

# **DIPLOMADOLGOZAT**

**Mudri Csenge Kriszta**

**2023.**



**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem  
Budai Campus  
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet  
Élelmiszerbiztonsági- és minőségi mérnök  
mesterképzési szak**

**MÓDSZERFEJLESZTÉS EMÉSZTHETŐ  
SZÉNHIDRÁTTARTALOM  
FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS  
MEGHATÁROZÁSÁRA**

**Belső konzulens:** Benes Eszter Luca  
egyetemi tanársegéd

**Belső konzulens  
intézete/tanszéke:** Élelmiszerkémiai és  
Analitikai Tanszék

**Készítette:** Mudri Csenge Kriszta

**Budapest  
2023.**

# Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések.....	1
2. Irodalmi áttekintés.....	2
2.1. Szénhidrátok .....	2
2.2. Emészthető szénhidrátok .....	4
2.3. Nem emészthető szénhidrátok .....	5
2.4. Rezisztens keményítő.....	5
2.5. Szénhidrátok emésztése .....	6
2.6. Szénhidrátok analitikai meghatározása.....	7
3. Anyagok és módszerek.....	11
3.1. Vizsgált minták .....	11
3.2. Felhasznált vegyszerek, reagensek .....	12
3.3. Módszerek.....	13
3.3.1. Nedvességtartalom meghatározása.....	13
3.3.2. Redukáló cukortartalom meghatározása Luff-Schoorl módszerrel .....	13
3.3.3. Megazyme: Emészthető és rezisztens keményítő meghatározása.....	14
3.3.4. Emésztés szimuláció: Infogest Protokoll.....	16
3.3.5. HPLC-RID módszer .....	18
4. Eredmények és értékelésük .....	20
4.1. Luff-Schoorl módszer eredményei .....	20
4.2. Megazyme módszer eredményei.....	22
4.3. Infogest Protocol eredményei .....	26
5. Következtetések .....	32
6. Összefoglalás .....	33
Irodalmi hivatkozás.....	35

# 1. Bevezetés és célkitűzések

A szénhidrátok a Földön található szerves anyagok közül a legnagyobb mennyiségben előforduló biomolekulák. Élettani szerepük sokféle lehet nem csak az emberek, de növények és állatok számára is fontos vegyületek tartoznak ebbe a csoportba. Az emberi szervezet megfelelő működéséhez elengedhetetlen a megfelelő minőségű és mennyiségű szénhidrát bevitele, amely az emésztés során valamilyen módon és formában hasznosul. Az élelmiszerek emészthető szénhidráttartalma alatt az adott termékben előforduló mono-, diszacharidok (cukrok) és a keményítő emészthető frakciójának összességét értjük.

Az élelmiszerekben található szénhidrátok mennyiségi meghatározása és jellemzése elengedhetetlen feladat, hiszen felszívódásukról is képet kaphatunk, illetve számos szénhidrát molekula jelenléte a szervezetben heves válaszreakciókat eredményezhet (pl. laktóz). Ezeknek a meghatározása a mai napig nem triviális analitikai feladat. Az élelmiszerek cukortartalmának meghatározására elterjedten a klasszikus titrimetriás Schoorl módszert alkalmazzák. Ez a módszer viszont nem ad információt a mintában előforduló emészthető keményítő mennyiségéről, mely az emésztés során szintén cukorként hasznosul. A hagyományos módszereken kívül, különböző enzimes kit-es módszerekkel is meg tudjuk határozni a minták szénhidráttartalmát. Manapság már számos ilyen módszer fellelhető és további fejlesztések is várhatóak még a jövőben. A cél, hogy minél rövidebb idő alatt a lehető legegyszerűbben lehessen meghatározni a különböző szénhidrátokat bármilyen összetételű élelmiszer-mátrixban.

A diplomamunkám során különböző szénhidrát analitikai módszereket vizsgáltam, elsősorban a folyadékkromatográfia és a törésmutató mérésén alapuló detektálás (HPLC-RID) alkalmazásának lehetőségét ezekkel összefüggésben. A kutatás során arra kerestem választ, hogy a hagyományosan alkalmazott Schoorl-módszer extrakciója után helyettesíthető-e a titrimetriás meghatározás, illetve az enzimes emészthető keményítőtartalom meghatározás során a spektrofotometriás detektálás HPLC-RID módszerrel. Továbbá vizsgálni szeretném, hogy kialakítható-e egy a folyadékkromatográfias analízist megelőző egységes minta-előkészítési eljárás, ami egyaránt alkalmazható a termék cukor-, és a termék keményítővizsgálata esetén, mesterséges emésztésszimuláció során keletkezett emésztmény-minták vizsgálatára.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Szénhidrátok

A szénhidrátok a legnagyobb mennyiségben előforduló szerves anyagok. Általános képletük összegképletük  $(CH_2O)_n$ , ahol  $n \geq 3$  (Csapó & Csapóné Kiss, 2003). A szénhidrátok csoportosítását kémiai szerkezetük alapján az 1. táblázat foglalja össze. Monoszacharidok olyan szénhidrát molekulák, melyek hidrolízis hatására nem esnek szét kisebb molekulákra, egy cukor monomerből állnak. Az oligoszacharidok olyan molekulák, amelyekben 3-9 monoszacharid egység kapcsolódik össze. A poliszacharidok a legnagyobb méretű szénhidrát komponensek. Ezek a molekulák a monoszacharidok polimerjei, számos cukoregység található bennük ( $20 <$ ), melyek szintén glikozidos kötésekkel kapcsolódnak össze (BeMiller, 2018).

#### 1. táblázat: Szénhidrátok csoportosítása (http1)

SZÉNHIDRÁTOK				
Egyszerű szénhidrátok			Összetett szénhidrátok	
monoszacharidok (egy cukoregységből állnak)	diszacharidok (két cukoregységből állnak)	cukoralkoholok	oligoszacharidok (3-9 cukoregységből állnak)	poliszacharidok (több mint 9 cukoregységből állnak)
Például: glükóz/szőlőcukor, fruktóz/gyümölcs-cukor, galaktóz/nyákcukor	Például: szacharóz/répacukor (glükóz+fruktóz), laktóz/tejcukor (glükóz+galaktóz), maltóz/malátacukor (glükóz+glükóz)	Például: xilit (nyírfacukor), szorbit, mannit	Például: maltodextrinek, raffinóz, sztachióz, frukto-, galakto-, malto-, xilo-oligoszacharidok	Például: a keményítő (amilóz, amilopektin), glikogén, cellulóz, pektinek, inulin, növényi gumik, nyálcukor

A szénhidrátok, cukrok, keményítő és nem keményítő tartalmú poliszacharidok, az emberi táplálkozás fő energiaforrásai, melyek támogatják a szervezet anyagcseréjét. A növényi eredetű élelmiszerek, például gyümölcsök, zöldségek, ehető magvak, gabonafélék, hüvelyesek és teljes kiőrlésű gabonafélék megbízható szénhidrátforrások az ember számára. A szénhidrátok minősége nagymértékben függ a szénhidrátok típusától, forrásától, az egyéb élelmiszerösszetevőkkel való kölcsönhatásától, szerkezetüktől, az élelmiszerek feldolgozási módszerétől (Englyst & Englyst, 2005). A szénhidrátok kémiai osztályozásán túlmenően fontos a táplálkozási hatásuk szempontjából is figyelembe venni. A glikémiás szénhidrátok

a vékonybélben emésztődnek meg és szívódnak fel, energiát biztosítanak a testsejtek számára, miközben a nem emészthető szénhidrátok (más néven élelmi rostok) a vastagbélbe jutnak, ahol szubsztrátot képeznek a vastagbél mikroflóra számára.

A szénhidrátok világviszonylatban a kalóriabevitel legalább háromnegyedét biztosítják, továbbá nemcsak energiaforrásként, hanem élelmiszerek összetevőjeként is fontosak (pl. állománykialakítás). A természetben előforduló és módosított szénhidrátokat számos élelmiszerben felhasználják, mivel sokféle funkciót biztosítanak (BeMiller, 2018).

## **2. táblázat:** Gabonafélék, kenyerek, pékáruk tápérték táblázata (részlet)

(Forrás: *Tápértékjelölésről, 2016, [http2](#)*)

<b>Élelmiszerek, nyersanyagok [100 g]</b>	<b>Szénhidrát [g]</b>
Rizs	77,5
Burgonyakeményítő	83,1
Búzaliszt	76,3
Zsemlemorzsa	73,3
Kenyér	53,5
Rozskenyér	53,6
2 tojásos száraztészta	70,2
4 tojásos száraztészta	72,9
8 tojás száraztészta	69,3
Durum tészta	73,0

A sütőipari termékek, különösen a kenyér fejlődéstörténete az őskorig nyúlik vissza. A búza felfedezése után, ekkor még összekeverték a búzadarát vízzel és forró köveken sütötték meg. Manapság a sütőipari termékeket, pékárukat, kenyereket nagyfokú változatosság jellemzi, az egyszerű összetételű termékektől a bonyolultabb, több komponensű termékekig. A termékek fejlesztése a technológiai fejlődést is magával vonta és a trendek követése, új termékek piacra kerülése az iparág további fejlődését rejti (Zhou és mtsai., 2014). A fehér kenyér egy viszonylag egyszerű termék, fő összetevői búzaliszt, víz, élesztő, cukor és só, azonban ennek ellenére is többféle tápanyagforrást tartalmaz, mint például az összetett

szénhidrátokat. A kenyér azonban nagy mennyiségű gyorsan emészthető keményítőt (*rapidly digestible starch*, RDS) tartalmaz (~ 40 g RDS/100 g kenyér) amely nemkívánatos vércukorszint-emelkedést okoz az elfogyasztás után. Ezért az alacsony glikémiás indexű, alacsony szénhidrát-tartalmú kenyereket széles körben gyártják és teljes kiőrlésű lisztek vagy rostok közvetlen vagy közvetett hozzáadásával növelik a rosttartalmat, mely számos egészségügyi előnyel jár (Tien és munkatársai, 2018). A keményítő a búzaliszt 70-85 %-át teszi ki, a glutén után a búza második legfontosabb összetevője. Amikor a búzában lévő keményítőszemcsék lisztben hidratálódnak, szárazanyaguk tömegének akár az 50%-át is felveszik és enyhén reverzibilisen megduzzadnak. A keményítő és a glutén a tésztaiban olyan stabil hálózatot hoz létre, amely képes megtartani az erjedési gázt a tészta szerkezetében, és megakadályozza a kenyér összeesését sütés és hűtés közben (Calvin, 2016).

## **2.2. Emészthető szénhidrátok**

Az emészthető szénhidrátok a legfontosabb „biológiai üzemanyagok” az emberi szervezet számára. A mono-, di-, és oligoszacharidok, valamint a keményítő az emészthető szénhidrátok közé sorolhatók. A monoszacharidok, mint például a glükóz, fruktóz és a galaktóz természetesen fordulnak elő az élelmiszerekben és közvetlenül a véráramban szívódnak fel. A diszacharidok, mint a szacharóz, maltóz és a laktóz, könnyen lebomlanak monoszacharid alkotóelemeire a természetben előforduló diszacharid lebontó enzimek (szukráz, laktáz) hatására. Ennek eredményeképpen a mono-, és diszacharidok gyors forrásai a könnyen emészthető szénhidrátoknak az emberi táplálkozásban (Leong és munkatársai, 2019).

