

SZAKDOLGOZAT

Bóday Ábel Barnabás

2024



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Budai Campus
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Biomérnök alapképzési szak

**A pH stat módszer alkalmazása lipáz enzim aktivitásának
meghatározására és bioaktívok hatásának vizsgálatára**

Belső konzulens: Dr. Tormási Judit
egyetemi adjunktus

**Belső konzulens
intézete/tanszéke:** ÉTTI, ÉKAT

Készítette: Bóday Ábel Barnabás

MATE Budai Campus
2024

Tartalomjegyzék

1 Bevezetés és célkitűzések.....	3
1.1 Bevezetés.....	3
1.2 Célkitűzés.....	3
2 Szakirodalmi áttekintés	5
2.1 Lipidek.....	5
2.1.1 Lipidekről általánosságban.....	5
2.1.2 Lipidek szerkezete	5
2.1.3 Lipidek jelentősége az élettanban.....	6
2.1.4 Lipidek emésztése	6
2.1.5 Lipáz enzimek jellemzése és szerkezete.....	7
2.2 Tanninok	10
2.2.1 Tanninokról általánosságban	10
2.2.2 Tanninok szerkezete	11
2.2.3 Tanninok jelentősége az élettanban	12
2.2.4 Tanninok kölcsönhatása különböző makronutriensekkel és enzimekkel.....	13
2.3 Almatörköly kivonatok jellemzése.....	14
2.4 pH stat módszer jelentősége és alkalmazása.....	14
2.5 INFOGEST módszer	16
2.6 Emulzió jelentősége a pH stat mérésben.....	16
3 A vizsgálatok módszerei.....	18
3.1 A pH stat méréshez szükséges anyagok és oldatok	18
3.1.1 Puffer hatású közegoldat hasnyálmirigy-lipáz enzim aktivitásának vizsgálathoz	18
3.1.2 Puffer hatású közegoldat gyomor-lipáz enzim aktivitásának vizsgálathoz	18
3.1.3 Hasnyálmirigy-lipáz enzimkeverék.....	18
3.1.4 Gyomor-Lipáz enzimkeverék	19
3.2 Gátlószerek	19
3.2.1 Tannin inhibitor törzsoldatok	19
3.2.2 Almatörköly kivonatok	19
3.3 pH stat mérés.....	20
3.3.1 A pH stat mérés szoftveres előkészítése.....	21
3.3.2 PL enzim aktivitásának mérési módszere.....	21

3.3.3 RGE enzimhez készített módszer.....	23
3.4 pH stat mérés végrehajtása enzimaktivitás meghatározásához.....	25
3.5 pH stat mérés alkalmazása enzim inhibíciós tesztek esetén	26
3.6 Statisztika.....	27
4 Eredmények és értékelésük	28
4.1 Referencia specifikus aktivitások meghatározása.....	28
4.2 PL gátlás eredmények	30
4.2.1 PL gátlás vizsgálat kondenzált tanninkivonattal (Q)	31
4.2.2 PL gátlás vizsgálat ellagitannin kivonattal (C).....	31
4.2.3 PL gátlás vizsgálat gallotannin kivonattal (T).....	32
4.2.4 PL gátlás vizsgálat almatörköly kivonatokkal	33
4.2.5 PL gátlás vizsgálat kondenzált tannin kivonattal (Q) módosított pH értéken	34
4.3 RGE gátlás eredmények	36
4.3.1 RGE gátlás vizsgálat kondenzált tanninkivonattal (Q)	36
4.3.2 RGE gátlás vizsgálat ellagitannin kivonattal (C)	36
4.3.3 RGE gátlás vizsgálat gallotannin kivonattal (T).....	37
4.3.4 RGE gátlás vizsgálat almatörköly kivonatokkal.....	38
4.3.5 RGE gátlás vizsgálat kondenzált tannin kivonattal (Q) módosított pH értéken.....	39
4.4 Enzimaktivitás modulációja bioaktívok hatására.....	39
5 Következtetések és javaslatok.....	41
6 Összefoglalás	43
7 Irodalomjegyzék	44
8 Táblázatok és ábrák jegyzéke	47

1 Bevezetés és célkitűzések

1.1 Bevezetés

A lipidek fontos vegyületei az emberi szervezetnek, különösen az anyagcsere folyamatokban és a sejtmembránok szerkezetében betöltött funkciójuk miatt jelentősek. Az étkezési zsiradékok az esszenciális zsírsavak fontos forrásai, amelyek nélkülözhetetlenek a sejtek normális működéséhez és a bioaktív molekulák szintéziséhez. Élelmezési szempontjából a lipidek egyik legfontosabb típusa a triacilgliceridek (TAG), amelyek energiaforrásként is szolgálnak.

A TAG-ek az emésztési folyamat során monoacilgliceridekké és szabad zsírsavakká alakulnak, mely hidrolízist a lipáz enzimek végzik. A gyomorban a gyomor-lipáz kezdi meg az emésztést, majd a hasnyálmirigy-lipáz folytatja a vékonybélben. Ezek az enzimek kritikus szerepet játszanak a táplálkozási zsírok lebontásában, amelyek nélkülözhetetlenek a szervezet energiaellátásához és egyéb létfontosságú biológiai funkciókhoz. A zsíremésztési folyamatok vizsgálata fontos az egészségügyi kutatásokban, mivel összefüggésbe hozhatók bizonyos betegségekkel, mint például az elhízás és a 2-es típusú cukorbetegség. Az olyan vegyületek, amelyek képesek gátolni a lipázok aktivitását, potenciálisan felhasználhatók ezen betegségek kezelésére vagy megelőzésére.

Ezen enzimgátlás vizsgálatában jelentős figyelmet kapnak a tanninok, amelyek természetes növényi polifenolok, és ismert antioxidáns és enzimatis gátló tulajdonságaik miatt számos kutatás középpontjában állnak. A tanninok képesek kölcsönhatásba lépni különböző fehérjékkel és enzimekkel, modulálva azok aktivitását, így befolyásolhatják az emésztési folyamatokat. A tanninok különböző típusainak enzimmodulációja kerül vizsgálatra, mint a kondenzált, gallotanninok és ellagitanninok. Ezen túlmenően az almatörköly, amely jelentős mennyiségben tartalmaz polifenolokat, különösen tanninokat, szintén a vizsgálat tárgyát képezi, mint potenciális lipáz gátló anyag.

1.2 Célkitűzés

A dolgozatom célja, hogy implementáljam a pH stat módszert és ennek segítségével határozzam meg a gyomor- és a vékonybél lipáz enzimeinek aktivitását. A mérés alapját képezi az INFOGEST-ből Grundy és mtsai. 2021 által implementált pH stat vizsgálati protokoll.

A módszerfejlesztés során fontos paraméterek meghatározását is elvégzem, majd annak érdekében, hogy egy megbízható, reprodukálható, pontos és precíz mérési módszert hozzak

létre. Összevetem több beállított enzimkoncentráció egymáshoz viszonyított viselkedését és meghatározom az adott enzim abszolút aktivitását.

Emellett célom a módszer tesztelés és alkalmazás enzim gátlási reakciók kivitelezésével. Így tehát megvizsgálom öt különálló bioaktív kivonat (gallotannin, ellagitannin, kondenzált tannin, vizes és acetonos almatörkölykivonat) hatását a gyomor- és hasnyálmirigy-lipáz enzimek aktivitására.

2 Szakirodalmi áttekintés

2.1 Lipidek

2.1.1 Lipidekről általánosságban

Az étrendi lipidek közé tartoznak a triacilgliceridek, a foszfatidil-kolin és a koleszterin. A zsírok, a fehérjékkel, szénhidrátokkal és alkoholokkal együtt a szervezet egyik fő energiaforrása. A zsírsavak a szervezet számos más létfontosságú folyamatában is részt vesznek, mint például a sejtmembránok szerkezeti összetevői, bioaktív molekulák prekursorai, enzimaktivitások szabályozói, a génexpresszió szabályozása. A zsír fontos energiaforrás, és megkönnyíti a zsírban oldódó étrendi összetevők, például a vitaminok (A-, D-, E- és K-vitamin) felszívódását. A zsírok és olajok az esszenciális zsírsavak fontos forrásai (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA) 2010; European Food Safety Authority (EFSA) 2017).

2.1.2 Lipidek szerkezete

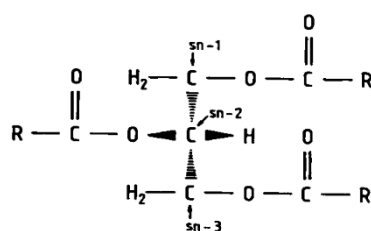
A kémiai összetétel szempontjából az étkezési lipidek általában triacilgliceridek (TAG) (1. Ábra). Ezen vegyületek három szénatomos glicerinből állnak, amihez három zsírsavmolekula kapcsolódik észter-kötésekkel. A glicerin szénatomjai sztereospecifikus (sn)³ számozásúak, vagyis a zsírsavak helyzetét sn-1, sn-2 és sn-3 jelöléssel szokták megadni a TAG-szerkezetben. A táplálékban leggyakrabban előforduló zsírsavak páros számúak, 8 és 22 közötti szénatomjuk van, 0-6 kettős kötéssel (Innis 2011). A zsírsavakat a lánc hossz alapján osztályozzuk hosszú láncúakra (12 szénatomnál több), közepes láncúakra (6-12 szénatom) és rövid láncúakra (kevesebb, mint 6 szénatom) (Acevedo-Fani és Singh 2022).

A zsírsavakat lehet telítettségük függvényében is osztályozni. Vannak telített és telítetlen zsírsavak. A telítetlen zsírsavakat tovább lehet osztani. Amennyiben a telítetlenség mértéke egy kettős kötés, egyszeresen telítetlen zsírsavaknak, illetve kettő vagy több kettős kötés esetében többszörösen telítetlen zsírsavaknak nevezzük őket. A zsírsavak szerkezetének további bonyolultsága a kettős kötések helyzetéből és a kettős kötések *cisz*- vagy *transz*orientációjából adódhat. A kettős kötések száma, helyzete és orientációja görbítheti a zsírsavláncot, így

megváltoztathatja a lipidmembránokban való elhelyezkedését és módosíthatja biofizikai tulajdonságait, például az olvadási hőmérsékletét (Burdge és Calder 2015).

A lipidek másik fő csoportját a foszfolipidek alkotják, amelyek a sejtmembránok alapvető alkotóelemei, és egy vagy több foszfátcsoportot tartalmaznak. További összetett lipidek közé tartoznak a szterolok és glikolipidek, amelyek zsírsavakat, szfingozinokat és szénhidrátokat is tartalmaznak.

Ábra 1 Triglicerid molekula általános felépítése (forrás: Stymne és Stobart 1987)



2.1.3 Lipidek jelentősége az életben

A lipidek részt vesznek az idegrendszer fejlődésében, az idegsejtek differenciálódásában és migrációjában. A lipidek az agyban minden neuronális membránban jelen vannak, és létfontosságúak a szinaptogenezishez (Hussain és mtsai. 2019).

A normál étrendben a lipidek az összes kalória 20-40%-át teszik ki, és olyan esszenciális zsírsavak forrását jelentik, mint a linolsav és az α -linolénsav, amelyeket az emberi szervezet nem szintetizál. Ezenkívül a lipidek, a bioaktív molekulák, például a hidrofób polifenolok hordozói. A lipidek a sejtmembránok szerkezeti összetevői is, részt vesznek a sejtek jelátviteli útvonalaiban és a szteroid hormonok előanyagai (Acevedo-Fani és Singh 2022).

2.1.4 Lipidek emésztése

A táplálékban található zsírok többsége TAG-ből áll, amelyek különféle hosszú láncú, telített és telítetlen zsírsavakat tartalmaznak, kisebb arányban pedig rövid és közepes láncú zsírsavak is jelen vannak. A TAG-ok ép formában nem képesek közvetlenül bejutni az enterocitákba. A felszívódás előtt a TAG-ok emulgeálódnak, majd monoacilglicerinné és szabad zsírsavakká hidrolizálódnak. Az emésztés folyamata bonyolult, a nyelv, a gyomor, a belek, az epehólyag és a hasnyálmirigy összehangolt működését igényli. A teljes zsíremésztési és felszívódási

folyamat általában 16-24 órát vesz igénybe. A táplálékkal bevitt zsírokat a gyomorban a gyomor-lipáz emésztí elő, ezt követően a vékonybélben a hasnyálmirigy-lipáz végzi el a végső hidrolízist.

A gyomor előemésztése fontos szerepet játszik, nem csupán a gyomor-lipázzal, hanem főleg a mechanikus mozgatással, ami elősegíti az olaj-víz emulziók kialakulását, melyeket foszfolipidek stabilizálnak amfipatikus micella képző tulajdonságuk miatt. Ezen emulgeálás csökkenti a zsírmolekulák közötti vonzást, így azok szélesebb felületen terjednek szét, növelve a TAG-okat később véglegesen hidrolizáló hasnyálmirigy-lipázok hatékonyságát. A zsíremésztés elsődleges helye a vékonybél, mivel a hasnyálmirigy a legjelentősebb lipáz enzim termelő szerv.

A gyomor előemésztése után, az emulgeált TAG-ok a nyombélbe kerülnek, ahol serkentik az epehólyag összehúzódását és az epe, valamint a hasnyál kiválasztását. A TAG-ok hidrolíziséhez epesavak kapcsolódnak a molekulákhoz. A hasnyálmirigyben termelt kolipáz, ennek okán képes kapcsolódní a komplexhez. A nyombélbe érkező zsír 80%-ban emésztetlen trigliceridekből áll, a fennmaradó rész részben emésztett hidrolízistermékek. A hasnyál lipázai, diacilglicerinekké, 2-monoacilglicerinné és szabad zsírsavakká bontja a TAG-okat. A hidrolízis sebessége nagymértékben függ a TAG-ok zsírsavainak molekuláris szerkezetétől, mivel minél hosszabb a zsírsav oldallánc, annál lassabb a hidrolízis (Ratnayake és Galli 2009). Az epesavak fontos szerepet játszanak a lipolízis során keletkező termékek micelláris oldásában is. Az emulgeálódási és micellaképzési folyamatok nélkül a zsírban oldódó tápanyagok, például a zsírsavak felszívódása jelentősen csökkenne (Hofmann 1963).

2.1.5 Lipáz enzimek jellemzése és szerkezete

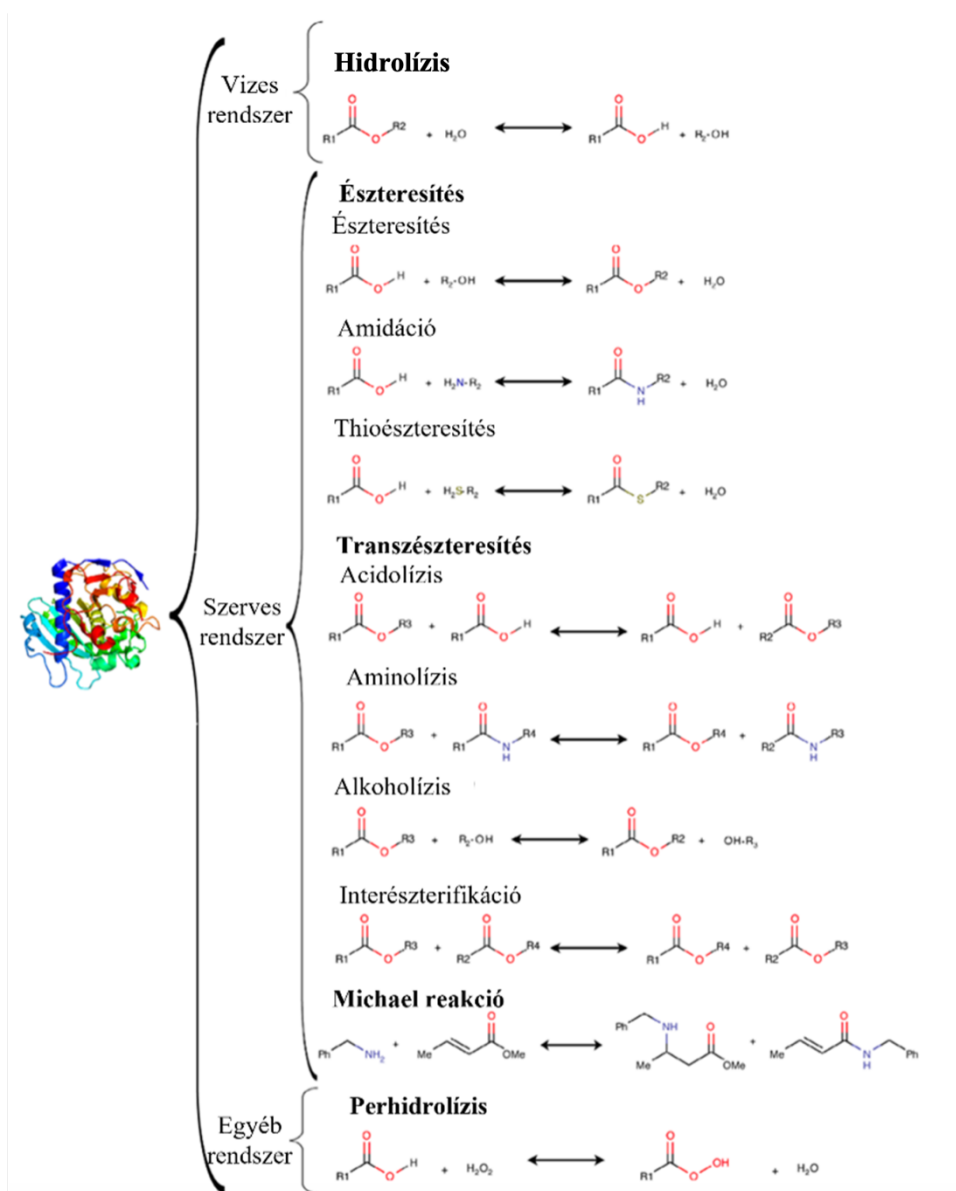
A lipázok (E.C. 3.1.1.1.3) olyan enzimek, amelyek elsődleges funkciója az acil-gliceridek hidrolízise (1. Képlet). Számos más típusú vegyület is lehet szubsztrát, például a kis- és nagymolekulájú észterek, tiolészterek, amidok, és a poliol/polisavészterek. A lipázok nemcsak hidrolízisre képesek, hanem katalizálnak szintézist is (3. Ábra), ami tovább növeli a felhasználhatóságukat (Gandhi 1997).

