

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS
TÉZISEI**

BUZÁS HENRIETTA

MOSONMAGYARÓVÁR

2024

**SZÉCHENYI ISTVÁN EGYETEM
ALBERT KÁZMÉR MOSONMAGYARÓVÁRI KAR
BIOLÓGIAI RENDSZEREK ÉS PRECIZIÓS TECHNOLÓGIAI
TANSZÉK**

Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi
Multidiszciplináris Doktori Iskola Pulay Gábor Élelmiszertudományi
Doktori Program

Doktori Iskolavezető:
Prof. Dr. Varga László, DSc
egyetemi tanár

Programvezető:
Prof. Dr. Varga László, DSc
egyetemi tanár

Témavezetők:

Dr. Kovács Attila József, PhD
egyetemi tanár

Dr. Szafner Gábor, PhD
Kutatás-fejlesztési és innovációs osztályvezető
Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet Kft.

**MEMBRÁNSZEPARÁCIÓS TECHNOLÓGIÁKKAL
TEJFEHÉRJE- ÉS SAVÓFEHÉRJE FRAKCIÓK ELŐÁLLÍTÁSA,
EZEN FRAKCIÓK RÉSZARÁNYÁNAK MEGHATÁROZÁSA
KORSZERŰ ANALITIKAI MÓDSZEREKKEL**

Készítette:

Buzás Henrietta

**Mosonmagyaróvár
2024**

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Napjainkban mind a tejfehérje alapú funkcionális élelmiszerek, mind a csecsemőtápszerek iránti kereslet globálisan nő (Lagrange et al., 2015). Mindkét termékcsoport fejlesztéséhez a gyártóknak tervezniük kell az alapanyagként szolgáló fehérjekoncentrátum- és izolátum porok fehérje profilját annak érdekében, hogy a fogyasztói célcsoport igényeinek megfelelő fehérjeprofiliú termékeket tudjanak előállítani.

A tejben található fehérje komponens egy heterogén komplex peptid csoport, amelyet 90-95%-ban négy kazein frakció, α S1-kazein, α S2-kazein, β -kazein, κ -kazein és két savófehérje frakció, az α -laktalbumin és β -laktoglobulin alkotja. A tejfehérjék sokféleségét tovább fokozza a genetikai polimorfizmus is, amely eltérő fehérjeváltozatokat eredményez. Számos tanulmány igazolta, hogy az egyes frakciók mennyisége és relatív aránya, bizonyos allélok előfordulása hatással lehetnek a tej fizikai-kémiai, táplálkozásélettani, valamint technológiai tulajdonságaira. Ezért az egyes tejfehérje frakciók pontos ismerete nem csak a tejipar, hanem a táplálkozástudomány számára is kulcsfontosságú.

A tejiparban alkalmazott fehérje fracionáló mikroszűrés célja, hogy az eltérő fizikai-kémiai és techno-funkcionális tulajdonságokkal rendelkező kazein- és savófehérje frakciókat a termék céljától függően szeparálja. Ez napjainkban egyedi kazein- és savófehérjefrakciók szintjén nem ismert. Szakirodalomból azonban az látható, hogy mind a tej hőkezelésének mértéke, mind a szűrés során alkalmazott technológiai paraméterek (hőmérséklet, nyomás, membrán pórusmérete, membrán típusa)

befolyásolhatják az egyes fehérjefrakciók permeációját, ezáltal a végtermék fehérjeprofílját.

Kutatómunkám főbb célkitűzései az alábbiak voltak:

1. Első lépésként egy olyan analitikai módszer fejlesztése, amely alkalmas a tejben lévő hat fő fehérjefrakció, nevezetesen az α S1-kazein, α S2-kazein, β -kazein, κ -kazein, α -laktalbumin és β -laktoglobulin megbízható, egyidejű, kvalitatív és kvantitatív meghatározására.
2. A kutatás második felében céloim különböző pórusméretű polimer membránokkal, hideg (15 °C) és hagyományos meleg (45 °C) üzemelési hőmérsékleten mikroszűrt retentátum- és permeátum minták előállítására, az ipari gyakorlatnak megfelelően 66%-os volumenredukció és a tejjel vonatkoztatott 120%-os diafiltráció alkalmazásával.

Az előállított retentátum- és permeátum minták fehérjeprofíljának meghatározása, mely által meghatározható, hogy a mikroszűrés során alkalmazott membrán pórusméret és a szűrés hőmérséklet hogyan befolyásolja az egyes fehérjefrakciók permeációját a mikroszűrés során.