A keményítő két részből áll: lineáris láncú amilózból (20-30%) és az elágazó amilopektinből (70%-80%), melyek közül az utóbbi járul hozzá a keményítő kristályosságához. A keményítő a természetben félkristályos és vízben nem oldódó szemcsék formájában is előfordul, mely polimorf típusaik és kristályossági fokuk szerint változik (Lehmann & Robin, 2007). A keményítő a szénhidrát egyik fő formája a táplálkozásban. A vékonybélben az emésztőenzimek glükóz molekulákká bontják le, amely aztán felszívódik a vérbe és a szervezet számára energiaforrásként szolgál. A táplálékban lévő keményítő egy része azonban ellenáll az emésztésnek és a vastagbélbe kerül (Lunn & Buttriss, 2007).

## 2.3. Nem emészthető szénhidrátok

Az egyszerű és könnyen emészthető szénhidrátokhoz képest a nem emészthető szénhidrátok azok, amelyeket az emberi emésztő enzimek nem tudnak hidrolizálni, ezáltal nem tudnak felszívódni az emberi szervezetben, a felső tápcsatornában. Nem emészthető szénhidrátok közé tartoznak a nem keményítő poliszacharidok (NSP, *non-starch polysaccharides*), a  $\beta$ -diszacharidok és oligoszacharidok, valamint a rezisztens keményítő. Az NSP-k a sejtfalat alkotó növényi összetevők, melyek az élelmi rostok közé sorolhatók. A legtöbb nem emészthető szénhidrát polimerek különböző monoszacharid egységekből állnak, amelyeket  $\beta$ -glikozidos kötések kötnek össze. Az emberi emésztőrendszer enzimeit nem képesek az ilyen típusú kötések felbontására, ezért az emészthetetlen szénhidrátok a vastagbélbe jutnak, ahol fermentálódnak baktériumok segítségével (Lovegrove és munkatársai, 2017).

### 2.3.1. Rezisztens keményítő

A rezisztens keményítő Fuentes-Zaragoza és munkatársai (2011), illetve Raigond és munkatársai (2015) szerint öt típusra osztható attól függően, hogy az emberi szervezetben az emésztési mechanizmusoknak hogyan áll ellen. Az RS1 típus a fizikailag hozzáférhetetlen keményítő, amely a sejtfal gátja miatt nem hidrolizálható. Ez a típus főleg örölt vagy egész gabonából készült sütőipari termékekben fordul elő. Az RS2 a keményítő kristályos szerkezete miatt nem emésztődik meg. Ez nyers élelmiszerekben, pl.: burgonyában fordul elő. Az RS3 típust retrográd keményítőnek is nevezik. Ez akkor keletkezik amikor a keményítőtartalmú élelmiszereket megfőzik majd lehűtik. Az amilopektinek elágazó láncai által alkotott kettős spirál szerkezet miatt az emésztőenzimek nem tudják hidrolizálni a keményítőt. Olyan keményítőtartalmú élelmiszerekben fordul elő, amit megfőztek, majd lehűtöttek, mint pl.: főtt tészta, burgonya. Az RS4 olyan keményítő, amely a kémiai módosítása révén áll ellen az emésztésnek. Jellemzően a kereskedelmi forgalomban lévő módosított keményítőt tartalmazó kenyér-, és pékárufélékben fordul ez elő. Az RS5 egy olyan típusa a rezisztens keményítőnek, melyekben a keményítő láncok és a szabad zsírsavak komplexet képeznek és spirális szerkezetük révén nehezen emészthetőek.

A rezisztens keményítő tehát az élelmiszerek széles skálájában megtalálható, beleértve a teljes kiőrlésű gabonaféléket, hüvelyeseket, tésztaféléket, éretlen banánt, nyers burgonyát, főtt és hűtött burgonyát, valamint a kereskedelmi módosított keményítőt tartalmazó élelmiszereket (pl. kenyér, reggelizőpelyhek és energiaszelet). A rezisztens keményítő meghatározása az élelmiszerekben egy in vitro emészthetőségi teszt segítségével végezhető



el. Három különböző enzimes emésztési lépést alkalmaz, amely során az  $\alpha$ -amiláz, az amiloglükozidáz és az invertáz a keményítőt glükózzá alakítja át az emésztés végtermékét, majd ezt követően a redukáló cukor mennyiségét vizsgálják meg. Technikailag a rezisztens keményítő olyan keményítő, amely 120 perc elteltével nem emészthető az in vitro emészthetőségi vizsgálat után (Englyst, Kingman, & Cummings, 1992).

## 2.4. Szénhidrátok emésztése

A nyál amilázok az endoamilázok, vagy az  $\alpha$ -amilázok csoportjába tartoznak, amelyek katalizálják a belső  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 glikozidos kötések hidrolízisét a keményítőben. Ezzel szemben a növényi amilázok  $\beta$ -amilázok, vagy exoamilázok, amelyek a keményítő hidrolízisét a láncvégek felől katalizálják. A nyálban található amiláz képes az amilózt teljesen lebontani. A hidrolízis során maltotriózzá (glükóz triszacharidja), majd maltózzá végül glükóz polimerré hidrolizál. Az emésztés során az amilopektinből határdextrinek is keletkeznek, amelyek 5-10 maradékból álló oligoszacharidok, amelyek  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 kötések tartalmazzak, amelyek megfelelnek az amilopektin elágazási pontjainak. Normál körülmények között a nyál amiláz nem képes a keményítő teljes lebontására molekulák gyors orális tranzitja miatt (Blanco & Blanco, 2017).

A szénhidrátokat főként a glükózon keresztül használja fel a szervezet az anyagcseréhez, akár azonnal, akár glikogénként való tárolás után. A szénhidrát az emésztés és a felszívódás révén válik elérhetővé vagy közvetlenül glükóz formájában, vagy közvetve más formában fruktóz vagy galaktóz) később glükózzá metabolizálódik (Livesey, 2014).

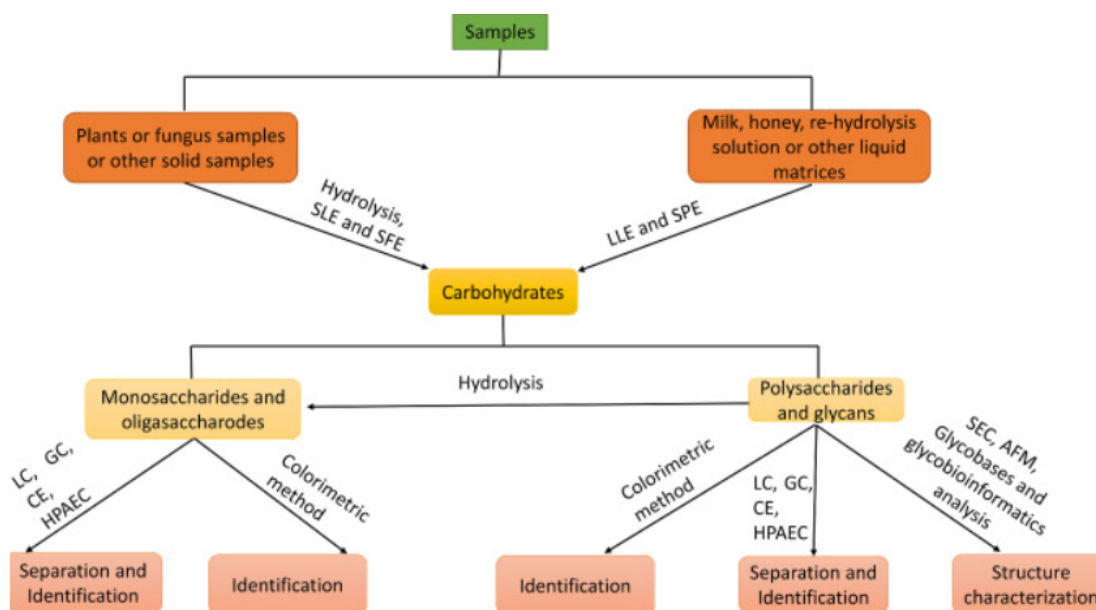
A keményítőtartalmú élelmiszerek esetében a szubsztrátok szerkezete is befolyásolja az enzimek hozzáférhetőségét és ezáltal a glikémiás választ. A keményítő hidratáltsága a hőkezelés során, amit zselatinizációnak neveznek, növeli az amilázok számára a hozzáférhetőséget (Holm és munkatársai, 1988). A kémiai szerkezet, azaz az amilóz-amilopektin arány a másik tényező, ami felelős lehet a glükóz-inzulinreakció különbségéért. A zselatinizált keményítő lehűlésekor a keményítőmolekulák átkristályosodnak, vagyis retrográd módon visszaalakulnak, amit az amilázok kevésbé emésztenek. Az amilóz képes reagálni más élelmiszerösszetevővel, befolyásolva az amilolízis sebességét (Björck és munkatársai, 1994).

A vastagbél az emberi tápcsatorna alsó részében található, amely az emberi emésztőrendszer utolsó olyan része, amely lehetővé teszi a mikrobiális tevékenység és az emberi fiziológia közötti kölcsönhatást. Az emészthetetlen szénhidrátok, mint például a rezisztens keményítő,

amelyek a gyomor-bélrendszeri-traktus felső részén megmenekülnek az emésztéstől és a vastagbélbe jutva gyakorlatilag még mindig megmaradnak polimer formában, ahol végül a vastagbélben természetesen jelen lévő mikrobiális flóra erjeszti őket. Mivel a béltartalom mozgása a vastagbélben meglehetősen lassú (48-70 óra) a gyomorban és a vékonybélben eltelt időhöz képest (4-6 óra), a béltartalom ideális szubsztrátként szolgál, amely lehetővé teszi a humán bélflóra nagy kolóniáinak elszaporodását mikrobióta kifejlődését (Panesar & Bali, 2016).

## 2.5. Szénhidrátok analitikai meghatározása

A szénhidrátokat különböző élelmiszerekben található meg, mellettük más zavaró anyagok, mint például fehérjék és lipidek lehetnek, illetve pontatlan eredményekhez vezethetnek. A minta hidrolízise és extrakciója két gyakori és alapvető minta előkészítési lépés a szénhidrátok elemzése során (Jie és munkatársai, 2021).



**1. ábra:** Stratégiák a szénhidrátok meghatározására különböző mátrixokban (Jie és munkatársai, 2021)

## **Extrakció**

Az extrakció az egyik legalapvetőbb mintaelőkészítési módszer, amelyet a szénhidrátok esetében két hagyományos módszerrel alkalmaznak: folyadék-folyadék és folyadék-szilárd. A modern oldószeres extrakciós módszerek, mint például a szuperkritikus folyadék extrakció vagy a nyomás alatt álló folyadék extrakciót (PLE) jelenleg széles körben alkalmazzák a nem poláris analitok esetében, de a szénhidrátok esetében kevésbé alkalmazható. Az extrakciót gyakran alkalmazzák a szénhidrátok tisztítására, de mivel az élelmiszer-szénhidrátok molekulatömeg-tartománya nagyon széles gyakran használják frakcionálási vagy dúsítási lépésként is. Az extrakció előtt a mintát megfelelően kondicionálni kell. A folyékony mintákat homogenizálni, a szilárd mintákat pedig őrölni kell, hogy jobban érintkezzenek az oldószerrel (Soria és munkatársai, 2012).