Képlet 1 Lipázok katalizálta hidrolízis: zsír/észter szétválasztása savra és glicerinné/alkoholra víz jelenlétében (forrás: saját készítés)



A lipázok által katalizált természetes reakció a tri-, di- és monogliceridekben található észterkötés hidrolízise, ami szabad zsírsavakat és glicerint eredményez. A lipázok egyik legfontosabb jellemzője azonban az, hogy a szubsztrátok széles skálájának reakcióit katalizálják (2. Ábra). A lipázok vizes közegben alapvetően hidrolizálnak, de különböző reakcióközeg esetén ez a katalitikus útvonal megváltozik, és elbillen más reakciók felé, mint például többek között az észter képződés, vagy a perhidrolízis. Szerves közegek növelik a hidrofób szubsztrátok oldhatóságát, javítja az enzim termostabilitását, és a termodinamikai egyensúlyt a hidrolízis irányából a szintézis felé tolják el (Castillo, Casas-Godoy, és Sandoval 2016).

Ábra 2 Lipáz enzimek által katalizált reakciók (forrás: Castillo, Casas-Godoy, és Sandoval 2016)



Az emberi hasnyálmirigy-lipáz (triacilglicerin-acil-hidroláz EC3.1.1.1.3) a karboxilészterázal rokon lipáz szupercsalád legszélesebb körben vizsgált tagja. Főleg a hasnyálmirigy választja ki, és erősen preferálja a triacilglicerideket a koleszterin-észterekkel, foszfolipidekkel és galaktolipidekkel szemben.

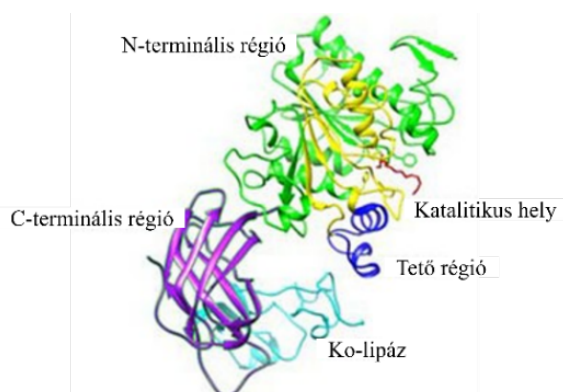
A hasnyálmirigy-lipáz (3. Ábra) egy glikoprotein, amely 449 aminosavból áll, molekulatömege 46000 Da. A fehérje N-terminális részén egy rövid, 16 aminosavból álló peptidlánc helyezkedik el. A terciér szerkezet alapján az enzimnek két területe van: egy globuláris N-terminális domén, amelynek központjában egy β -redő mag áll, és egy C-terminális, β -redőkből álló régió. Ezt a két domént egy rövid aminosav-nyúlvány választja el, amelyet hét diszulfidkötés tart fenn. Az EHL komplexként van jelen, kofaktorával, a kolipázzal, amely a C-terminális doménhez kapcsolódik (Kumar és Chauhan 2021).

Az enzim először kötődik a szubsztráthoz, így Michaelis-Menten adszorpciós komplexet képez. A negatív töltésű Asp- vagy Glu-reziduum kölcsönhatása lehetővé teszi, hogy a His-maradék általános bázisként viselkedjen, amely képes egy protont eltávolítani az aktív hely Ser hidroxil-csoportjáról, tehát a Ser hidroxil-maradékának nukleofilitása fokozódik, és megtámadja az acilglicerin karbonil-csoportját, egy acil-enzim intermediert képezve, amit a köztitermék stabilizál. Ezután egy kovalens acil-enzim keletkezik, amely később deacilálódik.

A deacilációs lépést a határfelületen jelen lévő molekulák nukleofil viselkedése irányítja. Ebben a folyamatban egy nukleofil komponens (pl. H_2O) megtámadja az acilált enzimet, ami a termék (hosszú láncú zsírsav) felszabadulásához és a katalitikus hely regenerálódásához vezet (Chapus és mtsai. 1976; Mendes, Oliveira, és de Castro 2012).

A zsíremésztéshez a gyomor-lipázra (4. Ábra) is szükség van, amely az erősen savas gyomorkörnyezet ellenére is stabil és aktív, valamint a TAG emésztés 10-30%-ért felelős. Ezen a globuláris enzim egy magdoménből és egy tetődoménből áll. A katalitikus hely (Ser-153) egy 30 aminosavból álló szegmens alatt van, amely „fedőként” viselkedik és a tetődoménhez tartozik (Roussel és mtsai. 1999).

Ábra 3 A hasnyálmirigy-lipáz szerkezete: Zöld szín az N-terminális domén, sárga szín a katalitikus hely, lila szín a C-terminális domén, türkiz szín a ko-lipáz, kék szín a tető domén és vörös szín katalitikus hely (forrás: Kumar és Chauhan 2021)



Ábra 4 A gyomor-lipáz szerkezete: magenta színű az α/β hidroláz magdomén tetején lévő tetődomén; zöld színű a katalitikus helyet takaró feltételezett fedél; piros színű az α/β hidroláz redő; kék színűek a szálak; sárga színűek a fordulatok és a random tekercek (forrás: Roussel és mtsai. 1999)



2.2 Tanninok

2.2.1 Tanninokról általánosságban

A tanninok olyan polifenolok, amelyeket olykor növényi polifenoloknak is neveznek. Eredetileg a tannin elnevezést az összehúzó hatással (asztringencia) rendelkező növényi kivonatoknak adták, kémiai háttérismeretek nélkül. A tanninokat főbb megkülönböztető jegyei egyéb növényi polifenoloktól a jellegzetes tulajdonságai: kötődés fehérjékhez, bázikus vegyületekhez, pigmentekhez, nagymolekulájú vegyületekhez és fémionokhoz, valamint antioxidáns hatás (Okuda és Ito 2011).

A tanninok főleg a fák növekedési területein, valamint a kéreg és az epidermisz közötti rétegben találhatóak. Gyakran előfordul, hogy a tanninok termelése a növény valamilyen betegségének okán fokozódik, ezért feltételezhető, hogy a tanninoknak biológiai szerepe van a mikrobiális fertőzés, rovarok vagy állatok rongálása elleni védelemben. A kondenzált tanninokat a növény a tannoszómákba szintetizálja és tárolja, amelyek a vakuólumok tonoplasztjai zárnak el, így nem zavarják a növényi anyagcserét, és nem lépnek kölcsönhatásba a fehérjékkel. Csak abban az esetben érvényesülnek, amikor a sejtek sérülnek és elhalnak (Sieniawska és Baj 2017).

A tanninok világszerte megtalálhatók a magasabb rendű növények számos családjában, például a gesztenye- és tölgyfában és különféle növényi gubacsokban. Eredetüktől függően kémiai összetételük eltérő, és a hidrolitikus kezeléssel történő vizsgálatok alapján két fő csoportba sorolhatók. Az egyik a hidrolizálható tanninok, mint a gallotanninok és ellagitanninok, amelyek alkotóelemeikre bonthatók. A másik csoportot a nem hidrolizálható oligo- és polimer proantocianidinek alkotják, amelyeket kondenzált tanninokként ismerünk. Vannak olyan komplex tanninok is, amiket eredetileg a „nem osztályozott tanninok” közé soroltak, mivel csak részben hidrolizálhatók, a katechin egység és a glikozidos rész C-C kapcsolódása miatt. A későbbiekben, bevezették a „komplex tanninok” és a „flavanoellagitanninok” fogalmát.

A tanninok egyszerű kettéosztása hidrolizálható és nem hidrolizálható (kondenzált) tanninokra nem tükrözi megfelelően a szerkezeti sokféleségüket. A szakirodalomban olykor megjelenő „flavanotanninok” vagy „kondenzált flavonoid cserzőanyagok” kifejezések a katechin egységekből álló tanninokra utalnak. A polimer flavanotanninok a kondenzált tanninok közé tartoznak. Szerkezeti sajátosságaik alapján a tanninokat négy nagy csoportra lehet osztani: gallotanninok, ellagitanninok, komplex tanninok és kondenzált tanninok (Karamali Khanbabaee 2001a).

2.2.2 Tanninok szerkezete

A tanninok felosztása elkülöníthető négy szegmensre kémiai sajátosságuk alapján (2. Ábra) (Karamali Khanbabaee 2001b):

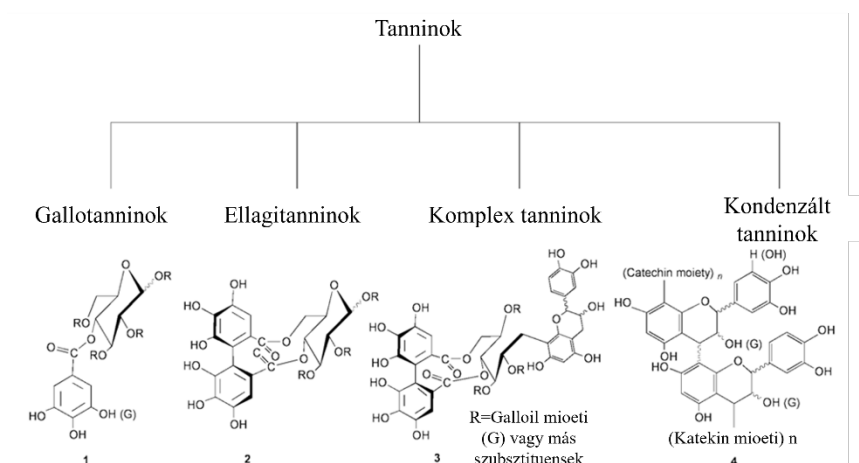
(1) A gallotanninok olyan tanninok, amelyekben a galloil-egységek vagy azok meta-depszid származékai különböző poliolokhoz kapcsolódnak, és ezekhez katechin- vagy triterpenoid egységek is kötődhetnek.

(2) Az ellagitanninok olyan tanninok, amelyekben legalább két galloil-egység C-C-kapcsolattal kötődik egymáshoz, és nem tartalmaznak glikozidosan kapcsolt katechin egységet.

(3) A komplex tanninok azok a tanninok, amelyekben egy katechin egység glikozidosan kapcsolódik egy gallotannin vagy ellagitannin egységhez.

(4) A kondenzált tanninok olyan oligomerek és polimerek (proantocianidinek), amelyek úgy alakulnak ki, hogy az egyik katechin C-4-es kötése kapcsolódik a következő monomer katechin C-8-asához vagy C-6-osához.

Ábra 5 Tanninok csoportosítása (forrás: Karamali Khanbabaee 2001b)



2.2.3 Tanninok jelentősége az ételtanban

A tanninok számos farmakológiai hatással rendelkeznek, beleértve az antioxidáns és szabadgyök-fogó tulajdonságokat, valamint az antimikrobális, rákellenes, és szívvédő hatásokat. Ezen felül jótékony hatást gyakorolhatnak az anyagcserezavarokra, és segíthetnek megelőzni számos oxidatív stresszel összefüggő betegség kialakulását. Eddig több mint 1000 származékot azonosítottak, és ezen komponensek kutatása jelentős széleskörű felhasználási lehetőségeik és a biológiai folyamatokra gyakorolt hatásuk miatt. Ezek a vegyületek a teában, borban, gabonafélékben, kakaóban és gyümölcsökben akár 184 mg/100 g mennyiségben is megtalálhatók (Smeriglio és mtsai. 2017).

Fenolos tannin vegyületek kivonatával végzett kísérletek kedvező hatást mutattak gyomorfekély ellen. Továbbá számos gyógynövény gyomorfekély elleni hatása magyarázható a tanninok jelenlétével (De Jesus és mtsai. 2012).

2.2.4 Tanninok kölcsönhatása különböző makronutriensekkel és enzimekkel

A tanninok fehérjékkel való komplexképződési képessége egyedülálló tulajdonságuk, amelyet már az ókorban is kihasználtak (állati bőrök cserzése). A tanninok és a fehérjék közötti reakció két szakaszból áll: kötődés és aggregáció, ami csapadék képződéséhez vezet. A tannin-fehérje komplexekkel kapcsolatos korábbi kutatások nem-kovalens kötések és oldhatatlan csapadékokat taglalnak, az újabb tanulmányok kovalens kötések és oldható komplexeket is említene (Hagerman 2012; Adamczyk, Simon, és mtsai. 2017).

Mivel az enzimek fehérjékből állnak, a tanninok az enzimekkel alkotott komplexek képződése révén csökkentik az enzimek aktivitását. Egyes tanulmányok csak csekély mértékű aktivitáscsökkenést tapasztaltak. Ezen kívül az enzimaktivitás tanninok általi potenciális fokozását évtizedekig figyelmen kívül hagyták, csupán néhány kivételtől eltekintve. Ezek nyomán a tanninok gátló szerepéről szerzett ismereteink még mindig korlátozottak (Adamczyk, Simon, és mtsai. 2017).

A tanninok képesek reagálni különböző szerves N-vegyületekkel, nitrogénbázisokkal, poliaminokkal, kitinnel és kitozánnal. A tanninok és a fehérjék közötti reakciókhoz hasonlóan az oldat koncentrációja, kémiai szerkezete és pH-ja is döntő szerepet játszik ezekben a kölcsönhatásokban (Adamczyk és mtsai. 2011).

A tanninok gátló hatása kiterjed a lipázokra, különösen a hasnyálmirigy-lipázra, amelynek inhibíciója az egyik legkutatottabb ebben a témában. Például az *Acacia mearnsii* kéregéből származó polifenolok is képesek gátolni a hasnyálmirigy-lipáz működését. (Oliveira és mtsai. 2015).

Különböző polifenolokat tartalmazó természetes termékek elhízás és cukorbetegség ellenes hatásúak, a lipáz és az α -glükózidáz aktivitás gátlása révén. Az akác polifenolokat elhízás elleni hatása többek között a zsírsavszintézis és a zsírfelvétel csökkenésének tulajdonítható (Ikarashi és mtsai. 2011).

2.3 Almatörköly kivonatok jellemzése

Az almatörköly magas nedvességtartalmú, szilárd biomassza maradvány, amelyet az alma gyümölcsének gyümölcslé, almabor készítése céljából történő feldolgozása során melléktermékként nyernek (Bhushan és mtsai. 2008). Hagyományosan szarvasmarhatakarmányként használják, a nedves törköly gyors romlása miatt csak egy töredékét használják fel. Gazdag szénhidrát-, pektin-, nyers rost- és ásványi anyagokban (Shalini és Gupta 2010).