Az eredmények alapjául szolgálhatnak egyedi fehérjeprofíllal rendelkező fehérjekoncentrátum gyártástechnológiájának kidolgozásához, továbbá az ipar számára is hasznosítható tudást, valamint esetleges gazdasági előnyöket is jelent.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1 HPLC módszer fejlesztése a tejben lévő fő fehérje frakciók elválasztására és mennyiségi meghatározására

2.1.1 Felhasznált standardok, reagensek és vegyszerek

A HPLC elemzések során a fő tejfehérje frakciók azonosítását és mennyiségi meghatározását kereskedelmi forgalomban kapható, liofilizált kazein- és savófehérje frakció standard vegyületek alapján határoztam meg. A különböző tisztaságú standard vegyületek a következők voltak: κ -kazein ($\geq 70\%$), α_s -kazein ($\geq 70\%$), β -kazein ($\geq 90\%$), α -laktalbumin ($\geq 85\%$), β -laktoglobulin A ($\geq 90\%$), β -laktoglobulin B ($\geq 90\%$). A felsorolt standardok mindegyike a Sigma-Aldrich (Magyarország) termékei voltak. A tejfehérjék kromatográfias elválasztásához szükséges pufferoldatok készítéséhez analitikai tisztaságú guanidin-hidrokloridot ($\geq 99\%$), trinátrium-citrát-dihidrátot ($\geq 99\%$), DL-Ditiotreitolt ($\geq 99\%$) (Sigma-Aldrich, Magyarország) és BIS-TRIS puffert (VWR International Ltd., Debrecen, Magyarország) használtam fel. Az eluenseket HPLC gradiens tisztaságú acetonitril (ACN) (Molar Chemicals Kft., Halásztelek), valamint nagytisztaságú víz (fajlagos ellenállása: $18\text{M}\Omega\text{ cm}$, $25\text{ }^\circ\text{C}$) 99%-os tisztaságú trifluoecetsav (Sigma-Aldrich, Magyarország) felhasználásával készítettem el.

2.1.2 Alkalmazott készülékek

A HPLC méréseket légmentesítő egységgel, kétcsatornás pumpával, bináris nagynyomású szivattyúval (Flexar FX-15 UHPLC), automata mintaadagolóval, kolonna termosztáttal és diódasoros optikai egységgel

ellátott detektorral (DAD), gázmentesítő egységgel felszerelt Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, USA) típusú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás rendszeren hajtottam végre. A minták injektálása egy 100 μ L-es hurokkal felszerelt automata injektor szelepen keresztül történt. A HPLC berendezést egy szoftveren (Chromera CDS) keresztül működtettem, mely szabályozta az oldószer gradienst, adatgyűjtést és adatfeldolgozást. Az analitikai mérések során felhasznált nagy tisztaságú vizet Zeener Power (Human Corporation, Korea) víztisztító rendszerrel állítottam elő. A minták centrifugálásához Eppendorf 5804R típusú centrifugát használtam, a minták kevertetését DLAB-MX-S típusú kémcsőrázóval végeztem. Az eluenseket VWR USC-TH típusú ultrahangos kádban gázmentesítettem.

Az elemzések során a következő puffer oldatokat és mintaoldatokat készítettem el:

Puffer A: 0,1 M BisTris puffert, 6,0 M Guanidin-hidrokloridot, 5,37 mM trinátrium-citrát-dihidrátot és 19,5 mM DL-ditiotreitolt mértem egy 10 mL-es mérőlombikba, majd a lombikot nagy tisztaságú vízzel töltöttem jelre (pH=7).

Puffer B: 4,5 M Guanidin-hidrokloridot A-eluensben (nagy tisztaságú víz, ACN és TFA 900:100:1) (v/v%) feloldva 10 mL-es mérőlombikban.

2.1.3 Mintaelőkészítési protokoll

A szobahőmérsékletű tejmintát, egy 2 mL-es Eppendorf csőben 1:1 (v/v%) arányban (800-800 μ L) hígítottam az A-pufferrel. Lezártam, majd 10 másodpercig intenzíven kevertettem kémcsőrázóval, ezután 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltam. Az inkubációs idő letelte után, 15 percig 4 °C-on, 14000 \times g fordulatszámon centrifugáltam

mikrocentrifugában. A keletkezett szilárd zsírréteget steril spatulával eltávolítottam, majd a zsírintes felülúszót 1:3 (v/v%) arányban (300-900 μL) hígítottam a B-pufferrel, amellyel ismét 10 másodpercig intenzíven kevertetem. A kapott oldatot szűrés nélkül közvetlenül injektáljam a HPLC kolonnára.