## **Hidrolízis**

Az oligoszacharidok és poliszacharidok hidrolízise kémiai úton (pl. savakkal) vagy enzimatis úton történhet. A hidrolízis célja az oligoszacharidok és poliszacharidok monomerekké történő bontása, melyek könnyebben elemezhetőek. Az oligoszacharidok és poliszacharidok pontos mennyiségének meghatározása, reprodukálható és sztöchiometrikus lebontásukat gondosan ellenőrizni kell. Általában az enzimatis keményítő hidrolízisét az amiloglükozidáz végzik vagy az  $\alpha$ -amiláz, vagy ezek keverékei által. A keményítő kémiai úton, koncentrált savakkal történő glükózzá történő hidrolízise (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HClO<sub>4</sub>) sokkal gyorsabb lehet. Hatékonysága azonban a mintában lévő keményítő szerkezetétől függ. Az amilóz hidrolízise (visszanyerési arány 90%) eréjesebb, hosszabb ideig tartó reakció körülményeket igényel, mint a az amilopektin hidrolízise (Raessler, 2011).

## **Különböző módszerek a szénhidráttartalom meghatározására**

### **Kolorimetriás módszerek**

Az egyik leggyakrabban használt kolorimetriés módszer a fenol-kénsavas eljárás, amely egy egyszerű és gyors kolorimetriás módszer a minta összes szénhidráttartalmának meghatározására. A koncentrált kénsav lebontja a poliszacharidokat, oligoszacharidokat, diszacharidokat monoszacharidokká (Nielsen, 2017). Fenollal és tömény kénsavval kezelve, a redukáló csoportok narancssárga színt adnak, amely elnyeli a fényt a látható-ultraibolya tartományban. A kromofór elektron spektrális átmenetei a fény abszorpcióját nagyobb

hullámhosszra tolják el (200-700 nm), amelyek alkalmasak az UV-Vis elemzésekhez (Rover és munkatársai, 2013). Egy további kolorimetriás mérési módszer, hogy a mintához antron reagenst adnak. A módszer érzékeny az alacsony szénhidrát koncentrációra és a különböző szénatomszámú szénhidrátokra. A szín kialakulása a szénhidrátból származó hidrolizátum, a furánok és az antranol közötti reakció eredménye. A reakciót követően addukt képződik, mely kromofór csoporttal rendelkezik és 620 nm-en van fényelnyelése. Az antron mennyiségi meghatározása során a kék-zöld szín megjelenése a kulcs tényező a szénhidrátminta mennyiségi meghatározásához (Haldar és munkatársai, 2017).

### **Kromatográfiai technikák**

A cukrok minőségi és mennyiségi vizsgálatának egyik leghatékonyabb meghatározási módszere a nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC). Az elemzés gyors, széles koncentráció tartományban használható és pontos eredményt ad. A monoszacharidok hasonló kémiai tulajdonságai miatt az analízisüknél számos probléma léphet fel. Többféle különböző folyadékkromatográfiai módszer alkalmazható a szénhidrátelezésben, beleértve az ionkromatográfiát (IC), a fordított fázisú- (RP, *reverse phase*), és a hidrofíl kölcsönhatási kromatográfiát (HILIC, *hydrophilic interaction liquid chromatography*). A monoszacharidok elválasztása a következők alapján végezhető el: a vegyületek polaritás különbségei (normál vagy fordított fázisú HPLC, HILIC), illetve az elektromos töltésben jelentkező különbségek alapján (IEC: kation-, anioncsere és ionkizárás) (J. Yan és munkatársai, 2016).

A közelmúltban egyre nagyobb figyelmet kap a HILIC oszlopok használata, mivel egyedülálló előnyei vannak, mint például az, hogy nincs szükség derivatizálásra, nagy felbontást biztosítanak és időtakarékos az elválasztás során (J. Yan és munkatársai, 2016). A HILIC esetében a normál fázisú kromatográfiához hasonlóan az állófázis erősen poláros míg a mozgófázis kevésbé poláros. A leggyakrabban alkalmazott mozgófázis acetonitril és vizet tartalmaz, utóbbit legfeljebb 40 v/v%-ban. A HILIC-ben a víz szolgál az erősebb oldószerként, ezáltal a víztartalom növekedése a vegyületek visszatartásának csökkenéséhez vezet. A poláris és ionizált vegyületek visszatartása általában nagyobb. A HILIC szénhidrátelezésre történő alkalmazásakor a szilika állófázis túlságosan poláris lehet a szubsztituálatlan cukrok esetében, ezért gyakran ciano-, és diol-csoportokkal módosított állófázisokat használnak. Ennek eredményeképpen a mono-, di-, és oligoszacharidok akár húsz egységig terjedő keverékei is elválaszthatók HILIC módszerrel (X. Yan, 2014).

## **Detektorok**

A szénhidrátok detektálására hagyományosa törésmutató detektort alkalmaznak (RID, *refractive index detector*). A HPLC-RID módszer egyszerű, lineáris tartománya széles. Viszont ezzel a módszerrel végzett méréseknek számos hátránya van, többek között az, hogy a mérést nem lehet gradiens elúcióval elvégezni, az alapvonal stabilizálásához szükséges idő hosszabb a mozgó fázis vagy a kolonna cserélésénél, valamint az érzékenysége nem elég nagy (Kuang és munkatársai, 2011).

UV detektorral is kombinálható a HPLC cukormeghatározásnál, de az abszorpciós hullámhossz 190 nm közelében van, mert a legtöbb cukorban nincs kromofór csoport, ezért ritkán használják (Wang & Fang, 2004). A megfelelő meghatározáshoz ezáltal származékképzésre van szükség.

A szénhidrátok detektálására gyakran használt módszer a porlasztással egybekötött fényszórás elvén működő detektor (ELSD, *evaporative light scattering detector*). Mennyiségük összetett mátrixokban is jól meghatározható, amely során nincs szükség származékképzésre. Ezenkívül rövid elemzési idővel is nagy érzékenység érhető el (Jie és munkatársai, 2021). Működése során az eluenst (mozgó fázist) nitrogén vagy levegő felhasználásával porlasztják el, apró aeroszol cseppeket keletkeznek. A mozgó fázist egy fűtött driftcsőbe vezetik, ahol elpárolog. Az oldat részecskéi különböző mértékben szórják a fényt, amely intenzitása a vizsgált vegyület mennyiségével azonos (Rashan & Chen, 2007).

## **3. Anyagok és módszerek**

### **3.1. Vizsgált minták**

A mérések során két nagy keményítőtartalmú terméket vizsgáltam, melyek a fehér kenyér és a főtt tészta voltak.

#### **Kenyer**

A különböző, kereskedelmi forgalomban kapható kenyerek összetétele alapvetően nagy változatosságot mutat, ezért a kísérletekhez standardizált körülmények között készítettem el a kenyeret. Ehhez az ISO 6820-1985 számú szabványt vettem alapul. A minta előkészítéséhez a száraz hozzávalókat (500 g liszt, 7 g élesztő, kb. 4 g cukor és 7 g só) bemértem és összekevertem. A dagasztáshoz Bosch MUM86 HomeProfessional 1600 W robotgépet használtam. A dagasztás során a gép 2-es fokozatát használtam, a vizet pedig folyamatosan adagoltam hozzá. A folyamat addig tart, amíg a tészta felülete sima nem lesz. A következő lépés a kelesztés, amit Memmert IN110 (Memmert GmbH & Co. KG) inkubátor szekrényben 50°C-on 30 percig tartott. A kelesztés után Memmert szárítoszekrényben 180°C-on, 30 perc alatt sütöttem készre.

A mérésekig a mintákat felszeletelve, -20°C-os fagyasztószekrényben tároltam, majd a felhasználás előtt a bélzetet ledaráltam a homogenitás növelése érdekében. Az Infogest protokollhoz a mintákat eredeti formájukban használtam fel.

#### **Tészta**

A mérésekhez Gyermelyi Vita Pasta (farfelle, masni) durum száraztésztát szereztem be, melynek összetevői a tésztaipari durumbúzadara és az ivóvíz.

A főtt tészta minta előkészítéséhez 125 g száraztésztát 1,25 l forrásban lévő vízben 10 percig főztem. A főzővíz 2 g/l sót tartalmazott. A megfőtt tésztát folyó, hideg víz alatt átmostam és lehűtöttem, majd tálcára kiterítve 20 percig hagytam száradni. A főtt tésztát Moulinex húsdarálón (5 mm-es tárcsa) háromszor ledaráltam, majd kis zacskókban -80°C-os fagyasztóba tettem.

A száraz tésztát kontrollként vizsgáltam, ezért kis adagokban, kávédarálóban ledaráltam, majd az így kapott port 500 µm-es szitán átszitáltam.

### 3.2. Felhasznált vegyszerek, reagensek

A Luff-Schoorl módszerhez a következő reagenseket használtam fel:

40 v/v% etanol oldat; Carrez I és II oldat; metilnarancs indikátor; tömény sósav; nátrium-hidroxid; Luff-Schoorl reagens; nátrium-tioszulfát; tömény kénsav oldat; kálium-jodid oldat.

Az emészthető keményítő tartalom meghatározásához a Megazyme K-DSTRS kitet alkalmaztam, melynek enzimelei: a hasnyálmirigy  $\alpha$ -amiláz/amiloglükózidáz (PAA/AMG); amiloglükózidáz (AMG); glükóz-peroxidáz (GOPOD). A további vegyszerek a módszer leírásában feltüntetett maleinsav, ecetsav, nátrium-hidroxid, nátrium-acetát és etanol voltak.

Az Infogest Protokollhoz a módszer leírásában szereplő enzimeket (gyomornedv szimuláns; pepszin; vékonybélmedv szimuláns; epe kivonat; pankreatin) és vegyszereket (kalcium-klorid-dihidrát; tömény sósav; nátrium-hidroxid) használtam fel.

Minden felhasznált vegyszer analitikai tisztaságú volt.

### **3.3. Módszerek**

#### **3.3.1. Nedvességtartalom meghatározása**

A darált főtt tésztából, előszárított (105°C, 30 perc) és ismert tömegű Petri csészére 5±0,0001 g-os adagokat mértem ki, három párhuzamossal dolgozva. Majd a mintákat 4 óráig szárítottam. A szárítási periódusok között a minták tömegét exsikkátorban való lehűtés után mértem le. Az eredményekből szárazanyag-, és nedvességtartalmat számoltam.

Kenyérmintánál légszáraz kenyérből analitikai pontossággal bemértem 5±0,0001 g-ot, majd 4 órán keresztül tömegállandóságig szárítottam 105°C-os szárítószekrényben. A mintát ezután exsikkátorban hűtöttem le, majd visszamértem a tömegét.

#### **3.3.2. Redukáló cukortartalom meghatározása Luff-Schoorl módszerrel**

A módszer a glükóz, a glükózban kifejezett redukáló cukrok és a szacharózban kifejezett összes cukor meghatározására szolgál az élelmiszerekben és takarmányokban (Gafta, 2018). A mintákból egyenként analitikai pontossággal 2,5 g-ot mértem be 250 ml-es mérőlombikba, majd hozzáadtam 200 ml 40 v/v%-os etanolt. Rotációs rázógépen 1 órán keresztül keverttem. Rázás után hozzáadtam 5 ml Carrez I oldatot, majd 30 másodpercig keverttem. Hozzáadtam 5 ml Carrez II oldatot és 1 percig keverttem. 40 v/v%-os etanollal jelre töltöttem, összekeverttem és szűrőpapíron leszűrtem. A szűrletből kivettem 200 ml-t, kb. a térfogata felére bepároltam, hogy az etanol nagy részét eltávolítsam.