Magas szénhidráttartalma miatt az almatörkölyt számos mikrobiális folyamatban használják szubsztrátként szerves savak, enzimek, fehérjék, etanol, alacsony alkohol tartalmú italok és pigmentek előállítására. Az almatörkölyből egyre több élelmi rostot, fehérjét, természetes antioxidánsokat, biopolimereket, pigmenteket és egyedi tulajdonságokkal rendelkező vegyületeket nyernek ki (Bhushan és mtsai. 2008).

Az almatörköly igazoltan tartalmaz polifenolos vegyületeket, köztük tanninokat. Ezen tanninok jelenléte a törkölyben hasonló koncentrációban van jelen, mint magában a gyümölcsben, a törköly vizes kivonata már csak tized annyira számottevő (Krasnova és Seglina 2019). A tanninok jelenléte az almatörköly kivonatba potenciálisan befolyásolhatja a lipáz enzimek aktivitását. Ezt a feltételezés is részét képezi a dolgozat témájának.

2.4 pH stat módszer jelentősége és alkalmazása

A pH-stat berendezés fő komponensei egy bioreaktor, ahol a biomasszát állandó hőmérsékleten és pH értéken lehet tartani és állandó keverési sebességgel lehet kevertetni, valamint egy pH-mérőből és egy titrálást vezérlő egységből áll. A pH értékre adott jelválasznak megfelelően egy vezérlőegység mérőoldatot adagol, hogy a pH-t egy előre beállított értéken tartsa folyamatosan. A pH stat berendezés egy olyan reaktor, amelynek van betáplálása, de nincs kiáramlása (Ficara, Rozzi, és Cortelezzi 2003).

A pH stat egy sokoldalú módszer, amit több területen alkalmaznak, mint például a kelatometrában (Maccà, Soldà, és Zancato 2002), a fémion katalízis vizsgálatában (Pantel 1979) és különböző enzimek aktivitásának megfigyelésére, többek között proteázok (Alkanhal, Frank, és Christen 1985), és lipázok (Grundy és mtsai. 2021) mérésére.

Ez a dolgozat a lipázok aktivitását vizsgálja, ami fontos az emulgeált lipidek emészthetőségének megértésében. Ez a vizsgálat fontos az emberi gyomor-bél traktusban lejátszódó metabolikus folyamatok megértésében. Az így szerzett mérési eredményeket felhasználva el lehet juttatni az emésztőrendszeren belül meghatározott helyekre

gyógyszerhatóanyagokat (Li és mtsai. 2011), és bioaktív élelmiszer-összetevőket (McClements, Decker, és Weiss 2007). Jelentős az érdeklődés a lipidek emésztését és felszívódását befolyásoló főbb jellemzők meghatározására. A lipidemésztés *in vitro* karakterizálására egyre gyakrabban alkalmazott analitikai módszer a pH stat módszer (Li, Hu, és McClements 2011).

A lipáz enzimek aktivitása hatékonyan mérhető a reakció teljes időtartama alatt a szubsztrátból felszabaduló szabad zsírsavak állandó pH értéken tartott titrálásával. A pH stat módszer alkalmasnak bizonyult az enzimkinetika tanulmányozására és az enzimreakció során az aktivátorok vagy inhibitorok hatásának vizsgálatára is (Chung és Scanu, 1974).

Már 2011-ben megfogalmazódott az igény, hogy az *in vitro* emésztési modelleket, többek közt a pH stat módszert szabványosított vizsgálati feltételekkel lehessen végezni, annak érdekében hogy könnyen összehasonlíthatók legyenek különböző kutatási eredmények az emésztés vizsgálatának témájában (Didier Dupont és mtsai. 2011).

Az INFOGEST módszerben leírtak meghatározzák a lipáz vizsgálati paramétereit és azon alapvető eszközöket (standard laboratóriumi centrifuga, standard laboratóriumi vortex, szabványos laboratóriumi pH mérő, élelmiszeripari rendszerekhez tervezett pH elektród, rázópad, inkubátor, elektromos vagy kézi daráló, Eppendorf csövek, műanyag centrifugacsövek, pipetták és hegyek, mérőlombikok, főzőpoharak), amik nélkülözhetetlenek a méréshez (Brodkorb és mtsai. 2019). Ezen megkötés az egyszerűség és a költséghatékonyság jegyében született, aminek hátránya, hogy ezen eszközök laboratóriumról laboratóriumra változhatnak. Az ilyen módon mért eredmények noha összehasonlíthatóak lesznek, nagy szórással értelmezhetőek (Grundy és mtsai. 2021), ami esetleg egy olyan inhibitor vizsgálatára, ami csak csekély mértékben befolyásolja az enzimaktivitást kevésbé alkalmas.

A folyadékbevitel és a végpont meghatározása a titrálás során problémás lehet, ami a módszer pontosságával és precizitásával kapcsolatos problémákhoz vezethet. Készült a probléma leküzdésére olyan eszköz, ami képes potenciometrikus titrálást végezni. Ezen berendezés alkatrészei egy Raspberry Pi, egy léptetőmotoros fecskendőszivattyú és egy kereskedelmi forgalomban kapható pH érzékelő és egy alaplap voltak (Boppana és mtsai. 2023). Ezen berendezés, noha már automatizált formában volt képes végezni a mérést, összeállítása önmagában hordozhat nehézségeket.

Ezen dolgozat pH stat mérésének vizsgálatára egy erre a módszerre kifejlesztett, kereskedelmi forgalomban kapható Metrohm 902 Titrando titrátor berendezést használtam, az emberi hiba tényező minimalizálásának céljából.

2.5 INFOGEST módszer

Az élelmiszerek vizsgálatára általánosan használt *in vitro* emésztési módszereknek több típusa létezik; ezek statikus és dinamikus módszerekre oszthatók. Ezek a modellek a felső tápcsatorna fiziológiai körülményeinek, nevezetesen a szájüreg, a gyomor és a vékonybél fázisainak a szimulációját végzik. A legtöbb dinamikus modell alkalmasnak bizonyult az élelmiszerek és gyógyszerek emésztésének vizsgálatára. Ezek a modellek azonban általában összetettek, elvégzésük költséges, ezért nem mindenki számára elérhetőek (Brodkorb és mtsai. 2019; D. Dupont és mtsai. 2019).

A statikus modellek, amelyek lényegesen egyszerűbbek és olcsóbbak. Az élelmiszerek, enzimek, valamint az elektrolitok állandó arányban vannak, valamint az egyes emésztési fázisok vizsgálata állandó pH értéken folyik. Évtizedek óta széles körben használják ezen módszereket az élelmiszeripari, takarmányozási és gyógyszeripari célokra. A statikus *in vitro* emésztési modellek igen hasznosnak bizonyultak az *in vivo* emésztés modellezésében.

Szükségessé vált az emésztéses vizsgálatok kanonizálása, ennek tükrében létrehozták, a több mint 35 ország multidiszciplináris szakértőiből álló nemzetközi INFOGEST hálózatot. E hálózat egyik elsődleges eredménye volt a statikus, *in vitro* szimuláció emésztési paraméterek meghatározása (Minekus és mtsai. 2014; Brodkorb és mtsai. 2019).

Az INFOGEST módszer az élelmiszerek emésztésének laboratóriumi szimulációját mutatja be, az emésztési folyamat három fő fázisának (orális, gyomor- és bélfázis) standardizált körülmények közötti modellezésével. Az INFOGEST célja, hogy egy egyszerűbb, mégis megbízható protokollt kínáljon, amely könnyen alkalmazható különböző laboratóriumokban. Mivel az emésztés kinetikáját nem modellezi, az emésztési folyamatok végtermékeire, például peptidekre, aminosavakra, zsírsavakra és egyszerű cukrokra koncentrálnak. A közegoldatok összetétele, az enzimek, a pH szabályzás és az emésztési idő közelíti a fiziológiai adatokat, ami növeli a módszer megbízhatóságát. Az INFOGEST egy új változata (2.0) kiegészül az orális emésztéssel és a gyomorlipáz használatával. A módszer széles körben alkalmazható az élelmiszerek tápanyagainak felszabadulásának tanulmányozására (Brodkorb és mtsai. 2019).

2.6 Emulzió jelentősége a pH stat mérésben

A vékonybélbe jutó olajcseppek mérete a bevitt tápláléktól, a gyomorban és a vékonybélben lejátszódó fizikai-kémiai folyamatoktól, pl. a cseppek emésztésétől, flokkulációjától, szétesésétől függően nagymértékben változhat. A lipidemésztés kezdeti sebessége a cseppek

méretének csökkenésével nő. A cseppméret csökkenésével nő a cseppeket körbevevő vizes fázis határfelületére jutó lipidek száma, és a lipáz enzim közvetlenül érintkezik az emulgeált lipiddel (Li, Hu, és McClements 2011).

3 A vizsgálatok módszerei

3.1 A pH stat méréshez szükséges anyagok és oldatok

A méréseket Grundy és mtsai. 2021-es cikke alapján, a módszer adaptálása után hajtottam végre, két lipáz enzimkeverékre, többféle gátlószer használatával, annak érdekében, hogy megvizsgáljam különböző tannin készítmények és almatörköly kivonatok esetleges gátló hatásának jelenlétét, illetve mértékét lipáz enzim aktivitásra nézve. A mérések elvégzéséhez a következőkben leírt oldatokat és keverékeket készítettem elő.

3.1.1 Puffer hatású közegoldat hasnyálmirigy-lipáz enzim aktivitásának vizsgálatához

A 500 mL közegoldat elkészítéséhez kimértem a megfelelő mennyiséget a következő anyagokból: trisz-hidroximetil-aminometán (18 mg, REANAL), NaCl (4,5 g, REANAL), CaCl₂ (100 mg, SIGMA), epe kivonat (1,04 g, SIGMA). A kimért anyagokat egy 500 mL-es főzőpohárba raktam, majd hozzáöntöttem 400 mL ioncserélt vizet. Ezt a keveréket mágneses keverőbaba segítségével homogenizáltam. Az epe kivonat nehézkes oldása miatt a kevertetés akár 20-30 percet is igénybe vett. Az elegy pH-ját beállítottam 7,5-re 6 N NaOH oldattal, a kevertetés megszakítása nélkül. Az így elkészült oldatot átöntöttem egy 500 mL-es mérőlombikba, amit jelre töltöttem ioncserélt vízzel.

3.1.2 Puffer hatású közegoldat gyomor-lipáz enzim aktivitásának vizsgálatához

A gyomor-lipáz mérésére használatos közeg összetételében eltér a hasnyálmirigy-lipáz közegétől a következőkben: BSA (50 mg, SAFC), NaCl (4,5 g, REANAL), epe kivonat (0,5 g, SIGMA).

Az elkészítési mód az alapanyagokon és a végső pH állításon kívül megegyezik a PL közegével. A pH értéket 5,0-ra kell állítani 1M HCl oldattal.

3.1.3 Hasnyálmirigy-lipáz enzimkeverék

A hasnyálmirigy-lipáz (PL) enzimkészítmény (porcine pancreatin, SIGMA) durva őrlésű liszt állagú por, amit -80 °C-os fagyasztószekrényben tárolunk. Használat előtt meg kellett várni, míg a közeg felveszi a szobahőmérsékletet, ami általában 20 percet vett igénybe. A PL-ből 1

mg/mL koncentrációjú enzimoldatot készítettem, amihez egy centrifuga csőbe 10 mg PL-t mértem ki, melyet 10 mL ioncserélt vízben oldottam fel. A PL nem oldódik teljesen vízben, az enzimaktivitás kb. 10%-a oldhatatlan fázisban marad, ezért minden alkalommal használat előtt közvetlenül vortexeltem, hogy a homogén legyen az oldat. Az enzim továbbá aktív proteázokat tartalmaz, amik gyorsan degradálják a lipázokat, ezért a PL enzim elegyből minden mérési nap újat készítettem.

3.1.4 Gyomor-Lipáz enzimkeverék

A gyomor-lipáz (RGE) enzimkészítmény (Rabbit Gastric Extract 15–1G, Lipolytech) durva őrlésű szárított élesztőre emlékeztető por, amit -80 °C-os fagyasztószekrényben tárolunk. Használat előtt meg kellett várni, míg a közeg felveszi a szobahőmérsékletet, ami általában 20 percet vett igénybe. Az RGE-ből 1 mg/mL koncentrációjú enzimoldatot készítettem, amihez egy centrifuga csőbe 10 mg enzimet mértem ki, melyet 10 mL ioncserélt vízben oldottam fel. Az RGE teljesen oldódik vízben. Az enzim aktív proteázokat tartalmaz, amik gyorsan degradálják a lipázokat, ezért az RGE enzim oldatból minden mérési nap újat készítettem.

3.2 Gátlószerek

3.2.1 Tannin inhibitor törzsoldatok

Az enzimgátlásra háromfajta tannin port használtam, melyeket a SilvaTeam Welltan termékcsaládjából választottunk ki: egy kondenzált (Q, kondenzált tanninkivonat) és két hidrolizálható (C, ellagitannin és T, gallotannin) tannin kivonatot. A méréshez 6 mg/mL koncentrációjú törzsoldatot készítettem, melyhez 48 mg tannin port mértem ki, és 8 mL vízben oldottam fel. Mindhárom tanninkészítménynél hasonlóan jártam el.

3.2.2 Almatörköly kivonatok

A felhasznált almatörköly egy másik kísérletsorozathoz készült a tanszéken, amit felhasználtam a méréseim kivitelezéséhez. A törköly egy 2022 ősz elején betakarított Idared almafajtából készült, amelyet az Eszat Kft. biztosított (Mátészalka, Magyarország). Az alma levét normál ipari körülmények között, enzimkezelés nélkül préselték. Az almapogácsát a további feldolgozásig -20 °C-on tárolták. Az almatörkölyt fagyasztva szárították (Scanvac Coolsafe

110-4), majd konyhai méretű elektromos darálóval (Bosch) porrá zúzták. A bioaktív összetevők kivonása vizes szuszpenzió létrehozásával és vizes acetonos (70%) extrakcióval történt. A vizes szuszpenziót úgy készítették, hogy 1 g almatörkölyport egy 50 ml-es centrifugacsőbe mérték, amelyhez 20 ml 30 °C-os vizet adtak, és Ultraturrax sheer force mixerrel keverték (2 perc). A szuszpenziót alapos homogenizálás után változatlan formában készítették el. A vizes acetonnal történő extrakciót úgy végezték el, hogy 1 g almatörkölyporhoz 40 mL 70%-os (v/v) aceton:víz keveréket adtunk. A felülúszót tiszta 50 mL-es centrifugacsőbe töltötték, és az acetont vákuumcentrifugában (Scanvac Coolsafe) elpárologtatták. Az elpárologott felülúszót 10 mL-re egészítették ki desztillált vízzel. A végleges kivonatot homogenizálással készítették el. A kivonatokat -20 °C-on tároltam a mérések elvégzéséig.

3.3 pH stat mérés

A mérésekhez használt berendezés a 6. ábrán látható.

Ábra 6 Titrandó 902 berendezés (forrás: https://www.metrohm.com/hu_hu/products/2/9020/29020010.html)



3.3.1 A pH stat mérés szoftveres előkészítése

A méréseket Metrohm Titrandó 902 berendezésen hajtottam végre, Biotride pH elektród használatával, egyedi program alapján. A mérési módszert Tiamo 3.0 szoftver segítségével hoztam létre. A módszer hét fő részből állt, mindkét enzim készítmény esetében.

A lépések sorrendben az első a pH beállítás (SET pH 1), szünet (WAIT 1), a második pH beállítás (SET pH 2), második szünet (WAIT 2), pH visszamérés (MEAS pH), harmadik szünet (WAIT 3) és a statikus pH értéken tartás (STAT pH) voltak. A módszer paraméterei eltértek a különböző mérési beállításoknál, összesen négy változatát kellett elkészítenem a módszernek, amik a pH érték beállításában tértek el (7-10. ábra).

A mérési módszer létrehozása szintén részét képezi a dolgozatomnak, mivel az ilyen típusú pH statikus mérési módszert Magyarországon csupán egyetlen másik laboratórium alkalmaznak, így létrehozása nem triviális, és hosszadalmas módszerfejlesztést igényelt.