2.1.4 Kromatográfiai körülmények

Állófázisként egy Phenomenex gyártmányú (Torrance, CA, USA) C18-as Wipore (250 mm \times 4,6 mm \times 5 μm , 200 Å) és egy Vydac 214MS (30 nm; 5 μm ; 150 \times 2,1 mm) C4 kolonnát teszteltem a tejfehérjék egyidejű elválasztásra.

A legjobb elválasztást és csúcsalakokat a következő gradiensprogram során értem el. Az A-eluens rész arányát 70,9%-ról csökkentettem 54,0%-ra 20 perc alatt, majd a kezdeti gradiens szakaszt visszaállítottam és ekvilibráltam a kolonnát 0,5 percen keresztül. Az oszlopról eluálódó vegyületek detektálását az optimalizálás alatt több hullámhosszon is rögzítettem, (208 nm, 214 nm, 225 nm) azonban kompromisszumos megoldásként detektálásnak a 214 nm-es hullámhosszt választottam.

Az automata mintaadagoló tér hőmérséklete 10 °C-ra volt beállítva, a minta injektálás térfogata pedig 20 μL volt, 40 °C-os kolonnatér hőmérséklet alkalmazása mellett.

Az optimált módszer validálása során a következő teljesítményjellemzőket határoztam meg: specificitás, linearitás, módszer precizitás (ismételhetőség, reprodukálhatóság), oldatstabilitás, kimutatási határ (limit of detection, LOD) meghatározási határ (limit of quantitation, LOQ), torzítatlanság.

2.2 Mikroszűrési kísérletek

A doktori munkám második felében pasztörözött, 300 liter fölözött tejet mikroszűrtem 0,2 μm és 0,5 μm névleges pórusméretű spiráltekerceselt PVDF membránnal hideg (15 °) C és meleg (45°C) szűrési hőmérsékleten. A mikroszűrési kísérletek során minden esetben a tejure vonatkoztatott 66%-os volumenredukciót és 120%-os diafiltrációt alkalmaztam állandó, 0,8 bar TMP mellett. A mikroszűrés és a diafiltráció szakaszos (batch) üzemben történt. Minden kísérletet három független ismétléssel végeztem.

A szűrési kísérletekhez egy 0,2 μm (Alfa Laval MFP2 6338/48 P 174516) és egy 0,5 μm (Alfa Laval MFP5 6338/48 P 114046) névleges pórusátmérőjű, fluoropolimer spiráltekerceselt membránt alkalmaztam. A membránok hosszúsága 965 mm, átmérőjük 160,-162,0 mm, hosszuk 965 mm, míg a távtartó (spacer) vastagsága 48 mil (1,17 mm) volt. A spiráltekerceselt membránok mindegyike egyenként 15,4 m² aktív szűrőfelülettel rendelkezett.

A mikroszűrés és diafiltráció során összesen öt alkalommal vettem mintákat, 20%, 40% 66%-os volumenredukció érték elérésekor, valamint a diafiltráció során a DF 60% és a DF 120% fázisban. Mintavételezéskor mind a permeátumból, mind a retentátumból, fázismintákat vettem 100 mL-es steril mintagyűjtő edényekbe.

2.2.1 Fehérjefrakciók aktuális permeáció értékének meghatározása

Az MF permeátumok esetében ugyanúgy jártam el, mint a tejminták esetében. Az MF retentátum minták, melyek fehérje tartalma magasabb, a koncentrációs faktor alapján becsült fehérje tartalom függvényében

nagy tisztaságú vízzel hígítottam, úgy, hogy az egyes fehérje frakcióknak megfelelő kalibrációs mérőgörbék lineáris tartományába essen. Annak érdekében, hogy az eltérő fehérjeprofíllal rendelkező tejek felhasználásával végzett mikroszűrések összehasonlíthatóak legyenek, a vizsgált pontokon aktuális permeáció értékeket határoztam meg a következő összefüggés alapján:

$$P(\%) = \frac{c_1}{c_2} \times 100 \quad (6)$$

Ahol,

P: permeáció (%)

c1: a vizsgált komponens koncentrációja (mg/100 g) a permeátumban

c2: a vizsgált komponens koncentrációja (mg/100 g) a retentátumban.

Egyes fázisminták fizikai-kémiai paramétereit előzetes vizsgálati terv alapján az MTKI Kft. akkreditált (NAH-1-1013/2021) Élelmiszervizsgáló és Nyerstejminősítő Laboratóriumában határozták meg a **1. táblázatban** található szabványok, módszerek alapján. Az eredményeket a szűrési anyagmérleg felállításához használtam fel az egyes mikroszűrésekre vonatkozóan.