Egy 300 ml-es Erlenmeyer lombikba pipettáztam 25 ml-t a Luff-Schoorl-reagensből, majd hozzáadtam 25 ml mintaoldatot, melyet forrástól számítva 2 percig forraltam. A lombikot dróthálón, láng felett forraltam tovább 10 percig úgy, hogy felszereltem egy refluxkondenzátort az Erlenmeyer lombikra. Ezután lehűtöttem az oldatot, majd hozzáadtam 10 ml 30 w/v%-os kálium-jodid oldatot és 25 ml 3 M kénsavat. 0,1 n nátrium-tioszulfát mérőoldattal, keményítő indikátor jelenléte mellett kifehéredésig titráltam.

Minden mintaoldatot invertáltam az összes cukortartalom meghatározása érdekében. Ehhez a bepárolt törzsoldatból kivettem 50 ml-t, amit átpipettáztam egy 100 ml-es mérőlombikba. Hozzáadtam néhány csepp metilnarancs indikátort, majd óvatosan folyamatos keverés mellett adagoltam hozzá a 4 M sósav oldatot addig, amíg a folyadék vörös színű nem lett. Hozzáadtam 15 ml 0,1 M sósav oldatot, majd 30 percig forrásba lévő vízfürdőbe tettem. Gyorsan lehűtöttem körülbelül 20°C-ra, ezután hozzáadtam 15 ml nátrium-hidroxid oldatot.



Feltöltöttem 100 ml desztillált vízzel és összeráztam. Az oldatból 25 ml-t vettem ki, majd titráltam a feljebb leírt Luff-Schoorl módszerrel.

### **3.3.3. Megazyme: Emészthető és rezisztens keményítő meghatározása**

A mérést a Megazyme által forgalmazott emészthető és rezisztens keményítő meghatározásához készült protokoll (Termékkód: K-DSTRS) alapján végeztem el.

A módszer Englyst és mtsai. (1992) kutatásán alapul, akik egy *in vitro* módszert dolgoztak ki a keményítő emésztési sebessége alapján történő osztályozására: gyorsan emészthető keményítő (RDS), lassan emészthető keményítő (SDS) és rezisztens keményítő (RS). Átlagosan 4±1 órán keresztül tartózkodnak a vékonybélben a különböző táplálékok és a vizsgálat során is ezt az időt választották inkubációs időnek hasnyálmirigyből kivont  $\alpha$ -amiláz és amiloglükózidáz enzimkeverék mellett. A gyorsan emészthető keményítő esetében 20 perc, a lassan emészthető keményítő esetében 120 perc múlva vesznek mintát az oldatból, az összes keményítőtartalom mennyiségét pedig 240 percnél vett mintából határozzák meg. A maradék keményítőt pedig rezisztens keményítőként (RS) határozzák meg.

A minták enzimes előkészítéséhez 0,5 g mintát egy polipropilén csőbe három tizedes pontossággal mértem be. A mintát megnedvesítettem 0,5 ml 95 %-os etil-alkohollal majd hozzáadtam diszpenzer segítségével 17,5 ml nátrium-maleát puffert. 160 rpm-en, 37,0°C-on 5 percen keresztül ráztam vízfürdőben. Ezután hozzáadtam 2,5 ml PAA/AMG oldatot. Az oldatot 4 órán keresztül 37 °C-on inkubáljuk, közben pedig 160 rpm-en ráztatjuk tovább.

#### **Emészthető keményítő meghatározása**

Az oldatból 20, 120 és 240 percnél 1 ml-t vettem ki az emészthető keményítő meghatározásához. Ehhez hozzáadtam 20 ml ecetsav oldatot. Minden oldatból 2-2 ml-t pipettáztam 2 ml-es mikrocentrifugacsövekbe, amiket 13000 rpm-en 5 percig centrifugáltam.

Az oldatból kivettem 25  $\mu$ l mintát és ehhez hozzáadtam 25  $\mu$ l híg AMG-t, amit 50 °C-on 30 percig inkubáltam. Az inkubálás után 750  $\mu$ l GOPOD reagenst adtam és további 20 percen keresztül inkubáltam a mintát 50 °C-on.

#### **Rezisztens keményítő meghatározása**

A 240 perc elteltével 4 ml mintát egy 15 ml-es centrifugacsőbe pipettáztam, és hozzáadtam 4 ml 95 %-os etanolt. A csöveket centrifugáltam 4000 rpm-en 10 percig. A centrifugálás

után azonnal eltávolítottam a felülúszót, és hozzáadtam 2 ml 50 v/v%-os vizes etanolt, melyet rögtön vortexeltem. Ezután hozzáadtam további 6 ml etanolt, és újra vortexeltem és a fent említett paramétereknek megfelelően centrifugáltam. Ezt a folyamatot kétszer ismételtük meg.

A csövekbe mágneses keverőt és 2,0 ml hideg 1,7 M nátrium-hidroxidot adtam. Az oldatot kb. 20 percen keresztül jeget tartalmazó vízfürdőben, mágneses keverő felett kevertettem. Hozzáadtam 8,0 ml 1,0 M-os nátrium-acetát puffert, miközben a mágneses keverőn kevertettem a mintát. Továbbá hozzáadtam 0,1 ml AMG-t. Az AMG hozzáadása után azonnal vortexeltem a mintát. A csöveket 50 °C-os vízfürdőbe tettem, és 30 percig inkubáltam, időszakos vortexelés mellett.

### **Spektrofotometriás mérés**

2 ml mintaoldatot pipettáztam egy 2 ml-es centrifugacsőbe, amit 13000 rpm-en 5 percig centrifugáltam. Ezután 25 µl mintát pipettáztam egy mikrocentrifugacsőbe és hozzáadtam 750 µl GOPOD reagenst. Ebből az oldatból egy párhuzamost készítve még, vortexelés után 50°C-on 20 percig inkubáltam. A mintaoldatok elkészítésével párhuzamosan készítettem még reagens vak oldatot is, melyben 25 µl 100 mM nátrium-acetát puffer és 750 µl GOPOD reagens van. A mintákkal együtt inkubáltam.

A mintaoldatokat és a reagens vak minták abszorbancia értékét Thermo Evolution 300 BB típusú kétutas spektrofotométerrel mértem meg.

Az eredményeket az alábbi képlettel számoltam ki:

$$\Delta A \times f \times \frac{EV}{4} \times \frac{FV}{0,1} \times \frac{1}{1000000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180}$$

### **3.3.4. Emésztés szimuláció: Infogest Protokoll**

Az utóbbi időben a legnépszerűbb szabványosított emésztés szimulációs módszer a statikus *in vitro* Infogest protokoll. A módszer modellezi az emésztés három fázisát, figyelembe véve a standard emésztési időt, hőmérsékletet, pH-t, az adott szakaszban résztvevő megfelelő emésztés enzimek koncentrációját.

#### **Mintaelőkészítés**

A bemérését a minták emészthető keményítő tartalma alapján határoztam meg, ami előzetesen Megazyme kittel lett mérve. A mintákat analitikai pontossággal mértem be, a kenyér mintából 2,3 g-ot, a főtt tésztából 1,6 g-ot 50 ml-es centrifugacsövekbe, melyeknek a táratömegét előzetesen lemértem. A mintákat átlagosan 6,5-7,0 ml desztillált vízzel pótlom ki. A mérés megkezdése előtt egy vakmintát is készítettem, amiben 5,0 ml desztillált víz volt.

#### **Száj fázis**

Ezt a lépést a protokollban leírtaktól eltérően *in vivo* végeztem el. Az egyes minták standardizált rágását (39 rágás, 23 sec alatt) követően, az emésztéshez alkalmazott centrifugacsöbe ürítettem, és desztillált vízzel 10 ml-re hígítottam. Ebben a fázisban a minták mechanikai aprítása, és a humán eredetű enzimek és nyál hozzáadása egy lépésben megtörtént.

#### **Gyomor fázis**

A száj emésztményhez hozzáadtam 6,4 ml gyomornedv szimulánst, melyet előtte 37 °C-on inkubáltunk. Továbbá hozzáadtam 5 µL  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ -t, a kenyér mintához 120 µL, a főtt tészta mintához 35 µL 6 M-os HCl-t, 1,60 ml sertés pepszint, végül a kenyér mintához 1875 µL, a főtt tészta mintákhoz pedig 1960 µL desztillált vizet. A keveréket 37 °C-ra előmelegített inkubátorban (Memmert UNE300) 2 órán keresztül, folyamatos kevertetés mellett egy rázógépben (Heidolph Reax 2) inkubáltam.

#### **Vékonybél fázis**

Az inkubálási idő letelte után a száj-gyomor emésztményből kivettem 20 ml-t, amihez hozzáadtam vékonybélnedv szimulánst. Továbbá hozzáadtam 40 µL  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ -t, 2,5 ml epe kivonatot, 5,0 ml pankreatint, és a kenyér mintához 60 µL NaOH-t. Végül kiegészítettem

a kenyér mintát 3900 µL, a főtt tészta mintát pedig 3960 µL desztillált vízzel. Az enzimek és vegyszerek hozzáadása után további 2 órán keresztül inkubáltam 37 °C-on, folyamatos kevertetés mellett.

Az inkubációs idő letelte után ismét lemértem a minták tömegét.

### **Visszanyerés**

A módszer megfelelőségének ellenőrzésére visszanyerés vizsgálatot végeztem el a kenyér minták emésztményéből. A visszanyerési vizsgálat során a vizsgálandó vegyületek ismert mennyiségét adjuk a vizsgálandó mintához, majd az adott módszerrel megmérjük az adalékolt minta koncentrációját. Ezzel a vizsgálattal a minta összes komponensének pontos mennyiségi meghatározását teszi lehetővé. A visszanyerés vizsgálat akkor megfelelő ha a kapott érték 70 – 120 % között van (SANTE/11312/2021).

A táblázatokban szereplő koncentrációk a különböző spikeolási szinteken mért koncentrációk. A méréseket HPLC-RID-vel végeztem el. A mérés előtt egy glükóz-maltóz törzsoldat különböző koncentrációival elvégeztem a kalibrációt, az eredményeket ez alapján számoltam. A visszanyerést az emésztmény mintákból mért koncentrációkkal számoltam az alábbi képlet alapján.

$$R\% = \frac{\text{adalékolt minta koncentrációja} - \text{eredeti minta koncentrációja}}{\text{ismert hozzáadott spike koncentráció}} \times 100$$

A visszanyerés vizsgálatot csak a kenyér minták esetében végeztem el.

A mintákhoz hozzáadott glükóz és maltóz koncentráció a különböző spike szintek:

	<b>Glükóz</b> <b>[mg/ml]</b>	<b>Maltóz</b> <b>[mg/ml]</b>
<b>1. szint</b>	15	19,6
<b>2. szint</b>	30	29,4
<b>3. szint</b>	45	39,2

A különböző alkoholos kicsapások közötti eltérések vizsgálata érdekében Kruskal-Wallis tesztet futtattam le az SPSS Statistics 23 (IBM SPSS Statistics 23, 2021) szoftverrel ( $p < 0,05$ )

### **3.3.5. HPLC-RID módszer**

A Luff-Schoorl, a Megazyme és az Infogest protokoll során kapott extraktumokat/mintákat HPLC-RID módszerrel is mértem. A vizsgált termékek magas keményítőtartalmú élelmiszerek voltak, az azokra leginkább jellemző mono-, di-, és triszacharidok mennyiségét határoztam meg. Ezek a glükóz, szacharóz, maltóz és maltotrióz voltak.