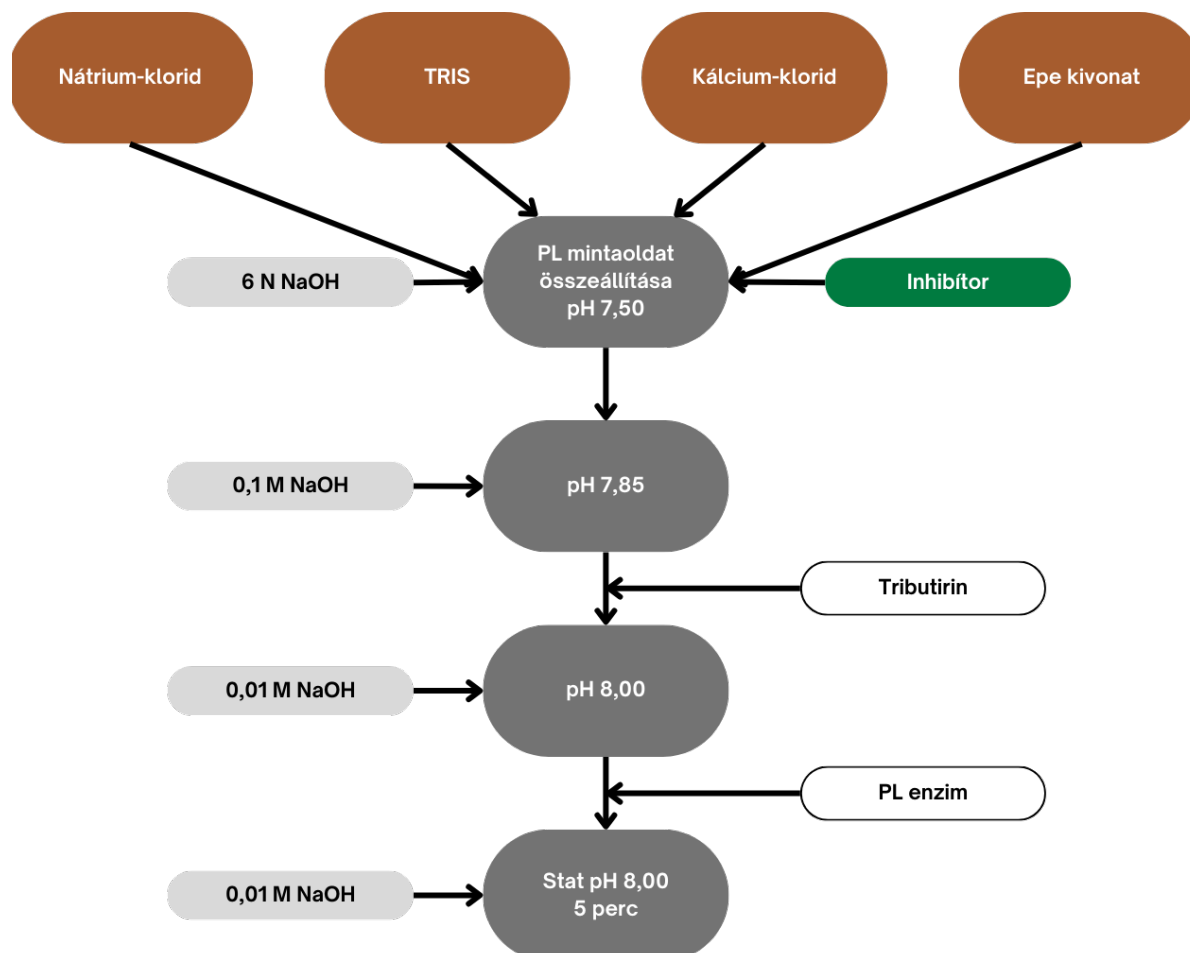
3.3.2 PL enzim aktivitásának mérési módszere

A PL enzim aktivitását az INFOGEST protokollból adaptált Grundy és mtsai. 2021 módszere alapján, pH 8-on vizsgáltam. Ezen módszer főbb paraméterei a 7. Ábrán láthatók. A módszer részei; **SET pH 1**: 0,1 M NaOH; automatikus hőmérsékletmérés; keverési sebesség: 5; titrálási végpont: pH 7,85; adagolási sebesség maximális 0,2 mL/perc, minimális 5 µL/perc; hőmérséklet 37°C; mérési pontok közötti idő: 0,1 másodperc; **WAIT**:120 másodperc; 500 µL szubsztrátum manuális hozzáadása a rendszerhez; **SET pH 2**: 0,01 M NaOH oldatot; hőmérséklet-érzékelés automatikus; keverési sebesség 5; pH végpont 8,00; maximális adagolási ráta 0,05 mL/perc, minimális ráta 5 µL/perc; titrálási irány pozitív; hőmérséklet 37°C; végső megállási idő 900 másodperc; **MEAS pH**: driftkontroll bekapcsolva; adatrögzítés: 2 másodperces intervallum; hőmérséklet 37°C; keverési sebesség 4; **STAT pH**: 0,01 M NaOH oldat; pH érték 8,00; adagolási sebesség és a pH-érték monitorozása be, alsó határ pH 2,00, felső határ pH 11; adagolási ráta minimum 0,08 mL/perc, maximum 1 mL/perc.

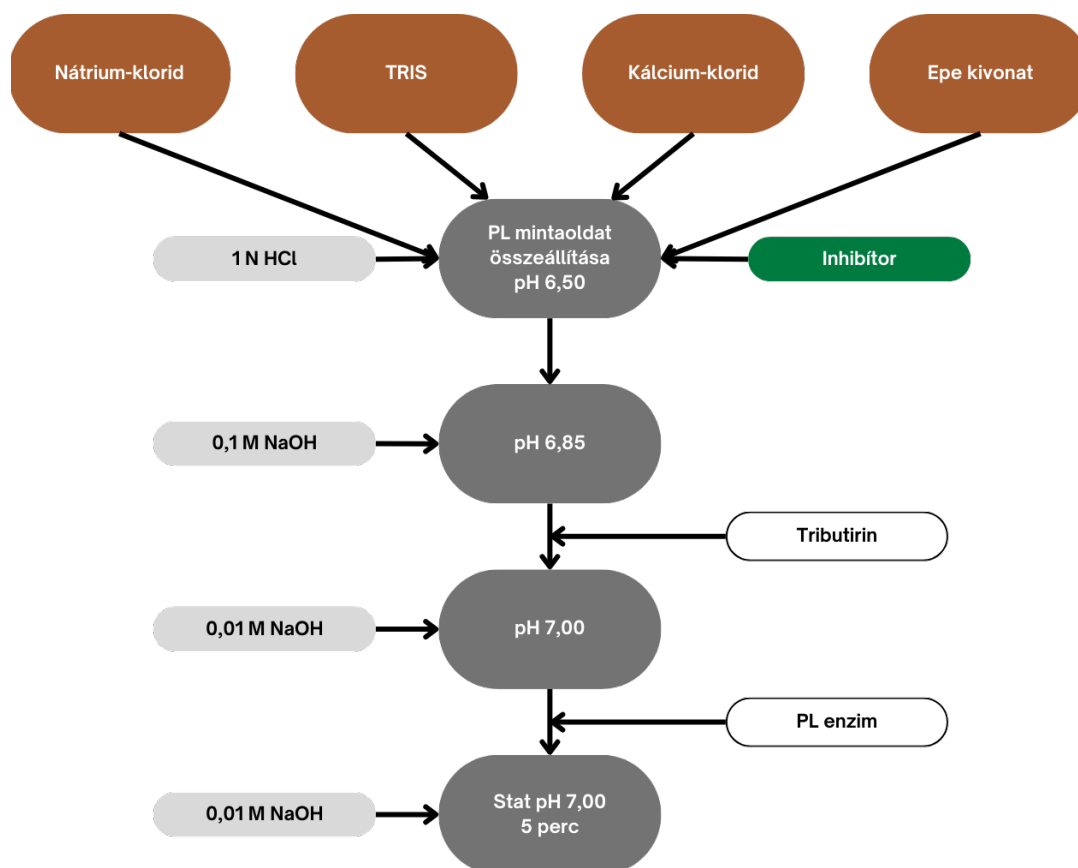
A PL enzim aktivitását vizsgáltam pH 8-tól eltérő kémhatáson is, pH 7-en. Ugyan az enzimaktivitás méréshez az ideális pH a 8-as (lásd Grundy és mtsai. 2021), de az emésztésszimuláció és a bioaktívok által kifejtett hatás nem ezen a kémhatáson fejlődik ki, hanem a gyomor (pH 3) és vékonybél (pH 7) kémhatásán. ezért nem csak az „ideális” aktivitás tesztet foglalkoztam, hanem a „reális” kémhatás viszonyok között lezajló folyamatokat is

megvizsgáltam. A 8. Ábra az ehhez szükséges változtatásokat mutatja, ami: **SET pH 1:** pH 6,85; **SET pH 2:** pH végpont 7,00; **STAT pH:** pH érték 7,00.

Ábra 7 PL enzim aktivitásának mérése pH 8,00 értéken folyamatára, közegoldat összetételével és a bemeneti anyagokkal (forrás: saját készítés)



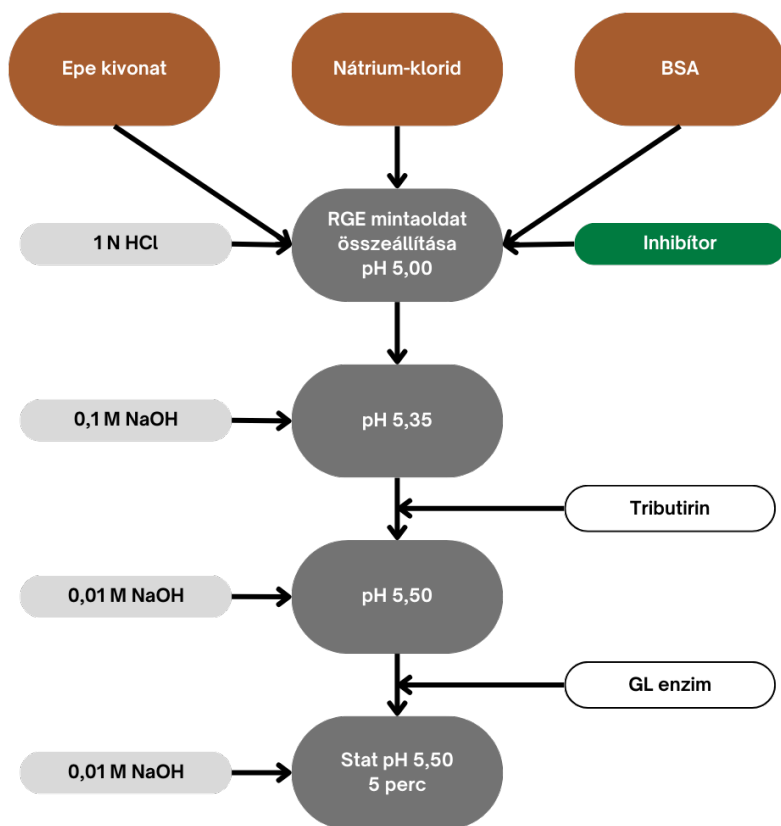
Ábra 8 PL enzim aktivitásának mérése pH 7,00 értéken folyamatábra közegoldat összetételével és a bemeneti anyagokkal (forrás: saját készítés)



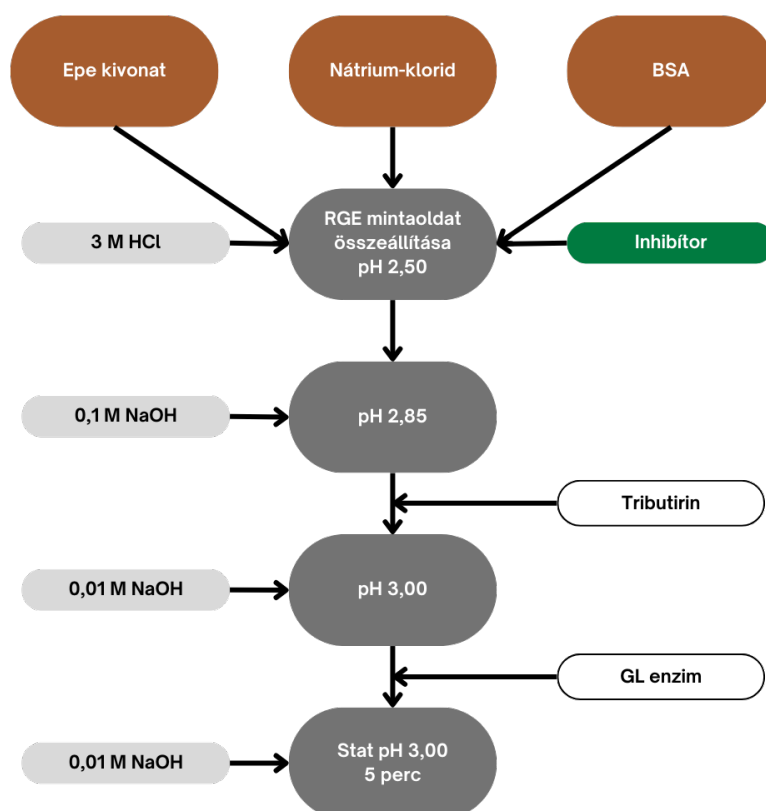
3.3.3 RGE enzimhez készített módszer

Az RGE enzimet szintén a fent említett módszer alapján készítettem el, pH 5,5-ön. A módszer csak néhány beállításban tér el a fent leírt PL mérési módszertől, így csak ezeket az változásokat sorolom fel, míg a folyamat részletezése a 9. ábrán látható. Főbb eltérések: **SET pH 1:** pH 5,35; **SET pH 2:** pH végpont 5,50; **STAT pH:** pH érték 5,50. Az RGE Enzim esetében is készítettem a reális körülményeket jobban közelítő mérést. Ezt a vizsgálatot pH 3,0-án végeztem és a módszer nagy része megegyezik a korábbiakkal, a következő fontos változtatások kivételével: **SET pH 1:** pH 2,85; **SET pH 2:** pH végpont 3,00; **STAT pH:** pH érték 3,00. A módszer részletesen a 10. Ábrán látható.

*Ábra 9 RGE enzim aktivitásának mérése pH 5,50 értéken folyamatára, közegoldat összetételével és a bemeneti anyagokkal
(forrás: saját készítés)*



Ábra 10 RGE enzim aktivitásának mérése pH 3,00 értéken folyamatára, közegoldat összetételével és a bemeneti anyagokkal



3.4 pH stat mérés végrehajtása enzimaktivitás meghatározásához

A mintaoldatot, mindkét enzim esetében, minden mérés előtt a 37°C-ra temperált hőmérsékletű mintatégelybe állítottam össze. A mintaoldat kezdetben, 14,5 mL puffer hatású közegoldat, melynek kémhatását a berendezés a beprogramozott paraméterek alapján a PL mérésnél 7,85-re, RGE esetében pH 5,35-re állítja be 0,1 M NaOH oldattal. Ezután hozzáadtam 500 µL tributirint (≥98,5%, SIGMA) mindkét enzimnél egyaránt, mely szubsztrátként van jelen a rendszerben. Az immár összemért keveréket a berendezés 0,01 M NaOH oldattal PL mérésnél pH 8,00-ra, RGE mérésnél pH 5,5 -re állítja be. Ezen a ponton hozzáadtam az adott méréshez szükséges mennyiségű enzimet (50 µL, 100 µL, vagy 200 µL). Ekkor azonnal elkezdődik az enzimreakció és csökkenni kezd a pH érték. A statikus pH mérés 5 percen keresztül tart, ami alatt a berendezés rögzíti a minta a pH 8,0 értéken tartásához szükséges 0,1 M NaOH oldat mennyiségét. A mérés idejének leteltével a NaOH oldat fogyása (mL) ábrázolható az idő (min) függvényében. A kapott eredményből a két enzim esetében eltérő, PL esetében az 2. Képlet, az RGE esetében a 3. Képlet segítségével számolható az enzim aktivitása.

Képlet 2 PL enzim készítmény specifikus aktivitásának képlete: ΔV – a pH stat mérés két időpontja között fogyott NaOH térfogata (μL); t – idő percben; N – NaOH normalitása; C – enzimkészítmény koncentrációja (mg/mL); v – enzim oldat térfogata (μL) (forrás: saját)

$$SA_{\text{Pankreatin}} (U/\text{mg}) = \frac{\left(\frac{\Delta V_{\text{NaOH}}}{t_2 - t_1}\right) \cdot N \cdot 1000}{C \cdot v}$$

Képlet 3 RGE (Nyúl Gyomor Enzim) készítmény specifikus aktivitásának képlete: ΔV – a pH stat mérés két időpontja között fogyott NaOH térfogata (μL); t – idő percben; N – NaOH normalitása; C – enzimkészítmény koncentrációja (mg/mL); v – enzim oldat térfogata (μL)

$$SA_{\text{RGE}} (U/\text{mg}) = \frac{\left(\frac{\Delta V_{\text{NaOH}}}{t_2 - t_1}\right) \cdot N \cdot 1,12 \cdot 1000}{C \cdot v}$$

3.5 pH stat mérés alkalmazása enzim inhibíciós tesztek esetén

A gátlási kísérletek végrehajtása előtt két enzim oldattal (PL és RGE), több beállítással végeztem vizsgálatot az 1. táblázat beállításai szerint, annak érdekében, hogy az enzimek kiindulási aktivitását meghatározzam.