1. táblázat A fázisminták vizsgálata során alkalmazott szabványok/ módszerek

Vizsgált összetevő	Alkalmazott szabvány / módszer	Alsó mérési határ/tartomány
Száranyag-tartalom	MSZ 3744:1981 1. fejezet	0,1 g/100 g
Fehérje tartalom	MSZ EN ISO 8968-1:2014 9.2	0,038 g/100 g
Zsírtartalom	MSZ EN ISO 1211:2010	0,031 g/100 g
Hamutartalom	Methodenbuch Band VI. – 5. Erg. 2000 Milch und Milchprodukte C 10.2; VDLUFA-Verlag, Darmstadt, 2000	0,015 g/100 g
NPN-tartalom	MSZ EN ISO 8968-4:2016 10.2. eljárás	0,0025 g/100 g
Kazein fehérje tartalom	Methodenbuch Band VI	0,031g/100 g
Savófehérje tartalom		
Titrlható savasság	MSZ 3707:2017 3.2. fejezet	0,2 °SH
pH-érték	MSZ 3707:2017 4. fejezet	4,0 - 7,0

2.3 Alkalmazott statisztikai módszerek

HPLC módszer teljesítményjellemzőinek statisztikai értékeléséhez a Microsoft Office Excel program Analysis Toolpak bővítményét (Microsoft Corporation, USA) használtam. A mikroszűrési kísérleteket IBM® SPSS® v25 statisztikai szoftver alkalmazásával kéttényezős varianciaelemzést (ANOVA) és Tukey-féle HSD post-hoc tesztet, végeztem a minták átlagértékeinek összehasonlításának céljából $p \leq 0,05$ szignifikancia szinten.

3. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZETÉSEK

3.1 A fő tejfehérje frakciók folyadékkromatográfiás elválasztása

Az általam javasolt szabadalmi oltalom alatt álló optimált fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC-DAD) módszer alkalmas a fő tejfehérjefrakciók (κ -CN, $\alpha 1$ -CN, $\alpha 2$ -CN, β -CN, β -LG, α -LA) és azok genetikai variánsainak egyidejű, hatékony és gyors elválasztására, egyszerű mintaelőkészítési protokollal, mindössze 20 perces elemzési idővel. Az elsőként eluálódott csúcsok 3,79 - 6,15 perc retenciós idővel detektálható κ -CN-t képviselik, amelyek több fő- és mellécsúcsban is megjelennek. A főcsúcs $4,76 \pm 0,01$ perc retenciós idővel jelent meg. Az egyedi tejminták elemzésekor kétféle κ -CN típust figyeltem meg. A κ -CN genetikai variánsainak azonosítása standard hiányában nem volt lehetséges. Korábbi tanulmányok alapján (Visser et al., 1991; Groen et al., 2004; Bordin et al., 2001) beazonosítható, hogy ezek a csúcsok a κ -CN A és κ -CN B genetikai variánsainak különböző mértékű glikozilált és glikozilálatlan formáinak felelnek meg. A κ -CN után az $\alpha 2$ -CN-t teljesen

sikerült elválasztani $7,57 \pm 0,01$ perc retenciós idővel a κ -CN-től, amelyet az α 1-CN követett a $12,35 \pm 0,01$ perc retenciós idővel. Az α 1-CN minden esetben egy jellegzetes kettős csúcsban jelent meg. A csúcs jobb oldalán lévő kisebb csúcs (váll) az α 1-CN eltérő foszforiláltsági fokát jelzi (van Hekken et al., 1990; Bobe et al., 1998; Bordin et al., 2001). A kazeinek közül utolsóként a leghidrofóbabb β -CN eluálódott az oszlopról. Egyedi tejminták esetében β -CN egy vagy két csúcsban eluálódik, attól függően, hogy az adott egyed a β -CN-re homozigóta vagy β -CN heterozigóta. Homozigóta szarvasmarha egyedek esetében a β -CN egy csúcsban, míg heterozigóta egyedek esetén két egymás melletti csúcsban eluálódik. Elegytej mintákban retenciós idő alapján három fajta β -CN figyeltem meg, amely a β -CN három genetikai variánsát jelzi. A három megfigyelt β -CN allél retenciós ideje elúciós sorrendben a következő volt: β -CN ismeretlen variáns: $13,32 \pm 0,03$; β -CN A1: $13,79 \pm 0,04$; β -CN A2: $14,15 \pm 0,08$ perc. A β -CN A1 és A2 variánsok azonosítását genotipizált, igazolt β -CN A1 és β -CN A2 státuszú Holstein-fríz szarvasmarháktól származó egyedi tejminták retenciós ideje alapján, míg a legkisebb arányban előforduló β -CN variánst irodalmi adatok és (Givens et al., 2013; Dumpler, 2017) allélspecifikus polimeráz láncreakció (AS-PCR) módszerrel β -CN-B variánsként azonosítottam Mayer et al. (2021) módszere alapján.