A komponensek meghatározásához egy Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Carla, Kalifornia) típusú nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal végeztem, a detektálás Agilent 1100 G1362A törésmutató detektorral történt.

Az elválasztást Macherey- Nagel Nucleodur NH2 oszlopon (5  $\mu$ m töltetméret; 100x4,6 mm) végeztem. Az elválasztás 85:15 acetonitril – víz (850 ml ACN + 150 ml desztillált víz/ 1L eluens) mozgófázis alkalmazásával, izokratikus elúcióval történt. Az áramlási sebesség 1,4 ml/min volt, az egyes mintákból injektált térfogat 10  $\mu$ l. A kolonna hőmérséklete 30°C, míg a detektorcella hőmérséklete 35°C volt.

A mérések értékeléshez külső kalibrációt alkalmaztam, glükóz, szacharóz, maltóz és maltotrióz cukorkeveréssel. A kalibrációs pontok koncentrációja 0,5-1,0-2,5-5,0-10 mg/ml volt.

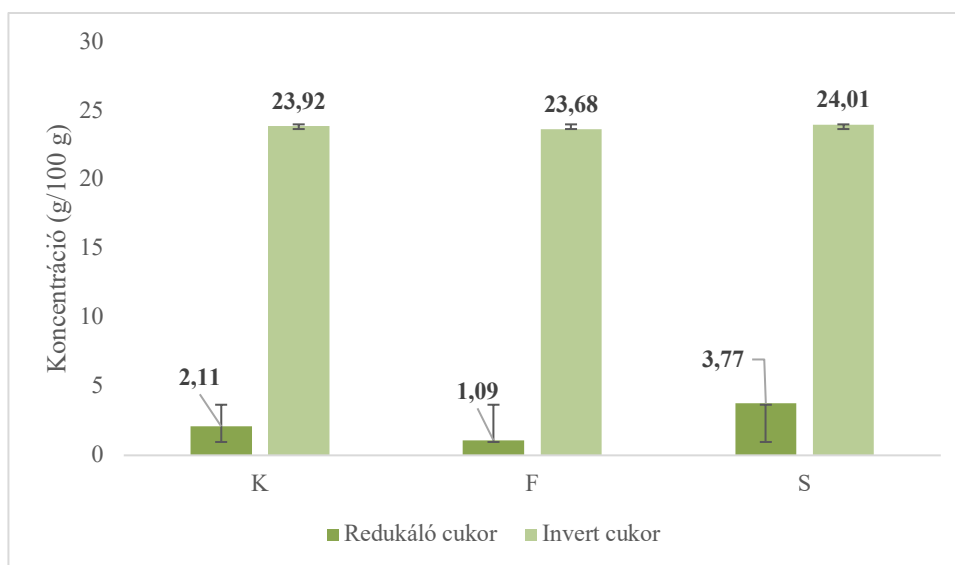
A minták extraktumaiból minden esetben 1500 µl-t mikrocentrifuga csövekbe pipettáztam, majd 5 percig, 13000 rpm-en centrifugáltam (Hettich Universal 22R, Andreas Hettich GmbH & Co., Tuttlingen, Németország). A felülúszóból 500 µl-t kromatográfias vialba pipettáztam. Ez alól az Infogest mérés esetében volt eltérés, amelynél a mintákat 0,22 µm pórusátmérőjű PVF fecskendőszűrőn közvetlenül a vialba szűrtem.

## 4. Eredmények és értékelésük

Minden esetben meghatároztam a termékek (kenyér, száraz-, és főtt tészta) nedvességtartalmát. A nedvességtartalom meghatározását a Megazyme protokoll is előírja abban az esetben, ha a termék nedvességtartalma >10%. A kenyér nedvességtartalma pedig 42,51 m/m%, a száraz tésztáé 7,26 m/m%, a főtt tészta nedvességtartalma pedig 40,20 m/m% volt.

### 4.1. Luff-Schoorl módszer eredményei

A sütő-, és tésztaipari termékekben főként jelenlévő egyszerű cukor a glükóz, ezért a minták cukortartalmát is erre vonatkoztatva adtam meg. A minták glükóztartalmának eredményei és az inverzió utáni összes cukortartalom eredményeit összehasonlító diagramokat a 2. ábra mutatja.



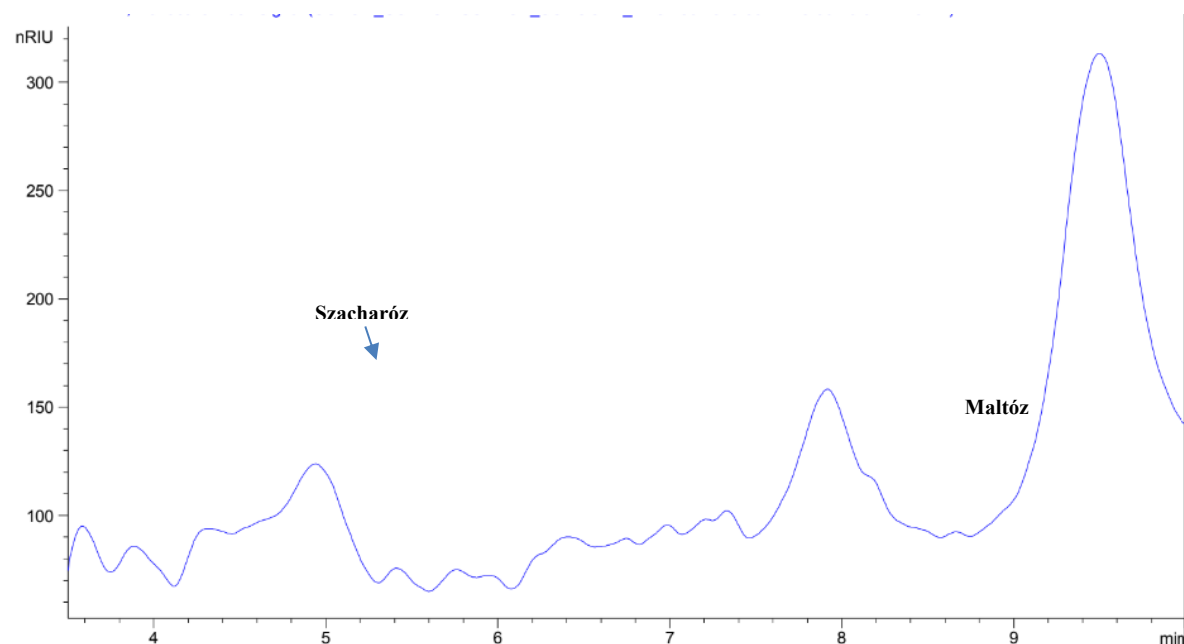
2. ábra: Luff-Schoorl módszer összehasonlító eredményei

A redukáló cukroknál a következő eredményeket kaptam. Kenyér minta (K) redukáló cukortartalma 2,11 g/100 g, a főtt tészta (F) 1,09 g/100 g, és a száraz tészta (S) 3,77 g/100g volt.

Az invert cukrok mennyisége nagyjából tízszerese a redukáló cukrokénak, mivel a savas hidrolízis után nagyobb lesz a mérhető cukrok mennyisége. A hidrolízis során a keményítő kisebb cukorpolimerekre bomlik, így akár maltóz is lehet a mintában hidrolízis után, ami szintén redukáló cukor. Titrálással nem lehet megállapítani, az oldatban lévő cukrok

minőségét, azonban a maltóz glükóz monomerekből épül fel, így az eredményeket glükózra vonatkoztatva adtam meg, habár a maltóz is egy redukáló cukor. Az eredmények alapján megfigyelhető, hogy a száraz tésztában (S) lévő redukáló cukor mennyisége kb. a kétszerese a főtt tésztáénak (F). Ez azzal magyarázható, hogy a főzés során a szénhidrát egy része a főzővízbe oldódik. A kenyérben előforduló redukáló cukrok tartománya széles, ami például a liszt minőségétől is függhet, de Maria és munkatársai (2017) által mért tartomány szerint reális a kapott eredmény.

A mintákat HPLC-RID módszerrel is megmértem. A Luff-Schoorl módszernél a titrálás során az oldatban lévő anyagmennyiséggel reagál a mérőoldat, ezáltal igen kis koncentrációban jelenlévő cukrok mennyisége is meghatározható. A mérés során a mintaelőkészítés hígítási lépéseket is tartalmaz, így az oldat cukorkoncentrációja viszonylag alacsony. Ennek következtében a kromatográfiás mérés eredményei nem voltak kiértékelhetők az alacsony cukorkoncentráció miatt. Ez visszavezethető a törésmutató detektor viszonylag alacsony érzékenységére is. A vizsgált mintaoldatokban a cukrok mennyisége kimutatási határ alatt volt, ezért a kromatogramokon elsősorban az alapvonal látszik, amely esetében emelkedés is volt tapasztalható. Egyedül a száraz tészta (3. ábra) esetén voltak a maltóz és a szacharóz csúcsai megfigyelhetők, azonban a csúcstorzulás miatt nem értékelhetők biztonsággal. A többi minta esetén ezek a csúcsok sem láthatók.

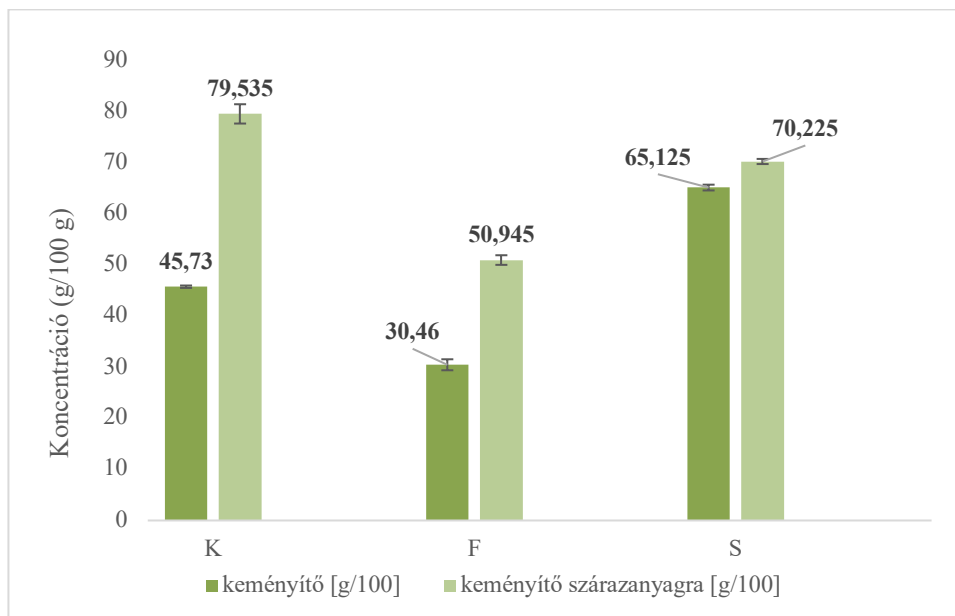


**3. ábra:** Száraz tészta minta Luff-Schoorl módszer utáni kromatogramja



## 4.2. Megazyme módszer eredményei

A minták összes keményítő tartalmát, illetve hozzájuk hasonlítva a szárazanyagra vonatkoztatott keményítő tartalomra kapott eredményeket a 4.ábra foglalja össze.