Táblázat 1 Inhibitor nélküli enzimes mérések összeállítása (forrás: saját készítés)

Enzim	Inhibitor	Enzim (μL)	pH	Enzim	Inhibitor	Enzim (μL)	pH
PL	-	50	8,0	RGE	-	50	5,5
PL	-	100	8,0	RGE	-	100	5,5
PL	-	200	8,0	RGE	-	200	5,5
				RGE	-	300	5,5

A vizsgálatok során öt gátló anyagot (három tannin por és két almatörköly kivonat), a tanninok esetében három gátlási szintet, két enzimmel (PL és RGE) vizsgáltam. Ezen összeállításokat az 2. táblázat taglalja.

Táblázat 2 Teljes kísérleti összeállítás: PL – hasnyálmirigy-lipáz; RGE – gyomor-lipáz; Q - nem hidrolizálható tannin kivonat; C - hidrolizálható tanninkivonat; T - hidrolizálható tanninkivonat (forrás: saját készítés)

Enzim	Inhibítor	Enzim (μL)	pH	Enzim	Inhibítor	Enzim (μL)	pH
PL	-	50	8,0	RGE	-	50	5,5
PL	-	100	8,0	RGE	-	100	5,5
PL	-	200	8,0	RGE	-	200	5,5
PL	Q 0,3%	100	8,0	RGE	-	300	5,5
PL	Q 0,6%	100	8,0	RGE	Q 0,3%	100	5,5
PL	Q 0,9%	100	8,0	RGE	Q 0,6%	100	5,5
PL	C 0,3%	100	8,0	RGE	Q 0,9%	100	5,5
PL	C 0,6%	100	8,0	RGE	C 0,3%	100	5,5
PL	C 0,9%	100	8,0	RGE	C 0,6%	100	5,5
PL	T 0,3%	100	8,0	RGE	C 0,9%	100	5,5
PL	T 0,6%	100	8,0	RGE	T 0,3%	100	5,5
PL	T 0,9%	100	8,0	RGE	T 0,6%	100	5,5
	Acetonos						
PL	törköly	100	8,0	RGE	T 0,9%	100	5,5
	kivonat						
	Vizes				Acetonos		
PL	törkölykivonat	100	8,0	RGE	törköly	100	5,5
					kivonat		
PL	-	100	7,0	RGE	Vizez	100	5,5
					törkölykivonat		
PL	Q 0,3%	100	7,0	RGE	-	300	3,0
PL	Q 0,6%	100	7,0				
PL	Q 0,9%	100	7,0				

3.6 Statisztika

A statisztikát RStudio (R 4.4.1) segítségével végeztem. Variancia analízist (ANOVA) futtattam, összehasonlítva az egyes mérési beállításhoz tartozó párhuzamos eredményeket. Az ANOVA eredményeiből post-hoc Tukey HSD tesztet futtattam. A Tukey teszt alapján betűket

rendeltem az adathalmazokhoz, a szignifikáns eltérések szemléltetéséhez. Ezen adathalmazokat és statisztikai eredményekre utaló betűket ábrázoltam doboz diagram formátumban. Végeztem továbbá Pearson korrelációs tesztet is, mely szerint korrelációs együtthatót állapítottam meg. A korrelációt $r > 0,7$ és $r < -0,7$ értékek esetén értelmeztem erősnek.

4 Eredmények és értékelésük

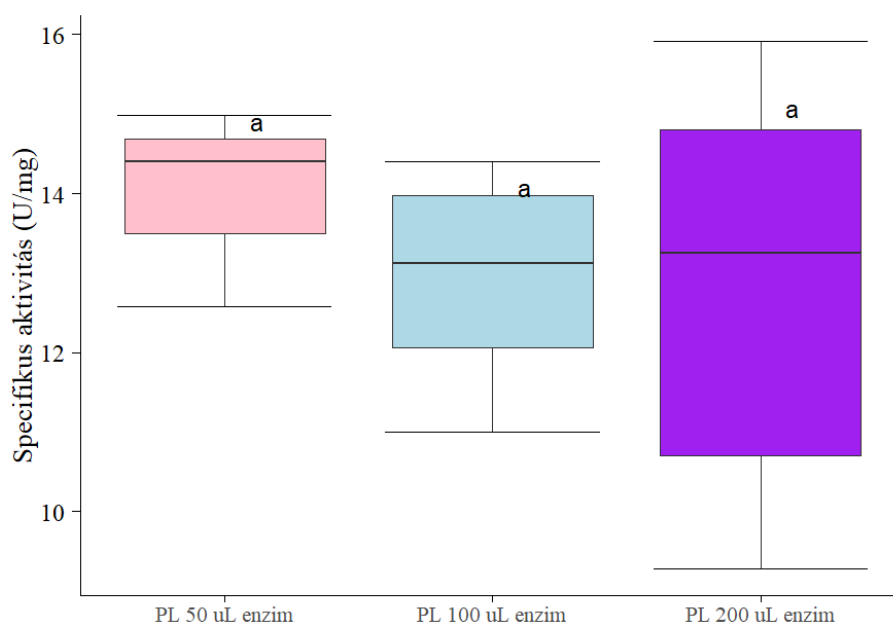
Ebben a fejezetben bemutatom a mért eredményeket, amiket doboz diagram formájában készítettem el az RStudio programmal. Először meghatároztam az enzimek specifikus aktivitásait a NaOH mérőoldat fogyása alapján az 2. és a 3. képlet szerint. A Grundy és mtsai. 2021 módszerében taglalt kémhatásokon megmértem több enzimkoncentrációjú beállítást, amik minden esetben azonosak voltak.

A vizsgálat során végeztem egy összehasonlító mérést, aminek három célja volt; 1) az eredendő enzimaktivitás meghatározása, amihez a különböző bioaktívok hatását viszonyítottam, 2) az ideális enzimkoncentráció kiválasztása a további inhibíciós mérésekhez, illetve 3) a módszer jóságának ellenőrzése a különböző enzimmennyiségekből számolt specifikus aktivitások eltérésére.

4.1 Referencia specifikus aktivitások meghatározása

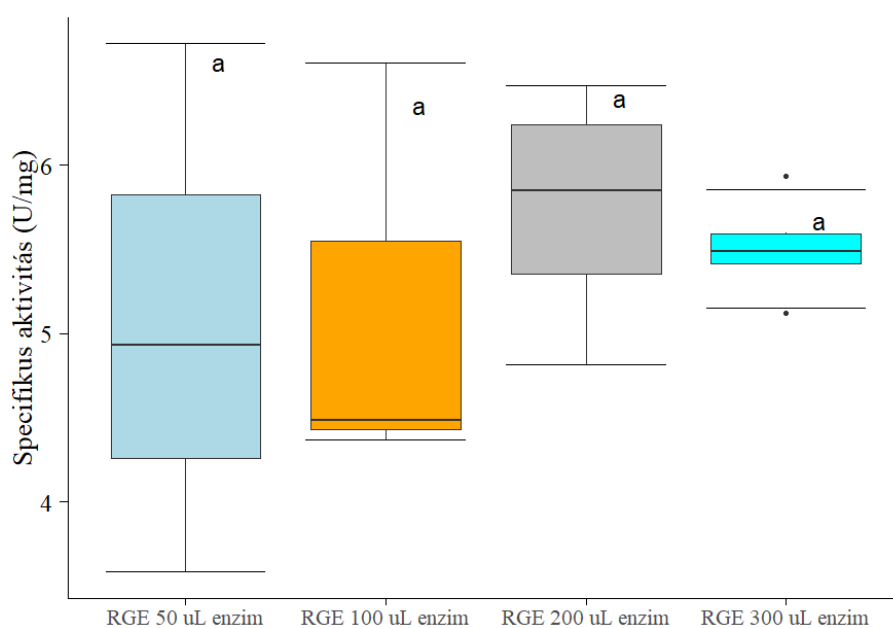
A PL esetében az eltérő enzimkoncentrációk esetén is azonos specifikus aktivitás értékeket adtak. Az adathalmazok között nem volt szignifikáns különbség ($F=0,321$). A további vizsgálatokat 100 μL enzim oldat hozzáadásával végeztem, mert a 200 μL -re kapott eredmények szórása lényegesen nagyobbnak bizonyult (11. Ábra).

Ábra 11 PL enzim eltérő enzimmennyiségeken mért specifikus aktivitásának eredményei (forrás: saját készítés)



Az RGE enzimet használva, pH 5,5-ön, készítettem négy kísérleti beállítást, az enzimkoncentrációt fokozatosan növelve. A vizsgálatok eredményeit a 12. ábrán összegeztem. Az aktivitások statisztikai értelemben itt sem különböznek szignifikánsan ($F=0,41$), ezzel igazolva, hogy a módszer megbízható. A további vizsgálatokra az RGE esetében 300 μ L enzimmal dolgoztam, mivel nem tér el szignifikánsan a többitől, de a legkisebb szórásértéket produkálta.

Ábra 12 RGE enzim eltérő enzimmennyiségeken mért specifikus aktivitásának eredményei (forrás: saját készítés)



A specifikus aktivitás mindkét enzimkészítmény esetében is jelentősen alacsonyabb érték lett, mint amit Grundy és mtsai. 2021 kimutattak, annak ellenére, hogy az általuk leírt módszerrel dolgoztam. Az aktivitások a cikkben leírtakhoz képest a PL esetében majdnem 60%-a 100 μ L enzim használatánál, az RGE aktivitása valamivel több mint 4%-a 200 μ L enzimmel.

Meghatároztam a mérési módszer megbízhatóságát mindkét enzim esetében, ami az adott enzim egyéb bioaktív anyagot nem tartalmazó referencia adathalmazból számolt RSD% lesz. Ezen érték a PL pH 8,0 esetében 11,78%, a PL pH 7,0 mérésnél 7,62% és az RGE pH 5,5 referenciaadatáé 4,88%.

A módszer érzékenysége a min enzimaktivitás, amit megmértem, ami $1,48 \pm 0,14$ U/mg. Ezt a mérési eredményt az RGE enzim, pH 5,5-ön, 0,9% Q tannin inhibitor hozzáadásával kaptam.

4.2 PL gátlás eredmények

Ebben a fejezetben megvizsgáltam egy kiválasztott enzimkoncentráción a bioaktívok hatását. A használt három tannin a SilvaTeam WellTan tanninkészítményének három tagja, két hidrolizálható; ellagitannin (C) és gallotannin (T), illetve egy kondenzált tannin (Q) alkalmaztam. A mért eredmények alapján a tannin kivonatok gátolják a lipáz enzim működését, kivéve a PL, pH 8,0 beállítások esetében, ahol a tanninok alacsony koncentrációban (0,3%) aktivatorként viselkedtek, megemelve az enzimaktivitást a viszonyítási értékhez képest, ami az enzim saját aktivitása modulátor nélkül.

A vizsgálat során a Q tannin kivonattal végeztem mérést pH=7,0-en is, aminek eredménye eltér a pH=8,0-on mértektől. A méréshez felvettem egy új referencia értéket, ami a PL hozzáadott bioaktív nélkül, 7,0-es pH-n. Míg a két különböző kémhatáson mért referenciaértékek hasonlóak lettek, az enzimgátlás lefutása egészen más.

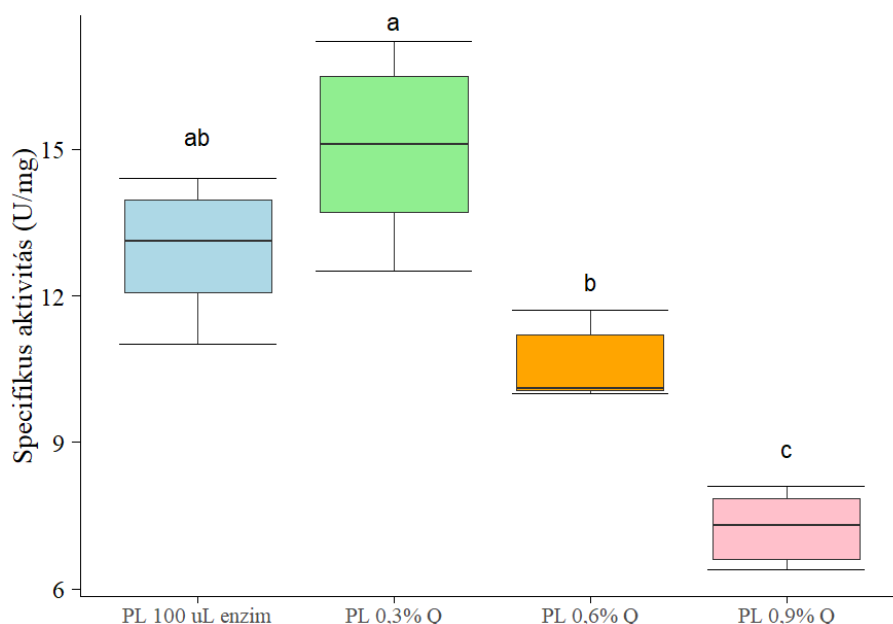
A három használt tannint külön taglalom minden enzimnél és kémhatás beállításnál. A mért eredmények a 13-15. és 17. Ábrákon láthatóak.

Kitérek továbbá egyéb bioaktív, az almatörköly kivonatok eredményeire is, amiknél megállapítható volt, hogy a törkölykivonatok nem befolyásolták az enzim aktivitását (16. Ábra).

4.2.1 PL gátlás vizsgálat kondenzált tanninkivonattal (Q)

A PL enzimet először a Q tanninkészítménnyel kezeltem, a közeget pH 8,0-ra állítottam be. A Q tannin 0,3%-os oldatának hozzáadásával az enzim specifikus aktivitása megugrott a viszonyításhoz képest. Ez a változás ugyan szemmel látható a 13. ábrán, statisztikailag nem szignifikáns eredmény az Tukey HSD teszt alapján ($p=0,083$). A 0,6% tanninkivonattal kezelt minta specifikus aktivitása szignifikánsan eltérő eredményt mutatott a 0,3%-kal kezelt mintához képest, de nem tér el a viszonyítási, inhibitort nem tartalmazó értékektől ($p=0,077$). Valódi, statisztikai inhibíciót csak a 0,9 % Q (kondenzált) tannint tartalmazó minta mutatott ($p<0,001$). Itt a gátló anyag több mind 40%-kal csökkentette az aktivitást.

Ábra 13 PL enzim gátlás ábrája SilvaTeam WellTan Q, kondenzált tanninkivonattal (forrás: saját készítés)

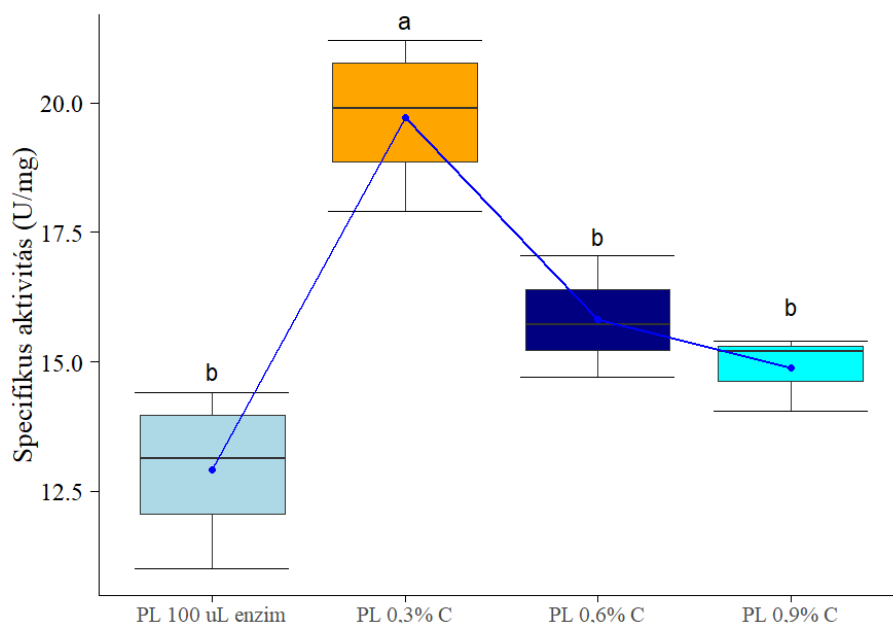


4.2.2 PL gátlás vizsgálat ellagitannin kivonattal (C)

Az ellagitannin kivonattal (C) végrehajtott enzim gátlásvizsgálat a 14. ábrán látható eredményeket mutatta. Inhibíció ezzel a tannin kivonattal egyik kísérleti beállítással sem valósult meg. A tanninkivonat 0,3%-os hozzáadása a rendszerhez 52,8%-kal növelte a specifikus aktivitás értékét. Az eltérés a referencia adatokhoz képest szignifikáns volt ($p < 0,05$). A 0,6% és 0,9%-ra mért eredmények egymással és a viszonyítási értékekkel is megegyeztek, de a 0,3%-ostól szignifikánsan eltért. A 0,6% és 0,9% tanninkivonat hozzáadása már

szignifikánsan csökkenti az aktivitást a 0,3 %-hoz képest ($p=0,013$; $p=0,003$), de nem csökkenti a referenciaértékhez képest ($p=0,065$; $p=0,265$).