A kazeinek után a három fő savófehérjefrakció három egyedi csúcsban, egymástól teljesen elkülönülve eluálódott az oszlopról. Elsőként az α -LA, $16,96 \pm 0,01$ perc, ezt követve a β -LGA genetikai variánsa, $17,56 \pm 0,01$ perc majd a β -LGB variánsa $18,41 \pm 0,05$ perc retenciós idővel.

Az optimált HPLC módszer alkalmas a fő fehérjefrakciók egyidejű, hatékony és gyors elválasztására, mindössze 20 perces elemzési idő alatt. Korábbi munkákhoz képest, amelyek a tejfehérje frakciók egyidejű

elemzéséről számoltak be, jelentős elemzési idő csökkenést jelent. Bobe et al., (1998) 52 perc, Bordin et al. (2001) 56 perc, Bonfatti et al., (2008), 40 perc és Ma et al. (2017) 30 perc elemzési időről számoltak be.

Az RP-HPLC módszer megfelelőségét a tejfehérjék elválasztására és mennyiségi meghatározására a vizsgált analitikai teljesítményjellemzőkkel, linearitás, specifitás, szelektivitás, torzítatlanság, ismételhetőség, reprodukálhatóság megfelelőségével igazoltam. Az RP-HPLC módszer alacsony kimutatási határral rendelkezik az egyes fehérjefrakciókra vonatkozóan ezáltal lehetővé téve mikroszűrt permeátum és retentátum minták fehérjeprofíljának meghatározását is.

3.2 Mikroszűrési kísérletek

A mikroszűrések során vett fázisminták fehérjeprofílját az optimált RP-HPLC határoztam meg. Az mikroszűrt permeátumokban az összes kazeinfrakció (κ -CN, α S1-CN, α S2-CN, β -CN) a kimutatási határ alatt volt. A tizenkét mikroszűrés során vett fázisminták fehérjeprofíljának vizsgálata során a permeátum mintákban sem a hideg, sem a meleg szűrési hőmérsékleten nem mutattam ki kazein frakciót, azok minden esetben az adott frakcióra meghatározott LOD érték alatt voltak. Hagyományos kémiai módszerrel (Kjeldahl-módszer) mérve azonban a permeátum minták néhány esetben tartalmaztak CN-frakciót, átlagosan 4-18 mg/100 g koncentrációban.

A három vizsgált savófehérje frakció mindegyike (α -LA, β -LG A, β -LG B) RP-HPLC módszerrel kimutatható volt a szűrés első fázisától kezdve (VR 20%) minden permeátum fázismintában és az minden esetben az egyes fehérje frakciókra vonatkozó LOQ érték felett volt.

Mivel a permeátumokban minden esetben számszerűsíthető eredményt kaptam az egyes fehérjefrakciók koncentrációjára vonatkozóan, az anyag és módszer fejezetben ismertetett módon az egyes mintavételi ponton meghatároztam a három savófehérjére frakció permeációját. Az elvégzett mikroszűrési kísérletek alapján és a mikroszűrt permeátum és retentátum minták elemzése után a következő következtetések vonhatók le:

A mikroszűrés során alkalmazott technológiai paraméterek befolyásolják a tejben lévő fő savófehérje frakciók permeációját.

A fehérjefrakcionáló mikroszűrés során a hideg szűrési hőmérsékleten megfigyelt permeáció értékekbeli különbségek, a β -LG A és β -LG B fehérjefrakciók esetében feltehetően strukturális különbségekre vezethető vissza.

A162 aminosavból álló β -LG A és β -LG B genetikai variánsa a 64. és 118 aminosavhelyen térnek el egymástól. Az aminosavcsere a fehérje negyedleges szerkezetében semleges pH-értéken (pH 6,7) nem okoz számottevő különbséget, mivel a két aminosavcsere egy rugalmas felületi hurokban és egy hidrofób magban történik (Sawyer & Kontopidis, 2000). Fiziológiás körülmények között a β -LG A és B főként nem-kovalens kötésű dimerek formájában jelenik meg. (McKenzie, 1967; Patrek et al., 2020), azonban a hőmérséklet és a kémhatás a β -LG konformációs változásait eredményezi.