**4. ábra:** Összes keményítő és a szárazanyagra vonatkoztatott keményítő tartalom összehasonlító diagramja

Az összes keményítő tartalom a minták teljes emészhető keményítő tartalmának (TDS) és a bennük jelenlévő rezisztens keményítő (RS) mennyiségének összege. A szárazanyagra vonatkoztatott keményítőtartalom az egyes minták keményítőtartalmának és a nedvességtartalmuk aránya. A mérés során a Megazyme kitéhez tartozó kontroll minta összetételét is meghatároztam, amely eredményei alapján a módszer megfelelően működött.

A kenyérminta összes emészthető keményítőtartalma 44,75 g/100 g, a főtt tészta mintának 29,98 g/100 g, a száraz tészta pedig 64,75 g/100 g volt. Tien és munkatársai (2018) szerint a kenyér összes emészthető szénhidrát tartalma, azon belül a gyorsan emészthető szénhidrát tartalma kb. 40 g/100 g, Camelo-Méndez és munkatársai, (2016) mérései alapján a száraz tészta pedig kb. 71 g/100 g. Az általunk kapott eredmények megegyezik az irodalomban leírt eredményekkel. A minták emészthető keményítő frakcióit az 5. ábra foglalja össze.



**5. ábra:** A minták emészthető keményítő frakciói

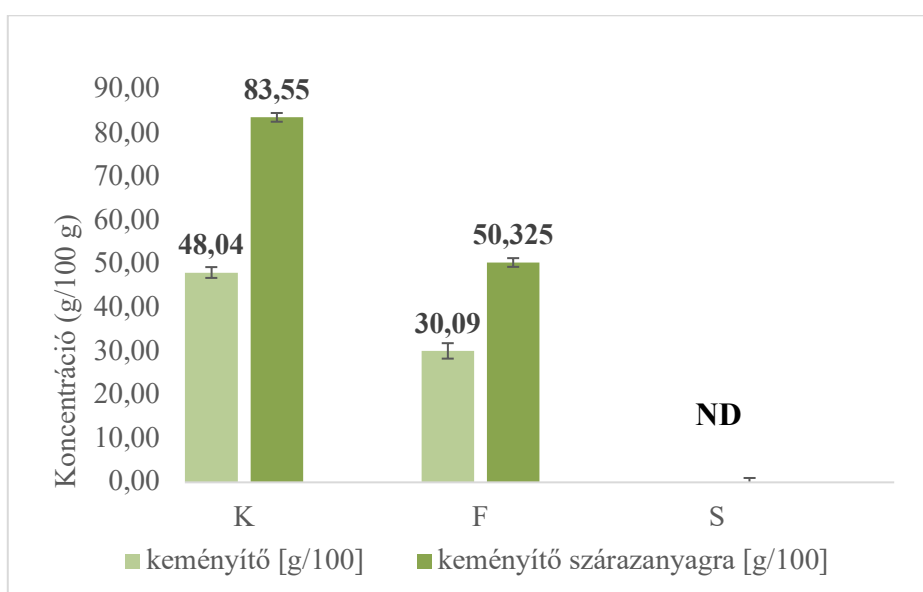
A főtt tészta minták (F) esetében megfigyelhető, hogy mind a rezisztens keményítő, mind az összes emészthető keményítő mennyisége a felére csökkent a száraz tészta minta (S) mennyiségéhez képest. Ez azzal is magyarázható, hogy a főzés hatására a vízoldható komponensek egy része a főzővízbe távozik, csökkentve a szilárd anyagok mennyiségét, mint például a keményítő tartalmát is. A főzési veszteségről Osorio-Díaz és munkatársai (2014) is írtak.

Az 5. ábrán a minták emészthető keményítő frakciói láthatóak. Az SDS érték az 120 percnél kapott abszorbancia és a 20 percnél mért abszorbancia különbsége. A kenyér minta (K) negatív SDS értékét az okozza, hogy nem szabadult fel a mintában több glükóz 120 percnél, mint 20 percnél. Ez azt jelenti, hogy a kenyérben szinte csak gyorsan emészthető keményítő van. A tészta esetében főzés után a hozzáférhető keményítőtartalom csökkent, mivel a keményítő szerkezete átalakul, ezáltal nehezebben lesz hozzáférhető az enzimek számára

(Fuentes-Zaragoza és mtsai., 2011). Ez azzal is magyarázható, hogy a száraz tészta mintaelőkészítésénél a mintát porrá őröltük, így az enzimek számára az emészthető jobban hozzáférhető volt, így több is szabadult fel.

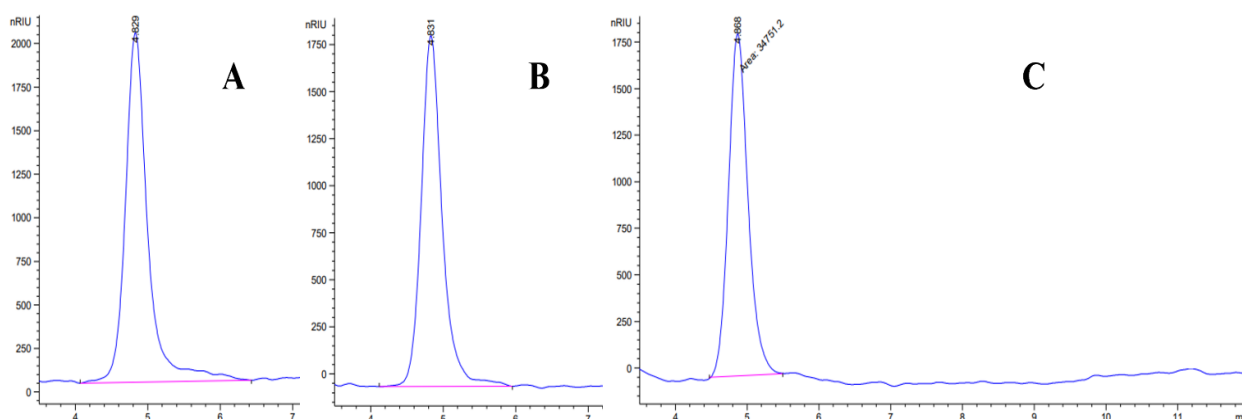
A mintákat HPLC-RID-vel is megmértem. A mérés megkezdése előtt felvettem a kalibrációs egyenest. Az emésztés során az enzimek glükózra bontják a keményítőt, és a minták esetében csak ez a cukor volt detektálható, így a mérés sikeresnek bizonyult.

A keményítő, és a szárazanyagra vonatkoztatott keményítőtartalom eredményeit a 6. ábra foglalja össze. A HPLC-vel mért kenyérminta kromatogramja az 7. ábrán látható.



**6. ábra:** Összes keményítő és a szárazanyagra vonatkoztatott keményítő tartalom összehasonlító diagramja

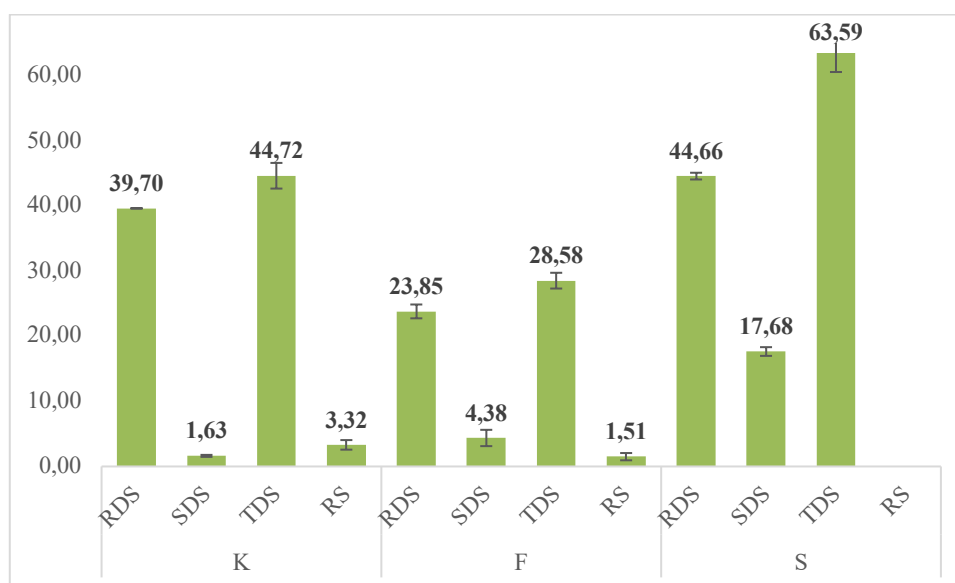
HPLC-RID módszer után a kenyér minta összes keményítő tartalma 48,04 g/100g, a főtt tésztának 30,09 g/100 g volt. A száraz tészta rezisztens keményítő tartalma nem volt detektálható, így a száraz tészta összes keményítő tartalmát nem tudtam meghatározni.



**7. ábra:** Kenyér minta kromatogramjai

A 7. ábrán látható a K1 minta glükózhoz tartozó kromatogramjai. Az A kromatogram a 20 percnél vett RDS, a B kromatogram 120 percnél vett SDS és a C kromatogram pedig a 240 percnél vett minta eredményei.

Az alábbi 8. ábrán az emészthető keményítő frakciók láthatók.



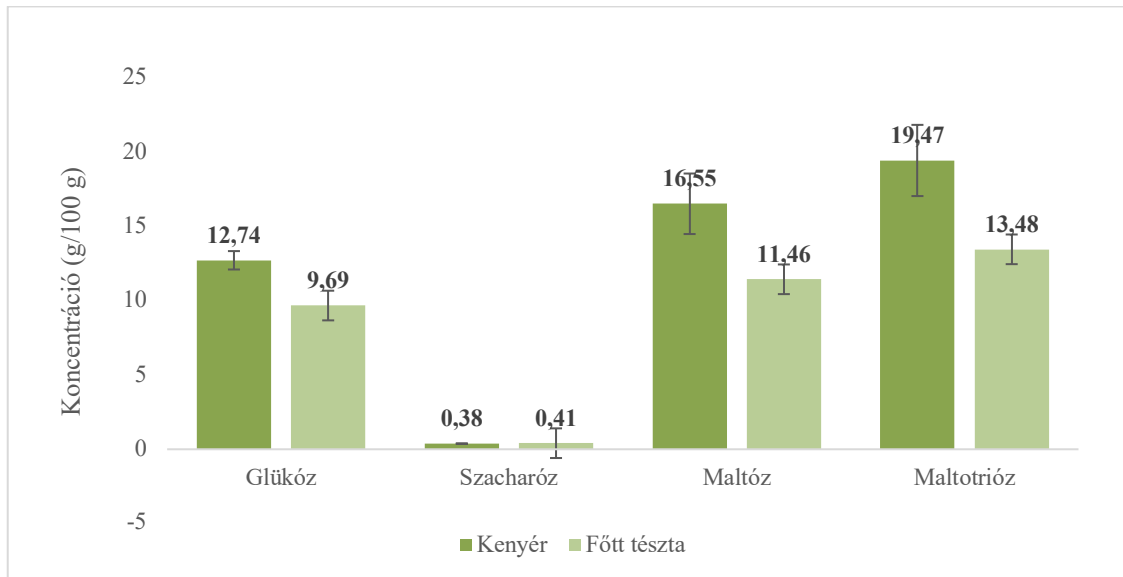
**8. ábra:** Emészthető keményítő frakciók

A két mérést követően összehasonlítottam az eredményeket. Mindkét esetben közel azonos eredményeket kaptunk. Az egyes különbségek betudhatóak különböző mérési hibának.