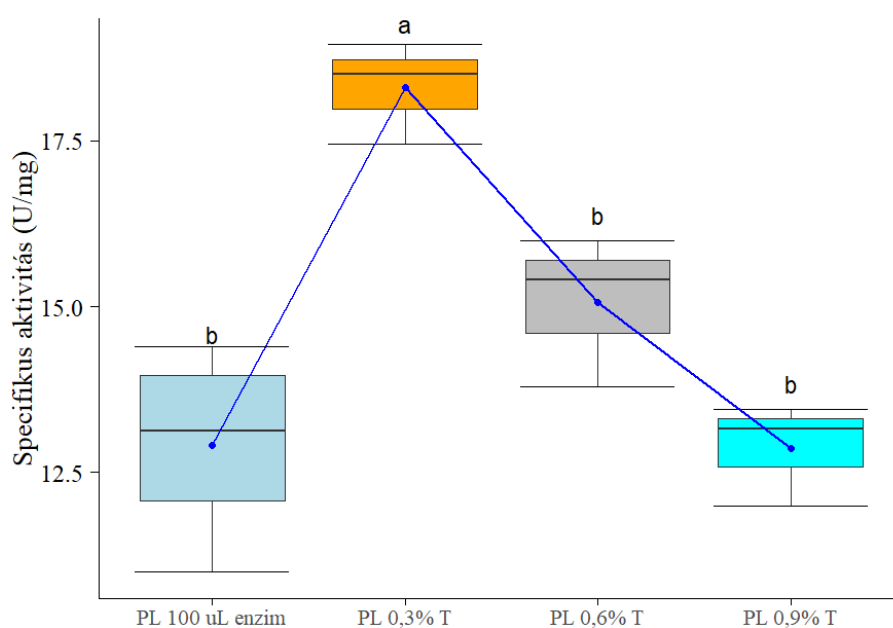
Ábra 14 PL enzim gátlása ellagitannin kivonattal (C) 0,3 %, 0,6 %, 0,9 %; pH 8 (forrás: saját készítés)



4.2.3 PL gátlás vizsgálat gallotannin kivonattal (T)

A specifikus enzimaktivitás a gallotannin kivonat (T) hozzáadásával nagyon hasonlóan alakult, mint az előző, hidrolizálható tanninnal (C). A tanninkivonat megemelte az enzimaktivitás értékét (41,7%), majd emelve az inhibitor koncentrációt kimutatható szignifikáns eltérés a csoportok között (0,3% és 0,6%, 0,9% között; $p=0,030$; $p=0,001$). Az enzimaktivitás 0,9% gátló anyag jelenlétében sem csökkentette az enzimaktivitást a referencia méréshez képest ($p=0,999$) (15. Ábra).

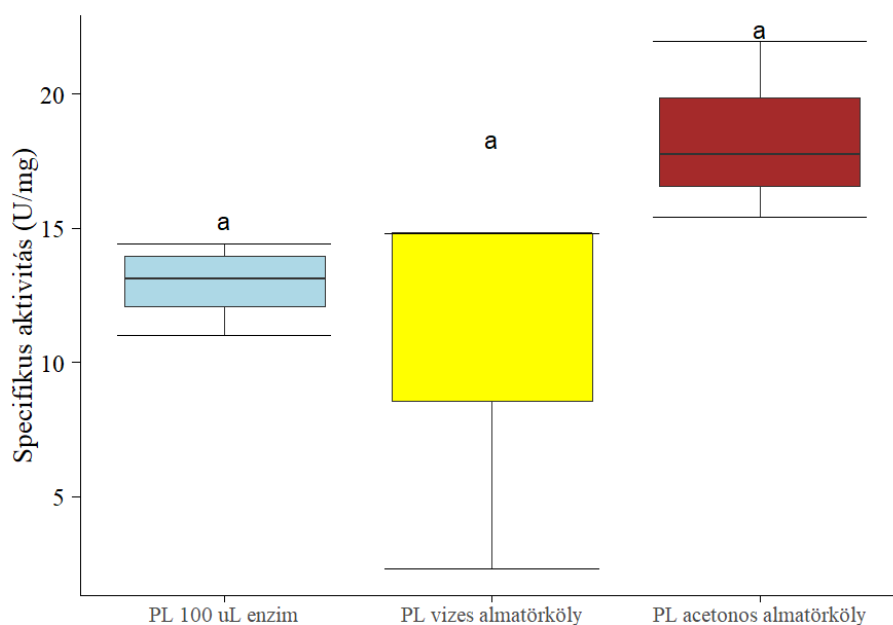
Ábra 15 PL enzim gátlása gallotannin kivonattal (T) 0,3 %, 0,6 %, 0,9 %; pH 8 (forrás: saját készítés)



4.2.4 PL gátlás vizsgálat almatörköly kivonatokkal

A specifikus aktivitás értékek a 16. ábrán láthatóan nagy szórással rendelkeznek. A vizes almatörkölyrel kezelt minta esetében $RSD = 180\%$ és az acetonos kivonattal kezelt mintánál $RSD = 678\%$. Szignifikáns változás nem tapasztalható a referencia méréshez képest sem a vizes, sem az acetonos kivonattal készült oldat esetében sem ($F = 0,151$).

Ábra 16 PL enzim gátlása almatörköly kivonatokkal: vizes és acetonos; pH 8 (forrás: saját készítés)

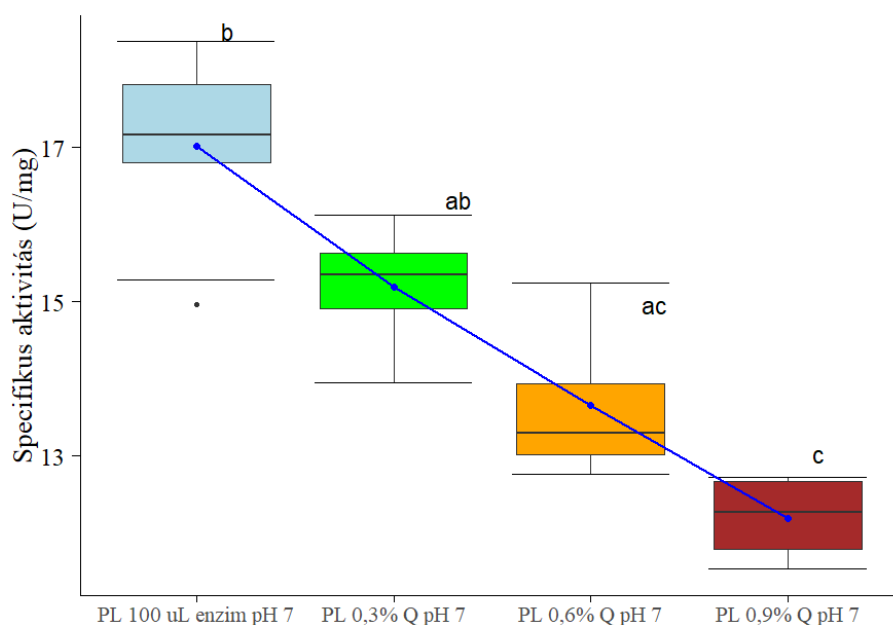


4.2.5 PL gátlás vizsgálat kondenzált tannin kivonattal (Q) módosított pH értéken

A különböző tanninkivonatok gátlásának mérését kiegészítve, a Grundy és mtsai. 2021 módszertől eltérően, pH 7-en is elvégeztem kizárólag a Q tanninkészítményt vizsgáló kísérletre, mert a megelőző méréseim alapján (13. Ábra) ennek a kondenzált tanninkivonatnak volt a legerősebb gátlása pH 8,0-án összevetve a C és T kivonatokkal. A pH értéket azért állítottam 7,0 értékre, hogy megvizsgálhassam az inhibíciós folyamatot a vékonybél természetes pH-ján is.

A referencia adathalmazhoz képest, amit külön határoztam meg ehhez az egy méréshez, az inhibíció tendenciája látványosan csökkenő volt ($r = -0,998$). Annak ellenére, hogy 0,3% tanninkivonat még nem biztosít szignifikáns inhibíciót ($p = 0,084$), 0,6% és 0,9% igen ($p = 0,001$; $p < 0,001$). Az enzimaktivitások átlagai egyik mérési beállítás esetében sem haladják meg a referencia átlagát.

Ábra 17 PL enzim gátlása kondenzált tannin kivonattal (Q) 0,3%, 0,6%, 0,9%; pH 7-en (forrás: saját készítés)



Míg pH 8-on inkább kofaktorként viselkedett a legkisebb koncentrációban hozzáadott tannin kivonat, azaz emelte az enzim aktivitást, addig pH 7-en (ahol egyébként az emésztés folyamata lejátszódik) inkább gátlószerként funkcionált.

A gátlás mértékének kiszámolásához az adathalmazok átlagait alkalmaztam. A gátlást csak azon adathalmazoknál értelmeztem, ahol az referenciától való eltérés szignifikáns értéket adott, mert az átlagok ugyan eltérnek olyan helyen is (pl. 0,3% Q) ahol a halmaz nem különbözik szignifikánsan a referenciától, így fals eredmény született volna. A 0,6% tanninkivonat tartalmú beállítás átlagértéke a viszonyítási átlaghoz képest 19,8%-kal, míg a 0,9% kivonat pedig 28,3%-kal csökkentette a specifikus aktivitás értékét (17. Ábra).

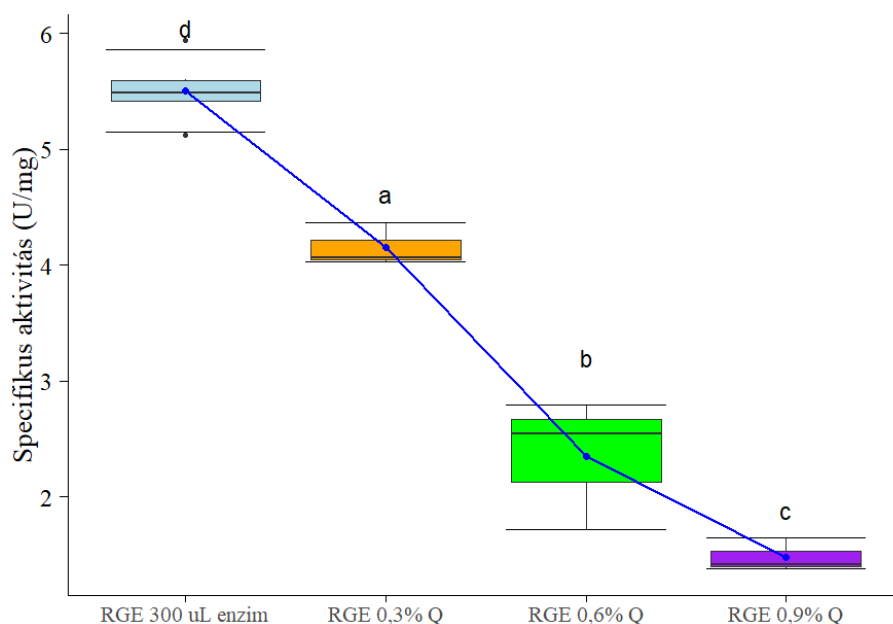
Ezt a vizsgálatot összevetve a pH 8,0 beállítással mért adatokkal, a legkiemelkedőbb különbség a 0,6% kondenzált tannint tartalmazó mintánál figyelhető meg, hiszen míg pH 8,0-án ezen érték látszólag megegyezik a referenciával, itt majdnem 20%-os gátlást produkál.

4.3 RGE gátlás eredmények

4.3.1 RGE gátlás vizsgálat kondenzált tanninkivonattal (Q)

Az RGE enzim inhibíciós vizsgálata olyan eredményeket hozott a PL mérésektől eltérően, amelyek adathalmazai szemmel láthatóan és statisztikailag is elkülönülnek egymástól. A Q kondenzált tanninkivonat pH 5,5 értéken, szignifikáns gátlást mutatott (18. Ábra). A tanninkoncentráció növelésével szigorúan csökkent az enzimaktivitás ($r = -0,992$). Minden adathalmaz eltért a többitől és minden tanninkoncentráció esetében igaz volt, hogy csökken a specifikus aktivitás; az átlag értékek nem haladják meg a referenciát. Az aktivitás csökkenés 0,3% Q esetében 24,5% ($p < 0,001$), 0,6% Q-nál 57,3% ($p < 0,001$) és 0,9% Q-hozzáadásával 73,1% ($p < 0,001$). A 0,9% inhibitor szinte teljesen megállította az enzim hidrolízisét, ami a 18. ábrán látható módon szinte az 1 U/mg értékig vitte le.

Ábra 18 RGE enzim gátlása kondenzált tanninkivonattal (Q) 0,3%, 0,6%, 0,9%; pH 5,5 (forrás: saját készítés)

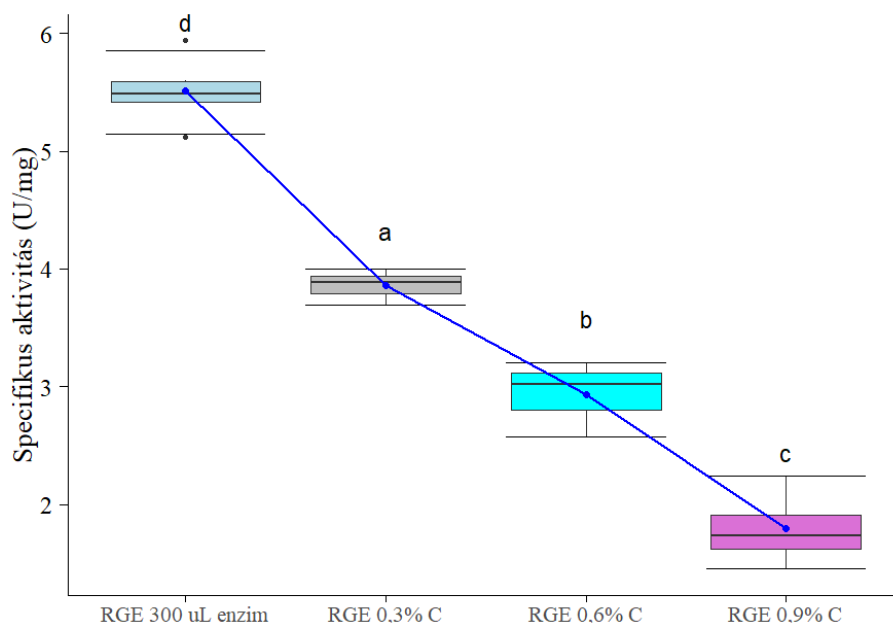


4.3.2 RGE gátlás vizsgálat ellagitannin kivonattal (C)

A gátlás a 19. ábrán látható módon szignifikáns eredményeket hozott, hasonlóan a Q kondenzált tanninkivonat esetében. Az ellagitanninok koncentrációja fordítottan arányos a specifikus aktivitással. Minden adathalmaz szignifikánsan elkülönül egymástól ($F = 8,48 \times 10^{-10}$), a gátlás

tendenciája szigorúan, monoton csökkenő ($r = -0,992$). A maximális gátlás ebben az esetben több mint 67%-os volt 0,9% C tannin hozzáadásával.