A Tanford-átmenet, amely pH 7,51 vagy 40 °C feletti hőmérsékleten következik be (Tanford, et al., 1959), fokozott hidratációhoz és laza belső fehérjeszerkezethez vezet (Taulier & Chalikian, 2001). A β -LG ez esetben monomerként létezik. Ez utóbbi magyarázatként szolgálhat, hogy meleg meleg (45 °C) mikroszűrés során miért figyeltem meg magasabb β -LG A és β -LG B permeációt, mint hideg szűrési hőmérsékleten.

A β -LG A és β -LG B fehérjefrakció eltérő viselkedése a két fehérje fizikai-kémiai tulajdonságaira vezethető vissza. A mikroszűrési kísérletek során a β -LG B frakció esetében minden esetben magasabb permeációt figyeltem meg, mint a β -LG A esetében. Korábban már igazolták, hogy a β -LG A és B asszociációs és disszociációs tulajdonságai eltérőek (Cheison et al., 2011), valamint a β -LG A és β -LG B eltérő tulajdonságairól számoltak be (Dong et al., 1996; Oliveira et al., 2001; Dong et al., 2001) miszerint a β -LG A változat rugalmasabb fehérje, mint a β -LG B változata. Továbbá a β -LG B frakció ötször jobban oldódik, mint a β -LG A variánsa. Ez utóbbi azonban talán ellentmondásos eredmény, mivel az β -LG A variánsnak van egy plusz töltése a 64. aminosavhelyen lévő aminosav szubsztitúció miatt aszparaginsav (Asp) helyett egy glicin (Gly).

Az MF/DF retentátumokban hagyományos, Kjeldahl-módszerrel meghatározott CN/TPN% arány értékek összhangban állnak a HPLC-módszerrel mért eredményekkel, hiszen megállapítottam, hogy meleg szűrési hőmérsékleteken a tejben, legnagyobb arányban előforduló savófehérje frakció - β -LG - permeációja meleg szűrési hőmérsékleten szignifikánsan nagyobb ($p < 0,05$), ezáltal a CN/TPN% arány azonos technológiai paraméterekkel, de meleg szűrési hőmérsékleten előállított retentátumban magasabb lesz, mint a hideg mikroszűréssel előállított retentátumokban. Amennyiben a mikroszűrés célja a legnagyobb CN/TPN% arány elérése, hideg üzemenlési hőmérséklettel nagyobb membránfelületre van szükség a kívánt kapacitás eléréséhez.

A mikroszűrt retentátum minták CN/TPN% arányának meghatározásakor azonban nem támaszkodhatunk egyedüli mérési módszerként, sem a hagyományos Kjeldahl módszerre, sem az RP-HPLC módszerre.

A HPLC módszerrel mért kazeinfrakciók kazeinként és savófehérje frakciók savófehérjeként való értelmezése, ezáltal számszerű összevetése Kjeldahl-módszerrel meghatározott CN/TPN% arány eredményekkel ugyanis több szempontból is megkérdőjelezhető.

Ahogy azt már az első fejezetben ismertettem a tej hőkezelése 60 °C feletti hőmérsékleten a savófehérjék denaturációjához vezethet, mely a savófehérjék aggregációhoz és savófehérje-kazein komplexek eredményezi (Donato & Guyomarc'h, 2009; Wijayanti, Bansal, & Deeth, 2014). Ezáltal a Kjeldahl-analízis során – amely a nyers tej nitrogén frakciónak meghatározására szolgál – a retentátumban lévő kazein mennyiségének túlbecslését okozhatja (Lynch et al., 1998).

Az alapanyagként szolgáló tej szivattyúzása is részlegesen károsíthatja a savófehérjéket (Brodkorb et al., 2016), amely befolyásolja azok oldhatóságát 4,6-os pH-n a későbbi NCN-vizsgálat során, amely szintén CN/TPN% túlbecsléséhez vezet a Kjeldahl-módszerrel történő vizsgálat során (Subhir et al., 2022).

Az RP-HPLC módszerrel történő mérésnél pedig, az egyes fehérje frakciók mennyiségi meghatározásánál a kereskedelmi forgalomban lévő fehérje frakció standardok mindössze 70%-90% tisztaságúak, továbbá az RP-HPLC elemzés csak a natív állapotban lévő savófehérjék vizsgálatára szolgáltat megbízható mennyiségi meghatározást.

Vizsgálataim során a mikroszűrő berendezést Batch módon üzemeltettem. Korábbi üzemi tapasztalataim alapján kijelenthető, hogy a batch üzemelés mellett az összes savófehérjére vetítve kisebb permeáció érhető el, mint folyamatos üzemelés mellett.