Elmondható, hogy a Megazyme módszernél a spektrofotometriás mérés helyettesíthető HPLC-RID módszerrel.

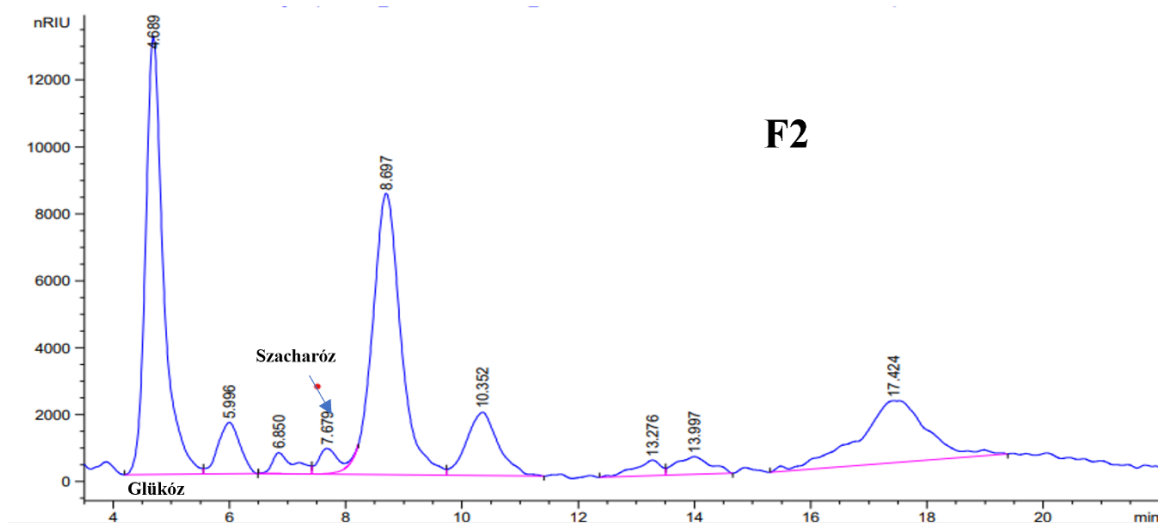
### 4.3. Infogest Protocol eredményei

A mérés befejeztével az eredményeket HPLC-RID módszerrel vizsgáltam meg. A minták eredményeit a 9.ábra foglalja össze, külön-külön a vizsgált négy komponensre nézve.

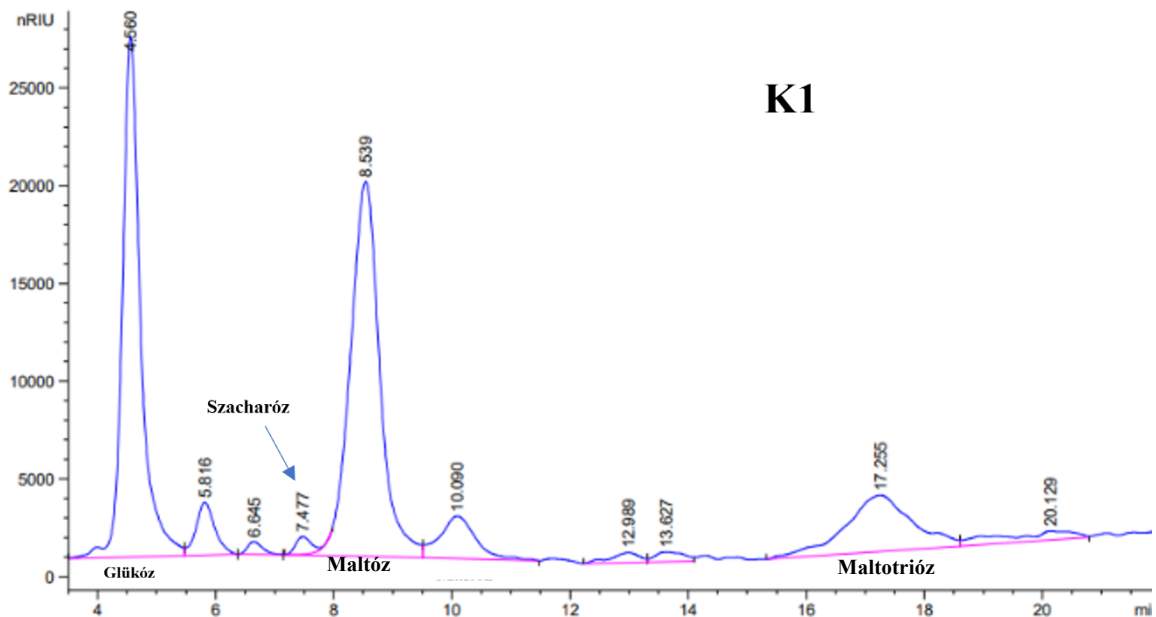


9. ábra: Az emésztmény mintákban lévő cukrok mennyisége

Az egyes minták kromatogramját a 10. és 11. ábra foglalja össze



10. ábra: Főtt tészta kromatogramja emésztés után

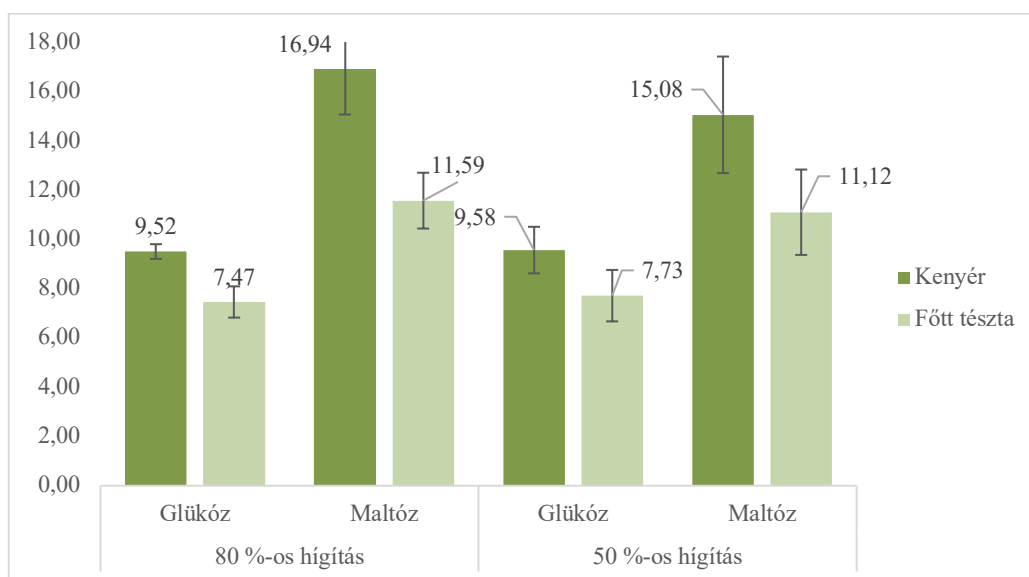


**11. ábra:** Kenyér minta kromatogramja emésztés után

A mérés után elmondható, hogy mind a kenyér, mind a tészta mintában a szacharóz mennyisége volt a legkisebb, legnagyobb mennyiségben pedig a maltotrióz van jelen a mintákban. A keményítő a hidrolízise során maltotriózzá, majd maltózzá végül glükóz polimerekre hidrolizál (Blanco & Blanco, 2017). Ezzel is magyarázható a szacharóz elenyésző mennyisége a mintákban.

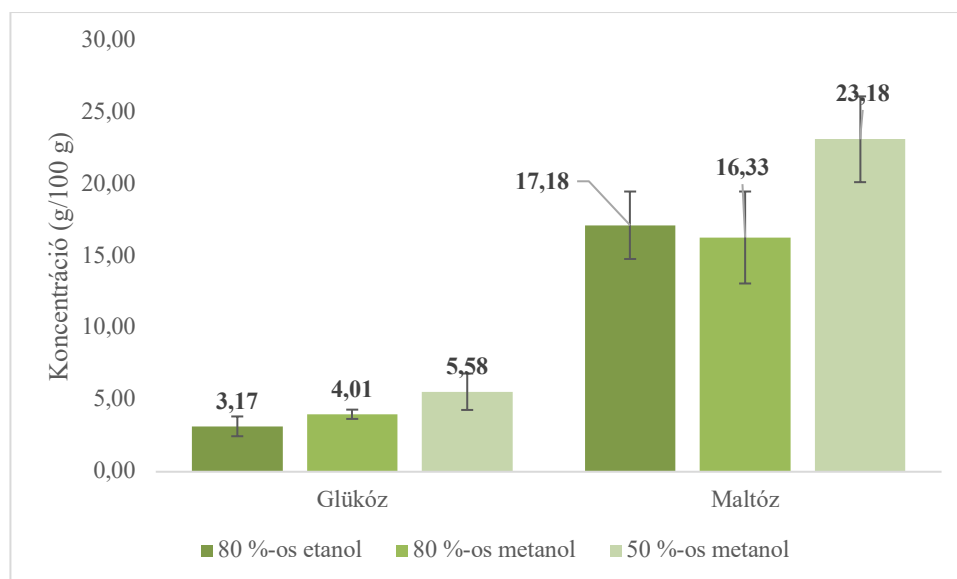
A mérés után az emésztmény mintákat 80, illetve 50 %-ban hígítottam desztillált vízzel. Arra voltam kíváncsi, hogy a két hígítás után mennyire változik meg az emésztmény mintákban a különböző cukrok mennyisége, valamint az azonos koncentrációban történő alkoholos hígítás során változik-e a cukor mennyisége az ugyanolyan koncentrációjú hígítás esetén. A mérés során a glükózt és a maltózt vizsgáltam részletesebben, mivel a szacharóz mindkét esetben kimutatási határ alatt volt, a maltotrióz pedig csak az 50 %-os hígításnál volt detektálható, alacsony koncentrációban. Az összefoglaló diagram a 12. ábrán látható.

**12. ábra:** Hígítás utáni eredmények

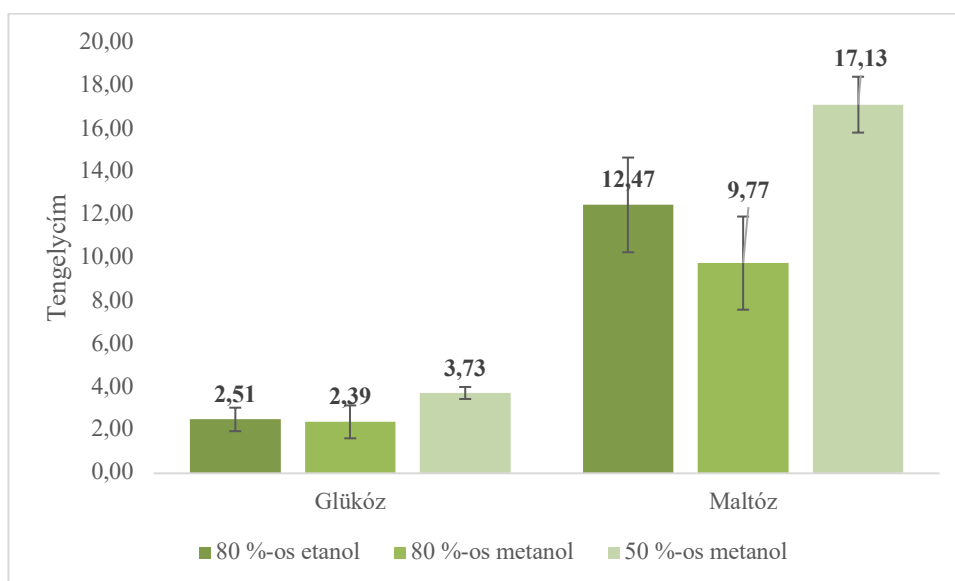


A mérés befejeztével az enzimek aktivitását 80 %-os etanollal, metanollal és 50 %-os metanollal állítottuk le. Az alkoholok hozzáadásával továbbá a mintában lévő emésztetlen keményítőt is kicsapódik, mivel a hosszabb szénláncú keményítők nem oldódnak sem etanolban, sem metanolban. A kicsapás eredményeit 13. és 14. ábra foglalja össze.