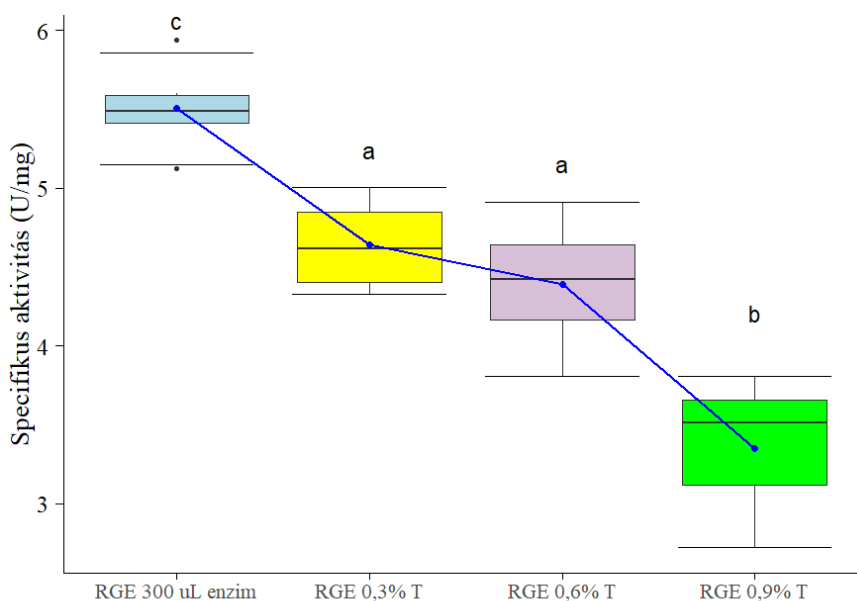
Ábra 19 RGE enzim gátlása ellagitannin kivonattal (C) 0,3%, 0,6%, 0,9%; pH 5,5 (forrás: saját készítés)



4.3.3 RGE gátlás vizsgálat gallotannin kivonattal (T)

A gallotannin is képes volt szignifikánsan csökkenteni a specifikus aktivitást. A 0,3% és 0,6% esetében nem volt mérhető érdemi különbség, a két adathalmaz statisztikai értelemben megegyezik egymással ($p = 0,797$). Ezzel a tannin kivonattal végzett vizsgálatnál is elmondható, hogy az inhibitor hozzáadása minden töménységénél kisebb átlagos aktivitás értéket eredményezett, mint a referencia adat.

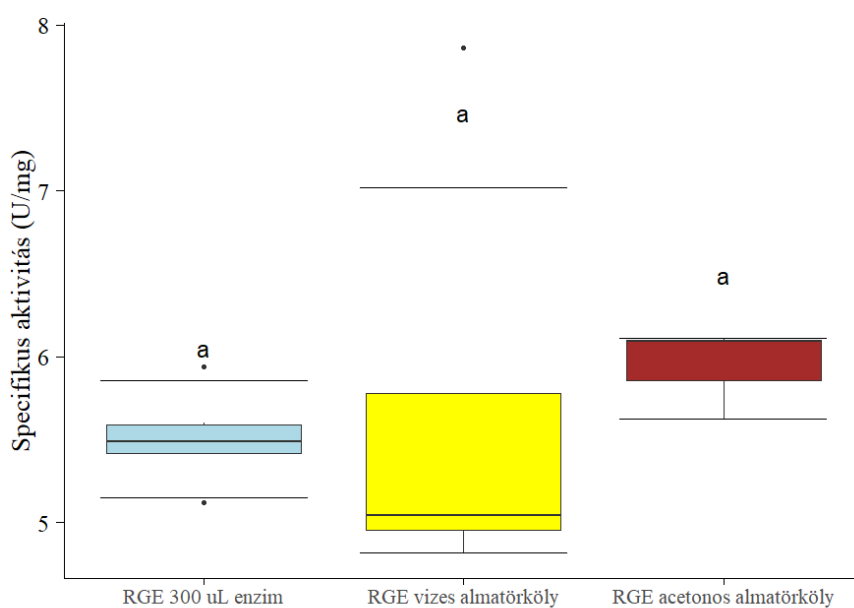
Ábra 20 RGE enzim gátlása gallotannin kivonattal (T) 0,3%, 0,6%, 0,9%; pH 5,5 (forrás: saját készítés)



4.3.4 RGE gátlás vizsgálata almatörköly kivonatokkal

Az almatörköly kivonat, hasonlóan a PL almatörköly méréséhez, nem mutatott szignifikáns változást a specifikus aktivitásokban ($F = 0,764$). A vizes kivonat hozzáadása esetén csak nagyon nagy bizonytalansággal lehetett elvégezni a méréseket, hiszen ezen eredmények szórása a legnagyobb (21. Ábra). Ennek oka lehetett a kivonat inhomogenitása, sok szilárd szemcsével.

Ábra 21 RGE enzim gátlása almatörköly kivonatokkal: vizes és acetonos; pH 5,5 (forrás: saját készítés)



4.3.5 RGE gátlás vizsgálat kondenzált tannin kivonattal (Q) módosított pH értéken

Végeztem továbbá kísérletet a gyomor valós körülményeit jobban közelítve, nem az enzim optimális kémhatásán, pH 5,5-től eltérően pH 3,0-on. A mérés eredménytelennek bizonyult, enzimaktivitás értékre, három párhuzamos méréssel, nullát kaptam, a NaOH mérőoldat nem fogyott a mérés alatt. Az RGE ezen a pH értéken már inaktív így az emésztésszimuláció végrehajtásánál is érdemes arra odafigyelni, hogy a gyomorban található körülményeket hogyan állítjuk be.

4.4 Enzimaktivitás modulációja bioaktívok hatására

Enzimaktivitás változásainak összefoglalására meghatároztam a moduláció mértékét, mely azt mutatja, hogy a referencia adathalmaz átlag értékéhez képest hány %-kal változtak a specifikus aktivitás átlagértékei (4. Képlet).

***Képlet 4** M% - moduláció mértéke %-ban; SA_i - specifikus aktivitás az egyes gátlási szinteken; SA₀ - specifikus aktivitás inhibitor nélkül (forrás: saját készítés)*

$$M\% = 1 - \frac{\overline{SA}_i}{\overline{SA}_0} \cdot 100$$

Az enzimaktivitás modulációját a 3. táblázat foglalja össze. A táblázat csak azokat az eseteket taglalja, ahol az adott beállítás adathalmaz szignifikánsan eltért a referenciától. A sárgával kiemelt eredmények negatív inhibíció, tehát aktiváció, ahol az enzimaktivitás növekedett. A táblázatban csak azon értékek enzimmodulációs hatása látható százalékokban, ami a referenciától szignifikánsan különböző adathalmazból származik.

Táblázat 3 Enzimaktivitás változásainak összefoglalása, a moduláció mértéke. A táblázat csak azokat az eseteket taglalja, ahol az adott beállítás adathalmaza szignifikánsan eltért a referenciától. A sárgával kiemelt eredmény negatív inhibíció, tehát aktiváció, ahol az enzimaktivitás növekedett. (forrás: saját készítés)

Enzim	Inhibítor	Enzim (μL)	pH	Moduláció mértéke	IC ₅₀	p
PL	Q 0,9%	100	8,0	-43,9%	-	<0,001
PL	C 0,3%	100	8,0	52,8%	-	<0,001
PL	T 0,3%	100	8,0	41,7%	-	<0,001
PL	Q 0,6%	100	7,0	-19,8%	-	0,001
PL	Q 0,9%	100	7,0	-28,3%		<0,001
RGE	Q 0,3%	100	5,5	-24,5%	2,92 mg	<0,001
RGE	Q 0,6%	100	5,5	-57,3%		<0,001
RGE	Q 0,9%	100	5,5	-73,1%		<0,001
RGE	C 0,3%	100	5,5	-30,0%	3,21 mg	<0,001
RGE	C 0,6%	100	5,5	-46,7%		<0,001
RGE	C 0,9%	100	5,5	-67,4%		<0,001
RGE	T 0,3%	100	5,5	-15,8%	-	0,018
RGE	T 0,6%	100	5,5	-20,3%		0,003
RGE	T 0,9%	100	5,5	-39,2%		<0,001

A 3. táblázatban foglaltak alapján elmondható, hogy a PL esetében nem sikerült olyan szintű gátlást elérni, mint az RGE esetében, ahol pl. a Q tannin 0,9% töménységű oldat hozzáadása a rendszerhez több mint 70%-os inhibíciót eredményezett.

Az RGE esetében minden tanninkivonattal való kezelési vizsgálati eredményből lehet IC₅₀ értéket számolni, ami jelen esetben az adott tannin azon koncentrációja, ahol az enzimaktivitás pontosan a felére csökken. A Q készítményből 2,92 mg, a C-ből 3,21 mg tanninkészítményt kell hozzáadni a rendszerhez, hogy megvalósuljon az 50%-os gátlási szint.

5 Következtetések és javaslatok

A mérések eredményei alapján a tanninkivonatok (Q, C, T) kisebb koncentrációi nem mutattak szignifikáns gátlást a hasnyálmirigy-enzimre, sőt bizonyos esetekben az enzimaktivitás növekedését eredményezték. A gátlás ebben az esetben eltolódott, először megemelkedett a specifikus enzimaktivitás és utána egy csökkenő tendencia volt megfigyelhető nagyobb gátló anyag koncentráció hatására. A gátlás még 0,9% esetében sem haladta meg a referencia értéket, ami inhibitor nélküli enzimaktivitás mérés volt. A módosított körülmény (pH 8,00-ról pH 7,00-ra) más eredményt hozott, itt nem emelkedett az aktivitás a referenciához képest és 0,6% tanninkivonat már szignifikáns csökkenést eredményezett (17. Ábra). Ugyan a két pH-n mért eredmények eltérőek voltak, hasonló trendeket figyeltem meg.

A pH 8,0 és pH 7,0 értékeken végzett kísérletek közötti eltérés megerősítette, hogy a pH érték jelentősen befolyásolja a tanninok viselkedését. Adamczyk, Karonen, és munkatársai 2017-ben megállapították talajvizsgálatok során, hogy a tannin-enzim kölcsönhatás az enzimkonformáció megváltozása miatt az enzimaktivitás csökkenéséhez, de egyben növekedéséhez is vezetett, és a tannin-enzim csapadékok reziduális enzimaktivitást fejthetnek ki. Ehhez hasonló hatást mértem a vizsgálatom során. Ezen moduláció pontos leírásához további vizsgálatok elvégzése szükséges.

A változás valószínűleg módosítja az enzim katalitikus pontját, különösen alacsony tanninkoncentrációk mellett. Ezen kívül, a semleges közegben a H^+ ionok nagyobb koncentrációja jelentős eltolódást eredményezett a rendszerben, amely hozzájárult a gátlási tendencia erősödéséhez és a gátlás abszolút hatásának megjelenéséhez a referenciaadatokhoz képest.

A méréseim alapján megállapítottam, hogy egyes gátlószerek esetében a vizsgálati pH érték jelentősen befolyásolja az eredményeket, éppen ezért jelentős lehet és érdemes a kifejtés helyén fellépő körülményeket modellezni és nem feltétlenül ragaszkodni az ideális viszonyokhoz.

A gyomor-lipázzal (RGE) pH 5,5-ön végzett kísérlet során klasszikus gátlás volt tapasztalható mindhárom vizsgált készítménynél (Q, T, C). A gátló anyag koncentrációjának növelésével csökkent a specifikus aktivitás, a tendencia monoton csökkent, de az egyes tanninok között volt eltérés a trendben, amiket a kísérleti eredmények ábrái szépen szemléltetnek. Minden koncentrációnál észlelhető volt a gátló hatás; az enzimaktivitások alacsonyabbak voltak a referenciaértékekhez képest.

Az almatörköly kivonat sem a PL, sem a RGE aktivitását nem befolyásolta szignifikánsan, mivel az eredmények nem mutattak szignifikáns eltérést a referenciaértékhez képest.

A mérések eredményei, különösen a hasnyálmirigy-lipáz esetében, alacsonyabb enzimaktivitásokat mutattak ki a szakirodalomban leírtakkal ellentétben. Ennek oka lehet az enzimpreparátumok hosszas tárolási ideje, vagy a méréseket megelőző helytelen felhasználás (hidegen kinyitás, hosszas levegőn tartás stb.).

A módszer megbízhatóságát és érzékenységét bizonyította, hogy az alacsony aktivitási szintek között is szignifikáns különbségeket lehetett kimutatni.

Az RGE pH 3,0-n mért enzimaktivitásának hiánya valószínűleg annak köszönhető, hogy nem az enzim katalitikus optimális pH-ján történt a mérés, ami így nem eredményezett kimutatható hidrolízist. Ezt tovább súlyosbítja, hogy még optimális körülmények között is nagyon alacsony aktivitás értékeket mértem, és kimutatási határon kívül esik a hidrolízis vizsgálata a beállított körülményekkel.

Javasolt további kísérletek elvégzése a PL esetében, mindig mindkét pH értéken, hiszen az eredmények teljesen eltérőek lehetnek a „felhasználás” helyén, mint az ideális körülmények között, ami feltehetően inkább a tanninok tulajdonságai miatt alakul ki és más bioaktívok esetén is igaz lehet, valamint a tanninok és enzimek közötti kölcsönhatások pontosabb megértésére, különösen lúgos közegben. Fontos lenne meghatározni az emulzióképződés mértékét és változását az emulgeált lipid cseppek mérete alapján eltérő pH szinten és tanninkoncentrációnál.

A méréseket ki lehetne egészíteni további, növelt tanninkoncentrációjú mérési pontokkal a gátló tendencia linearitásának vizsgálatára.

Érdekes lehet meghatározni az enzimaktivitásokat hosszabb időintervallumokon, mint a mérésben használt 300 s, az enzimaktivitást módosító tényezők a katalízis lefolyására gyakorolt hatásának további vizsgálatára.

6 Összefoglalás

A PL és RGE enzimkészítmények felhasználásával lipáz enzimek specifikus aktivitás vizsgálatát végeztem a Grundy és mtsai. 2021 alapján, pH stat módszerrel. Végeztem kísérletet a protokolltól eltérő körülményeken is, mint eltérő pH értékeken.

Megállapítottam, hogy az kidolgozott pH stat módszer és berendezés alkalmas lipáz enzim aktivitásának mérésére, továbbá bemutattam, hogy a módszer megbízható és alacsony kimutatási határral rendelkezik.

A mérésem kiterjedt mindkét enzim esetében a specifikus enzimaktivitások (U/mg) vizsgálatára, amit több enzimkoncentráció beállításával határoztam meg. A specifikus aktivitás értékek azonosak voltak, szignifikáns különbség nem volt az adathalmazok között.

Vizsgáltam enzim gátló anyagok hatását, és megállapítottam, hogy mindhárom vizsgált – kondenzált tannin, gallotannin és ellagitannin tartalmú – tannin kivonat képes volt gátolni mindkét enzimet.

Ennek a nemvárt eltolódás az okának (a protokollban meghatározott pH 8,00-án) részletes feltárásához további kísérleteket kell végezni.

A pH 3,00-án végzett RGE enzimes vizsgálat eredménytelensége az enzim optimumán kívül eső pH értéknek és az optimális környezetben alapvetően is alacsony aktivitás szintnek köszönhető. Nem optimális pH értéken az enzim nem tudott a módszerrel kimutatható aktivitást produkálni.

Az almatörköly kivonatok egyike sem gyakorolt hatást az enzimaktivitásra az adott beállításokkal.

