapítható továbbá, hogy a Gram + mikrobák érzékenyebbek a tejsavófehérjékből származó peptidekre, ellentétben a Gram – mikrobákkal.

A tripszin enzim 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.

3. 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.

Az allergénmentes termék előállítása során alapanyagként UHT tejet használtam, melyet első lépésben membránszűréssel besűrítettem. Itt céлом 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 peptidek mennyisége, melyek közvetlenül hatnak a fehérjesűrítmény ACE gátló és antibakteriális hatására.

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.

Vizsgálataim során tripszin enzimet alkalmaztam, azonban a későbbi vizsgálatok során érdemes lenne más enzimeket is kipróbálni, vizsgálni a hidrolízis határfokát, illetve a keletkező peptidek 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.

4. Új tudományos eredmények

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/m²h, 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 Tejfehérjesűrítmény előállítása membránszűrés alkalmazásával c. alfejezet).

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

Analitikai vizsgálataim alapjául a membránszűrés során kapott fehérjesűrítményt 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 fehérjesűrítmény enzimes 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 tejfehérjesűrítményéhez képest. Az N3-as enzimkoncentráció mellett a $0,032$ g/L-es enzimes 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 molekulásávban 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 enzimm koncentráció 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.

5. Az értekezés témakörében megjelent közlemények és előadások

6.1 Szakcikk nemzetközi, impakt faktorral rendelkező folyóiratban

- Nath, A., **Csighy, A.**, Eren, B. A., Tjandra Nugraha, D., Pásztoné-Huszár, K., Tóth, A., Takács, K., Szerdahelyi, E., Kiskó, G., Kovács, Z., Koris, A., & Vatai, G. (2021). Bioactive Peptides from Liquid Milk Protein Concentrate by Sequential Tryptic and Microbial Hydrolysis. Processes. 9(10), 1688. **IF: 2,847** <https://doi.org/10.3390/pr9101688>
- **Csighy, A.**, Nath, A., Vozáry, E., Koris, A., Vatai, G., 2020. Investigating the Texture and Antioxidant Capacity of Papain and Trans-glutaminase Enzyme-treated Yogurt with Different Carbohydrates – Glucose, Sucrose and Maltodextrin. Periodica Polytechnica Chemical Engineering. Online session. **IF:1.248** <https://doi.org/10.3311/PPch.15041>
- Nath, A., Eren, B. A., **Csighy, A.**, Pásztoné-Huszár, K., Kiskó, G., Abrankó, L., Tóth, A., Szerdahelyi, E., Kovács, Z., Koris, A., & Vatai, G. (2020). Production of Liquid Milk Protein Concentrate with Antioxidant Capacity, Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity, Antibacterial Activity, and Hypoallergenic Property by Membrane Filtration and Enzymatic Modification of Proteins. Processes, 8(7), 871. **IF: 2,847** <https://doi.org/10.3390/pr8070871>

6.2 Konferencia kiadványban megjelent összefoglalók

- **Csighy, A.**, Nath, A., Vozáry, E., Galambos, I., Koris, A., Vatai, G., 2019. Reduction of allergenicity of cow milk and its fermented product by combination of membranefiltration, enzymatic hydrolysis and microbial fermentation process. PERMEA 2019 - Membrane Conference of Visegrad Countries. Eötvös Lorand University. Budapest
- Nath, A., Eren, B.A., **Csighy, A.**, Tóth, A., Némethné, S.E., Kiskó, G., Friedrich, L.F., Pásztoné Huszár, K., Koris, A., Vatai, G., 2018b. Biologically Active Peptides from Ultra-heat Treated Milk by Membrane- and Enzymatic Routes, in: Third International Conference on Food Science and Technology. Szent István Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Budapest, p. 57.