Javaslatok

A továbbiakban érdemes lenne kiterjeszteni a mikroszűrési kísérletet folyamatos üzemeléssel történő mikroszűrésre és a mért fehérje frakciók permeációját összehasonlítani a batch üzemelésen kapott eredményekkel. Az így nyert információval tovább lehetne optimalizálni a szűrés során alkalmazott diafiltrációs víz mennyiségét.

4. ÖSSZEFOGLALÁS

A kutatásom első felében egy RP-HPLC-DAD módszert fejlesztettem, a tejben lévő fő fehérjefrakciók elválasztására és mennyiségi meghatározására. Az általam javasolt szabadalmi oltalom alatt álló optimált fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC-DAD) módszer alkalmas a fő tejfehérjefrakciók és azok genetikai variánsainak egyidejű, hatékony és gyors elválasztására, egyszerű mintaelőkészítési protokollal, mindössze 20 perces elemzési idővel.

Az RP-HPLC módszer megfelelőségét a tejfehérjék elválasztására és mennyiségi meghatározására a vizsgált analitikai teljesítményjellemzőkkel, linearitás, specifitás, szelektivitás, torzítatlanság, ismételhetőség, reprodukálhatóság megfelelőségével igazoltam. Az RP-HPLC módszer alacsony kimutatási határral rendelkezik az egyes fehérjefrakciókra vonatkozóan ezáltal lehetővé téve mikroszűrt permeátum és retentátum minták fehérjeprofíljának meghatározását is. Ezáltal lehetővé válik, hogy meghatározzuk, illetve optimalizáljuk az egyes fehérje frakciók elválasztásához/koncentrálásához szükséges technológiai paramétereket.

Kutatásom második felében főzött, pasztörözött tejből mikroszűrt permeátum- és retentátum mintákat állítottam elő hideg szűrési

hőmérsékleten (15 ± 1 °C) és hagyományos meleg szűrési hőmérsékleten (45 ± 1 °C) $0,2 \mu\text{m}$ és $0,5 \mu\text{m}$ névleges pórusátmérőjű membránokkal, majd vizsgáltam a minták fehérjeprofílját az általam optimált RP-HPLC-DAD módszerrel. Annak érdekében, hogy részletesebb képet kapjak arról, hogy a volumenredukció és a diafiltráció mértéke hogyan befolyásolja a mikroszűrés során az egyes fehérje frakciók permeációját, a szűrés öt pontjában permeátum- és retentátum fázismintákat vettem, majd vizsgáltam azok fehérje profilját és fizikai-kémiai paramétereit.

Kutatásommal rávilágítottam arra, hogy a fehérje frakcionáló mikroszűrés során a szűrési hőmérséklettel befolyásolható az egyes savófehérjerakciók permeációja, ezáltal a végtermék fehérjeprofílja.

Megállapítottam, hogy a mikroszűrés során a szűrési hőmérséklet nagyobb mértékben befolyásolja a β -LG A és β -LG B frakciók permeációját, mint az alkalmazott membrán pórusmérete. Az α -LA frakció esetében azonban sem a pórusméret sem a szűrési hőmérséklet nem befolyásolja a frakció mikroszűrő membránon való áthaladását az általunk alkalmazott technológiai paraméterekkel.

A kapott eredmények alapját adhatják új gyártástechnológia kidolgozásához, új funkcionális élelmiszerek fejlesztéséhez és ezért az ipar számára is hasznosítható tudást jelent.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Kidolgoztam és validáltam egy fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC-DAD) eljárást a tejben lévő fő fehérje frakciók (κ -CN, α s1-CN, α s2-CN, β -CN, β -LG, α -LA) egyidejű elválasztására és meghatározására.