7 Irodalomjegyzék

- Acevedo-Fani, Alejandra, és Harjinder Singh. 2022. „Biophysical insights into modulating lipid digestion in food emulsions”. *Progress in Lipid Research* 85 (január):101129. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101129>.
- Adamczyk, Bartosz, Sylwia Adamczyk, Aino Smolander, és Veikko Kitunen. 2011. „Tannic acid and Norway spruce condensed tannins can precipitate various organic nitrogen compounds”. *Soil Biology and Biochemistry* 43 (3): 628–37. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.034>.
- Adamczyk, Bartosz, Maarit Karonen, Sylwia Adamczyk, Marica T. Engström, Tapio Laakso, Pekka Saranpää, Veikko Kitunen, Aino Smolander, és Judy Simon. 2017. „Tannins can slow-down but also speed-up soil enzymatic activity in boreal forest”. *Soil Biology and Biochemistry* 107 (április):60–67. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.12.027>.
- Adamczyk, Bartosz, Judy Simon, Veikko Kitunen, Sylwia Adamczyk, és Aino Smolander. 2017. „Tannins and Their Complex Interaction with Different Organic Nitrogen Compounds and Enzymes: Old Paradigms versus Recent Advances”. *ChemistryOpen* 6 (5): 610–14. <https://doi.org/10.1002/open.201700113>.
- Alkanhal, H. A., J. F. Frank, és G. L. Christen. 1985. „Measurement of Microbial Protease Activity Using a pH-Stat Titration”. *Journal of Food Protection* 48 (4): 351–54. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-48.4.351>.
- Bhushan, Shashi, Kalpana Kalia, Madhu Sharma, Bikram Singh, és P. S. Ahuja. 2008. „Processing of Apple Pomace for Bioactive Molecules”. *Critical Reviews in Biotechnology* 28 (4): 285–96. <https://doi.org/10.1080/07388550802368895>.
- Boppana, Naga P. D., Robyn A. Snow, Paul S. Simone Jr., Gary L. Emmert, és Michael A. Brown. 2023. „Automated system for performing pH-based titrations”. *Instrumentation Science & Technology* 51 (5): 574–90. <https://doi.org/10.1080/10739149.2023.2180031>.
- Brodkorb, André, Lotti Egger, Marie Alminger, Paula Alvito, Ricardo Assunção, Simon Ballance, Torsten Bohn, és mtsai. 2019. „INFOGEST Static in Vitro Simulation of Gastrointestinal Food Digestion”. *Nature Protocols* 14 (4): 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>.
- Burdge, Graham C., és Philip C. Calder. 2015. „Introduction to Fatty Acids and Lipids”. In *World Review of Nutrition and Dietetics*, szerkesztette P.C. Calder, D.L. Waitzberg, és B. Koletzko, 112:1–16. S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000365423>.
- Castillo, Edmundo, Leticia Casas-Godoy, és Georgina Sandoval. 2016. „Medium-Engineering: A Useful Tool for Modulating Lipase Activity and Selectivity”. *Biocatalysis* 1 (1): 178–88. <https://doi.org/10.1515/boca-2015-0013>.
- Chapus, Catherine, Michel Semeriva, Christian Bovier-Lapierre, és Pierre Desnuelle. 1976. „Mechanism of Pancreatic Lipase Action. 1. Interfacial Activation of Pancreatic Lipase”. *Biochemistry* 15 (23): 4980–87. <https://doi.org/10.1021/bi00668a006>.
- Chung, Jiwhey, és Angelo M. Scanu. 1974. „Continuous pH-Stat Titration Method for the Assay of Lipoprotein Lipase Activity in Vitro”. *Analytical Biochemistry* 62 (1): 134–48. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(74\)90374-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(74)90374-1).
- De Jesus, Neyres Zinia Taveira, Heloina de Souza Falcão, Isis Fernandes Gomes, Thiago Jose de Almeida Leite, Gedson Rodrigues de Moraes Lima, Jose Maria Barbosa-Filho, Josean Fachine Tavares, Marcelo Sobral da Silva, Petrônio Filgueiras de Athayde-Filho, és Leonia Maria Batista. 2012. „Tannins, Peptic Ulcers and Related Mechanisms”. *International Journal of Molecular Sciences* 13 (3): 3203–28. <https://doi.org/10.3390/ijms13033203>.

- Dupont, D., M. Alric, S. Blanquet-Diot, G. Bornhorst, C. Cueva, A. Deglaire, S. Denis, és mtsai. 2019. „Can Dynamic in Vitro Digestion Systems Mimic the Physiological Reality?” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59 (10): 1546–62. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1421900>.
- Dupont, Didier, Alessandra Bordon, Andre Brodkorb, Francesco Capozzi, Tanja Cirkovic Velickovic, Milena Corredig, Paul D. Cotter, és mtsai. 2011. „An International Network for Improving Health Properties of Food by Sharing Our Knowledge on the Digestive Process”. *Food Digestion* 2 (1–3): 23–25. <https://doi.org/10.1007/s13228-011-0011-8>.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA). 2010. „Scientific Opinion on Dietary Reference Values for Fats, Including Saturated Fatty Acids, Polyunsaturated Fatty Acids, Monounsaturated Fatty Acids, Trans Fatty Acids, and Cholesterol”. *EFSA Journal* 8 (3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1461>.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2017. „Dietary Reference Values for Nutrients Summary Report”. *EFSA Supporting Publications* 14 (12). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.e15121>.
- Ficara, Elena, Alberto Rozzi, és Paola Cortelezzi. 2003. „Theory of pH-stat Titration”. *Biotechnology and Bioengineering* 82 (1): 28–37. <https://doi.org/10.1002/bit.10541>.
- Gandhi, Neena N. 1997. „Applications of Lipase”. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74 (6): 621–34. <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0194-x>.
- Grundy, Myriam M. L., Evan Abrahamse, Annette Almgren, Marie Alminger, Ana Andres, Renata M. C. Ariëns, Shanna Bastiaan-Net, és mtsai. 2021. „INFOGEST inter-laboratory recommendations for assaying gastric and pancreatic lipases activities prior to *in vitro* digestion studies”. *Journal of Functional Foods* 82 (július):104497. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104497>.
- Hagerman, Ann E. 2012. „Fifty Years of Polyphenol–Protein Complexes”. In *Recent Advances in Polyphenol Research*, 71–97. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118299753.ch3>.
- Hofmann, A. F. 1963. „THE FUNCTION OF BILE SALTS IN FAT ABSORPTION. THE SOLVENT PROPERTIES OF DILUTE MICELLAR SOLUTIONS OF CONJUGATED BILE SALTS”. *The Biochemical Journal* 89 (1): 57–68. <https://doi.org/10.1042/bj0890057>.
- Hussain, Ghulam, Jing Wang, Azhar Rasul, Haseeb Anwar, Ali Imran, Muhammad Qasim, Shamaila Zafar, és mtsai. 2019. „Role of Cholesterol and Sphingolipids in Brain Development and Neurological Diseases”. *Lipids in Health and Disease* 18 (1): 26. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-0965-z>.
- Ikarashi, Nobutomo, Rumi Takeda, Kiyomi Ito, Wataru Ochiai, és Kiyoshi Sugiyama. 2011. „The Inhibition of Lipase and Glucosidase Activities by Acacia Polyphenol”. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM* 2011:272075. <https://doi.org/10.1093/ecam/neq043>.
- Innis, Sheila M. 2011. „Dietary Triacylglycerol Structure and Its Role in Infant Nutrition”. *Advances in Nutrition* 2 (3): 275–83. <https://doi.org/10.3945/an.111.000448>.
- Karamali Khanbabaee, Teunis van Ree. 2001a. „Tannins: Classification and Definition”. *Natural Product Reports* 18 (6): 641–49. <https://doi.org/10.1039/b101061l>.
- . 2001b. „Tannins: Classification and Definition”. *Natural Product Reports* 18 (6): 641–49. <https://doi.org/10.1039/b101061l>.
- Krasnova, I., és D. Seglina. 2019. „Content of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Fresh Apple, Pomace and Pomace Water Extract — Effect of Cultivar”. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences (Latvia)* 73 (6). <https://agris.fao.org/search/en/providers/122652/records/64747361a4e07c0bc4c025f4>.

- Kumar, Ashwani, és Shilpi Chauhan. 2021. „Pancreatic lipase inhibitors: The road voyaged and successes”. *Life Sciences* 271 (április):119115. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119115>.
- Li, Yan, Min Hu, Yumin Du, Hang Xiao, és David Julian McClements. 2011. „Control of lipase digestibility of emulsified lipids by encapsulation within calcium alginate beads”. *Food Hydrocolloids* 25 (1): 122–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.06.003>.
- Li, Yan, Min Hu, és David Julian McClements. 2011. „Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an *in vitro* digestion model: Proposal for a standardised pH-stat method”. *Food Chemistry* 126 (2): 498–505. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.027>.
- Maccà, Carlo, Lidia Soldà, és Mirella Zancato. 2002. „pH-stat techniques in titrimetric analysis: IV. pH-stat monitoring of chelatometric titrations”. *Analytica Chimica Acta* 470 (2): 277–88. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00691-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00691-8).
- McClements, D.J., E.A. Decker, és J. Weiss. 2007. „Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components”. *Journal of Food Science* 72 (8). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x>.
- Mendes, Adriano A., Pedro C. Oliveira, és Heizir F. de Castro. 2012. „Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 78 (június):119–34. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.03.004>.
- Minekus, M., M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carrière, és mtsai. 2014. „A Standardised Static *in Vitro* Digestion Method Suitable for Food – an International Consensus”. *Food & Function* 5 (6): 1113–24. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>.
- Okuda, Takuo, és Hideyuki Ito. 2011. „Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants—Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins”. *Molecules* 16 (3): 2191–2217. <https://doi.org/10.3390/molecules16032191>.
- Oliveira, Roselene Ferreira, Geferson Almeida Gonçalves, Fabíola Dorneles Inácio, Eloá Angélica Koehnlein, Cristina Giatti Marques de Souza, Adelar Bracht, és Rosane Marina Peralta. 2015. „Inhibition of Pancreatic Lipase and Triacylglycerol Intestinal Absorption by a Pinhão Coat (*Araucaria angustifolia*) Extract Rich in Condensed Tannin”. *Nutrients* 7 (7): 5601–14. <https://doi.org/10.3390/nu7075242>.
- Pantel, Siegbert. 1979. „The application of the ph-stat method to metal ion-catalyzed reactions”. *Analytica Chimica Acta* 104 (2): 205–13. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)84002-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)84002-2).
- Ratnayake, W.M. Nimal, és Claudio Galli. 2009. „Fat and Fatty Acid Terminology, Methods of Analysis and Fat Digestion and Metabolism: A Background Review Paper”. *Annals of Nutrition and Metabolism* 55 (1–3): 8–43. <https://doi.org/10.1159/000228994>.
- Roussel, Alain, Stéphane Canaan, Marie-Pierre Egloff, Mireille Rivière, Liliane Dupuis, Robert Verger, és Christian Cambillau. 1999. „Crystal Structure of Human Gastric Lipase and Model of Lysosomal Acid Lipase, Two Lipolytic Enzymes of Medical Interest *”. *Journal of Biological Chemistry* 274 (24): 16995–2. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16995>.
- Shalini, Rachana, és D. K. Gupta. 2010. „Utilization of Pomace from Apple Processing Industries: A Review”. *Journal of Food Science and Technology* 47 (4): 365–71. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0061-x>.
- Sieniawska, E., és T. Baj. 2017. „Tannins”. In *Pharmacognosy*, 199–232. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00010-X>.
- Smeriglio, Antonella, Davide Barreca, Ersilia Bellocco, és Domenico Trombetta. 2017. „Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and

- pharmacological effects". *British Journal of Pharmacology* 174 (11): 1244–62. <https://doi.org/10.1111/bph.13630>.
- Stymne, Sten, és Allan Keith Stobart. 1987. „Triacylglycerol Biosynthesis”. In *Lipids: Structure and Function*, 175–214. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-675409-4.50014-9>.

8 Táblázatok és ábrák jegyzéke

Ábra 1	Triglicerid molekula általános felépítése (forrás: Stymne és Stobart 1987)	6
Ábra 2	Lipáz enzimek által katalizált reakciók (forrás: Castillo, Casas-Godoy, és Sandoval 2016)	8
Ábra 3	A hasnyálmirigy-lipáz szerkezete: Zöld szín az N-terminális domén, sárga szín a katalitikus hely, lila szín a C-terminális domén, türkiz szín a ko-lipáz, kék szín a tető domén és vörös szín katalitikus hely (forrás: Kumar és Chauhan 2021)	10
Ábra 4	A gyomor-lipáz szerkezete: magenta színű az α/β hidroláz magdomén tetején lévő tetődomén; zöld színű a katalitikus helyet takaró feltételezett fedél; piros színű az α/β hidroláz redő; kék színűek a szálak; sárga színűek a fordulatok és a random tekercsek (forrás: Roussel és mtsai. 1999)	10
Ábra 5	Tanninok csoportosítása (forrás: Karamali Khanbabaee 2001b)	12
Ábra 6	Titrandó 902 berendezés (forrás: https://www.metrohm.com/hu_hu/products/2/9020/29020010.html)	20
Ábra 7	PL enzim aktivitásának mérése pH 8,00 értéken folyamatába, közegoldat összetételével és a bemeneti anyagokkal (forrás: saját készítés)	22
Ábra 8	PL enzim aktivitásának mérése pH 7,00 értéken folyamatába közegoldat összetételével és a bemeneti anyagokkal (forrás: saját készítés)	23
Ábra 9	RGE enzim aktivitásának mérése pH 5,50 értéken folyamatába, közegoldat összetételével és a bemeneti anyagokkal (forrás: saját készítés)	24
Ábra 10	RGE enzim aktivitásának mérése pH 3,00 értéken folyamatába, közegoldat összetételével és a bemeneti anyagokkal	25
Ábra 11	PL enzim eltérő enzimmennyiségeken mért specifikus aktivitásának eredményei (forrás: saját készítés)	29
Ábra 12	RGE enzim eltérő enzimmennyiségeken mért specifikus aktivitásának eredményei (forrás: saját készítés)	29

Ábra 13 PL enzim gátlás ábrája SilvaTeam WellTan Q, kondenzált tanninkivonattal (forrás: saját készítés)	31
Ábra 14 PL enzim gátlása ellagitannin kivonattal (C) 0,3 %, 0,6 %, 0,9 %; pH 8 (forrás: saját készítés).....	32
Ábra 15 PL enzim gátlása gallotannin kivonattal (T) 0,3 %, 0,6 %, 0,9 %; pH 8 (forrás: saját készítés).....	33
Ábra 16 PL enzim gátlása almatörköly kivonatokkal: vizes és acetonos; pH 8 (forrás: saját készítés).....	34
Ábra 17 PL enzim gátlása kondenzált tannin kivonattal (Q) 0,3%, 0,6%, 0,9%; pH 7-en (forrás: saját készítés)	35
Ábra 18 RGE enzim gátlása kondenzált tanninkivonattal (Q) 0,3%, 0,6%, 0,9%; pH 5,5 (forrás: saját készítés)	36
Ábra 19 RGE enzim gátlása ellagitannin kivonattal (C) 0,3%, 0,6%, 0,9%; pH 5,5 (forrás: saját készítés).....	37
Ábra 20 RGE enzim gátlása gallotannin kivonattal (T) 0,3%, 0,6%, 0,9%; pH 5,5 (forrás: saját készítés).....	38
Ábra 21 RGE enzim gátlása almatörköly kivonatokkal: vizes és acetonos; pH 5,5 (forrás: saját készítés).....	38
 Képlet 1 Lipázok katalizálta hidrolízis: zsír/észter szétválasztása savra és glicerinné/alkoholra víz jelenlétében (forrás: saját készítés).....	7
Képlet 2 PL enzim készítmény specifikus aktivitásának képlete: ΔV – a pH stat mérés két időpontja között fogyott NaOH térfogata (μL); t – idő percben; N – NaOH normalitása; C – enzimkészítmény koncentrációja (mg/mL); v – enzim oldat térfogata (μL) (forrás: saját)	26
Képlet 3 RGE (Nyúl Gyomor Enzim) készítmény specifikus aktivitásának képlete: ΔV – a pH stat mérés két időpontja között fogyott NaOH térfogata (μL); t – idő percben; N – NaOH normalitása; C – enzimkészítmény koncentrációja (mg/mL); v – enzim oldat térfogata (μL .	26
Képlet 4 M% - moduláció mértéke %-ban; S _{Ai} - specifikus aktivitás az egyes gátlási szinteken; S _{A0} - specifikus aktivitás inhibitor nélkül (forrás: saját készítés).....	39
 Táblázat 1 Inhibitor nélküli enzimes mérések összeállítása (forrás: saját készítés)	26
Táblázat 2 Teljes kísérleti összeállítás: PL – hasnyálmirigy-lipáz; RGE – gyomor-lipáz; Q - nem hidrolizálható tannin kivonat; C - hidrolizálható tanninkivonat; T - hidrolizálható tanninkivonat (forrás: saját készítés).....	27

Táblázat 3 Enzimaktivitás változásainak összefoglalása, a moduláció mértéke. A táblázat csak azokat az eseteket taglalja, ahol az adott beállítás adathalmaza szignifikánsan eltért a referenciától. A sárgával kiemelt eredmény negatív inhibíció, tehát aktiváció, ahol az enzimaktivitás növekedett. (forrás: saját készítés) 40

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Bóday Ábel Barnabás
A Hallgató Neptun kódja: NVCWIS
A dolgozat címe: A pH stat módszer alkalmazása lipáz enzim aktivitásának meghatározására és bioaktívok hatásának vizsgálatára
A megjelenés éve: 2024
A konzulens intézetének neve: Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Élelmiszerkémia és -Analitika Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlant állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumába. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után

nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumában.

Kelt: Budapest, 2024. 11. 01.



Hallgató aláírása

NYILATKOZAT

Bóday Ábel Barnabás (hallgató Neptun azonosítója: NVCWIS) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Kelt: Budapest, 2024. 10.31.



belső konzulens