2. Igazoltam, hogy a kidolgozott RP-HPLC-DAD módszer alkalmas a tejben lévő fehérjefrakciók genetikai variánsainak elválasztására (Szabadalmi oltalom alatt álló módszer: Eljárás tejben lévő fő fehérjefrakciók elválasztására HPLC segítségével P 21 00384.)
A mikroszűrési kísérletekkel és a mikroszűrt permeátum- és retentátum minták RP-HPLC elemzése alapján kapott fehérjeprofilok alapján megállapítottam, hogy 0,2 μm és 0,5 μm pórusméretű membrán mind 15 $^{\circ}\text{C}$, mind 45 $^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten, a fő kazeinfrakciókra szelektív; lehetővé teszi α -LA, β -LG A és β -LG B frakcióban gazdag és α -CN, κ -CN, β -CN frakcióban szegény permeátum előállítását, valamint α -CN, κ -CN, β -CN frakcióban dús retentátum előállítását.
3. Megállapítottam, hogy mikroszűrés során az α -LA, β -LG A és β -LG B fehérjefrakciókat 15 $^{\circ}\text{C}$ -os szűrési hőmérsékleten eltérő viselkedésmechanizmus jellemezi, mivel az egyes frakciók permeáció értékei eltérnek $p \leq 0,05$ szignifikancia szinten. Ugyanakkor a 45 $^{\circ}\text{C}$ -os szűrési hőmérsékleten a különbségek nem szignifikánsak ($p \leq 0,05$).
4. A mikroszűrési kísérletek sorozatával és RP-HPLC mérésekkel igazoltam, hogy az általam alkalmazott technológiai paraméterek esetében a szűrési hőmérséklet megválasztásával nem lehet szignifikánsan befolyásolni az α -LA fehérje frakciók permeációját fehérjefrakcionáló mikroszűrés során
5. Megállapítottam, hogy a az általam alkalmazott technológiai paraméterek mellett a szűrési hőmérséklettel befolyásolható a β -LG-A és β -LGB fehérje frakciók permeációja/retenciója.
6. Mikroszűrés során az α -LA frakcióra magasabb permeáció érték jellemző, mint a β -LG A és β -LG B fehérje frakcióra.

7. Mérésekkel (RP-HPLC-DAD, Kjeldahl módszer) igazoltam, hogy amennyiben a fehérje frakcionáló mikroszűrés célja a CN: WP arány legnagyobb arányú eltolása, abban az esetben a leghatékonyabb mikroszűrés paraméter a 0,5 µm pórusméret membrán alkalmazása meleg (45 °C) szűrés hőmérséklet mellett.

6. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

Értekezés alapjául szolgáló közlemények

Buzás, H., & Szafner, G. (2022). Eljárás tejben lévő fő fehérjefrakciók elválasztására HPLC segítségével. P 21 00384, Benyújtás éve 2021, Benyújtás országa: Magyarország. Buzás, Henrietta 60%; Szafner, Gábor 40%

Buzás, H., Székelyhidi, R., Szafner, G., Szabó, K., Süle, J., Bukovics, S., & Kovács, A. J. (2022). Developed rapid and simple RP-HPLC method for simultaneous separation and quantification of bovine milk protein fractions and their genetic variants. *Analytical biochemistry*, 658,114939. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114939>

Impakt faktor: 3,191 (Q3)

Hivatkozások száma: 5

Sík, B., **Buzás, H.** Kapcsándi V., Lakatos E., Daróczy F., Székelyhidi, R., (2023). Antioxidant and polyphenol content of different milk and dairy products. *Journal of King Saud University – Science*.

Impakt faktor: 3,8 (Q1)

Hivatkozások száma: 2

Tudományos közlemény, magyar nyelvű, lektorált folyóiratban:

Buzás, H., Szafner, G., & Kovács, A. J. (2021). A tehéntej fő kazein és savófehérje frakcióinak kvalitatív és kvantitatív meghatározásának lehetőségei elektroforetikus módszerekkel és nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával. *Acta agronomica óvariensis* 62(1).

Értekezés témakörében megjelent közlemények

Buzás, H., Szabó-Sárvári L. Cs., Szabó, K., Süle, J., Bukovics, S., & Szafner, G., Kovács, A. J. (2023). Aflatoxin M1 detection in raw milk and drinking milk in Hungary by ELISA – A one-year survey. *Journal of food composition and analysis*. 121, 105368.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105368>

Impakt faktor: 4,52 (Q1)

Hivatkozások száma: 5

Szabó-Sárvári, L. Cs, Tempfli K., **Buzás, H.**, Mészáros Zs., L, Gulyás (2023). Beta-Casein Genotyping in Dairy Cow Herds in Győr-Moson-Sopron County. *Chemical Engineering Transactions*. 107 pp. 451-456.

Impakt faktor: 0,254 (Q3)

Hivatkozások száma: -

Turbók, J., Tornyos, G., Kocsis, R., Süle, J., Tóth, T., **Buzás, H.**, Szafner, G; Ács, V., Zomborszky, Z., (2022). Cytological and microbiological examination of bovine milk in Prototheca-infected dairy herd. *Acta Agraria Kaposvariensis* 26, 87-104.

Süle, J.; Varga, L.; Varga, K.; Hatvan, Z.; Szafner, G.; **Buzás, H.**; Kerényi, Z. (2022). Probiotikus baktériumtörzsek szelektálására alkalmas kísérleti rendszer egyes elemeinek kidolgozása *Acta agronomica óvariensis* 63 (2)