**13. ábra:** Kenyér mintára kapott eredmények kicsapási lépés után



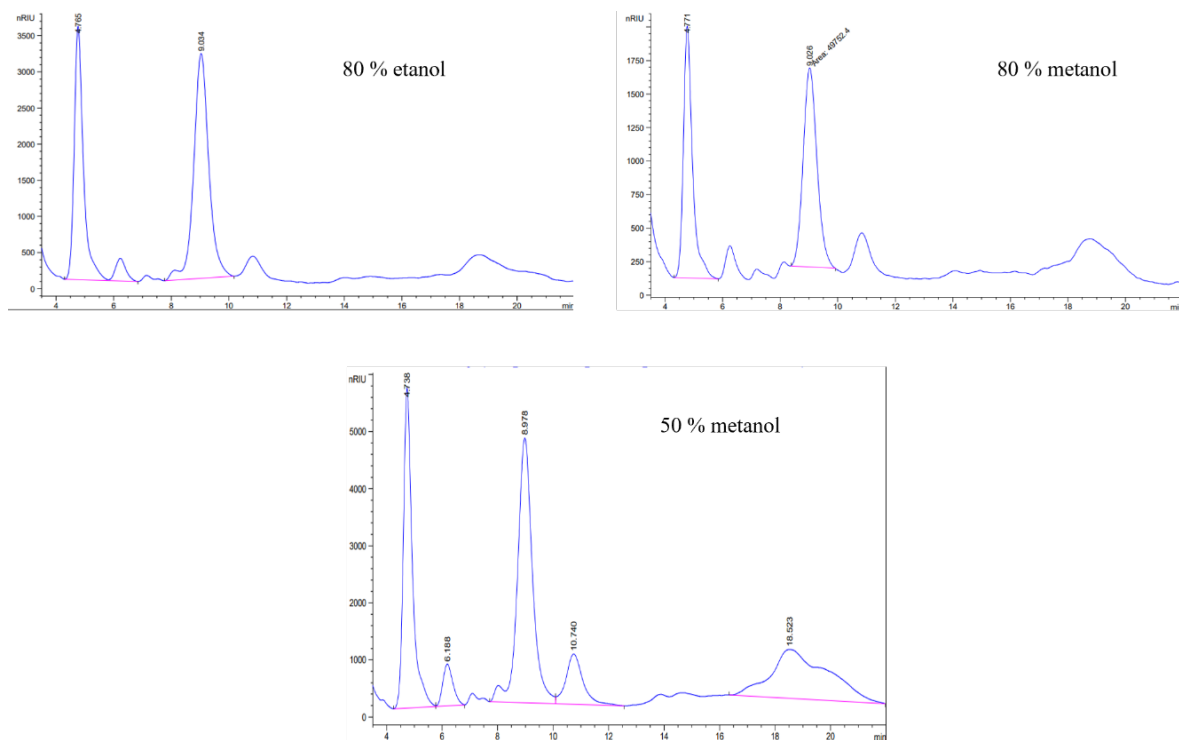
**14. ábra:** Főtt tészta kicsapás eredményei



A mérések során két komponenst vizsgáltam, a glükózt és a maltózt. Az eredeti emésztményben még vizsgált maltotrióz és szacharóz kicsapás után kimutatási határ alatt volt, továbbá az eredeti emésztményhez képest az említett glükóz és maltóz mennyisége is csökkent. Azt figyeltem meg, hogy a két alkohol közül melyik alkalmasabb a kicsapásra, illetve milyen koncentrációban. A gyakorlatban a 80 %-os etanolos izolációt használják rutinszerűen. A glükóz esetében mindhárom esetben csökkenés látható, míg a maltóz esetében az 50 %-os hígításnál növekedés látható csak növekedés, a 80 %-os alkoholok esetében szintén csökkennek az értékek. Ez arra utal, hogy az alkoholos kicsapás során a mintából nem csak az emésztetlen keményítő csapódik ki, hanem magával viszi a kisebb molekulatömegű cukrokat is. Az 50 %-os metanol esetében számolni kell számos visszamaradó analittal, de a kromatogramok ebben az esetben is szépen elváltak egymástól. A 15. ábrán láthatóak a különböző alkoholok kicsapás után mért kromatogramjai.



### 15. ábra: F2 minta kicsapás utáni kromatogramjai



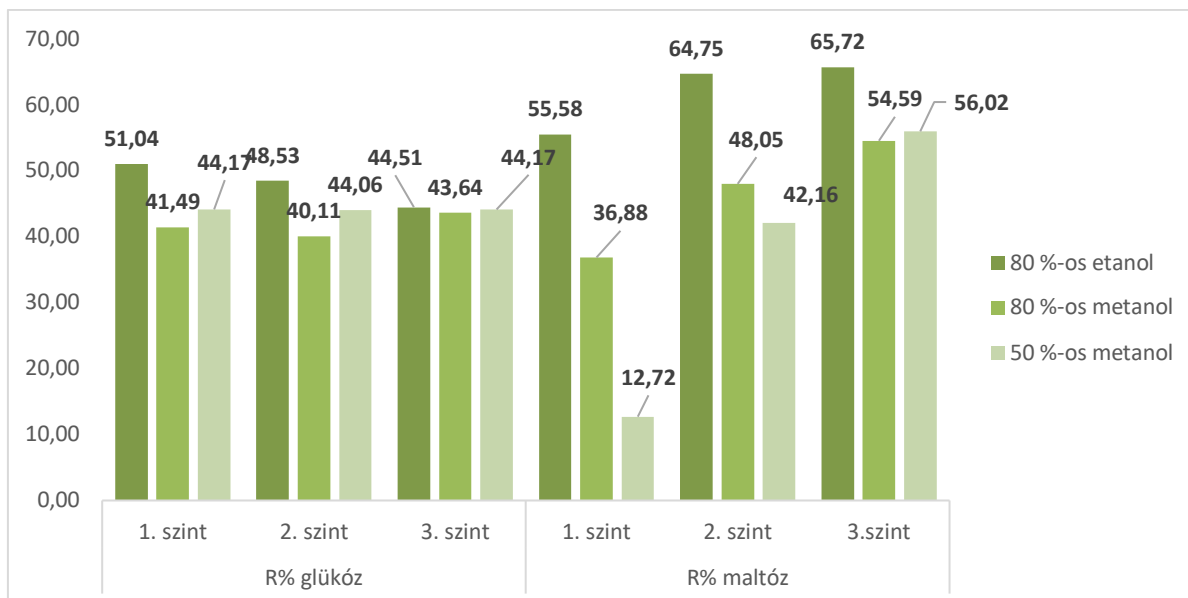
Az egyes kicsapások közötti különbséget Kruskal-Wallis teszt lefuttatásával ellenőriztem. Kenyér minta esetében glükóz koncentrációnál szignifikáns különbség tapasztalható. Az 50 %-os metanol eltér a mindkét 80 %-os alkoholtól.

Főtt tészta minta esetében maltóz koncentrációnál szignifikáns különbség tapasztalható. Az 50 %-os metanol eltér a mindkét 80 %-os alkoholtól.

## Visszanyerés vizsgálat

A módszer megfelelőségének ellenőrzésére visszanyerés vizsgálatot végeztem el a kenyér minták emésztményéből. A visszanyerés eredményei a 16. ábrán láthatók.

**16. ábra:** Visszanyerés vizsgálat összefoglaló eredményei



A visszanyerés vizsgálatok eredményei az elfogadási határ alatt van minden esetben. Az alkoholos kicsapás során a kisebb molekulatömegű cukrok is kicsapódnak a mintából. Ez okozza a rossz visszanyerést is.

## 5. Következtetések

A diplomamunkámban három különböző szénhidráttartalom meghatározást mutattam be. A célom az volt, hogy a különböző módszereknél a mérés befejeztével folyadékkromatográfiával meghatározzam a szénhidráttartalmat.

A Luff-Schoorl módszernél a redukáló cukor, illetve invertálás után az összes cukortartalmat határozom meg titrimetriás módszerrel. Mivel titrálással nem tudjuk meghatározni, hogy a redukáló cukortartalom esetén milyen redukáló cukor van az adott mintában, erre a HPLC módszer kitűnő választás lenne. Mivel a Luff-Schoorl módszer mintaelőkészítésénél nagymértékű hígítás történik, így a folyadékkromatográfiás mérés során alapvonal emelkedés, csúcstorzulás volt látható. A jövőben ez kiküszöbölhető lenne, ha az eredeti 2,5 g minta helyett nagyobb mennyiségben mérünk be a mintánkból.

Az Infogest Protokoll befejezése után alkoholos kicsapást alkalmaztam az enzimek inaktiválására, továbbá az emésztetlen keményítőt kicsapására. Rutinszerűen a 80 %-os etanolos kicsapást alkalmazzák, de megvizsgáltam, hogy 80 %-os metanollal és 50 %-os metanollal is ugyanúgy működik-e a folyamat. A vizsgálat előtt 80 és 50 %-ban hígítottam az emésztmény mintákat, hogy össze tudjam hasonlítani az értékeket az azonos koncentrációjú hígítással. Az eredmények alapján a cukrok mennyisége az alkoholos kicsapás után lecsökkentek. Ez arra utal, hogy a módszer során az alkoholok nem csak az emésztetlen keményítőt és az oligoszacharidokat viszi el a rendszerből, hanem a kisebb cukrokat is. Ebből kifolyólag a visszanyerés sem lett megfelelő. A továbbiakban javaslom, hogy az emésztés szimulációs módszernél, ha a szénhidráttartalomra vagyunk kíváncsiak, érdemes a desztillált vizes hígítással elvégezni a visszanyerés vizsgálatot.

## 6. Összefoglalás

A szénhidrátok különböző típusai a táplálkozás fő energiaforrásai. Minőségi és mennyiségi kimutatására napjainkban egyre több módszer áll rendelkezésünkre, melyek lehetnek különböző hagyományos módszerek, illetve különböző kit-es protokollok.

Kísérleti munkám során két különböző magas szénhidráttartalmú mintát (kenyér, tészta) vizsgáltam. Vizsgálataim során a méréseket HPLC-RID módszerrel vizsgáltam.

A minták glükózban kifejezett redukáló cukor, illetve inverzió után a glükózban kifejezett összes cukortartalmát Gafta módszerrel vizsgáltam, az eredményeket az útmutató alapján számoltam. A minták cukortartalmát titrimetriás módszerrel, a fogyás alapján határoztam meg. Az eredményeket tekintve a tészta és kenyér minták összes cukor tartalma közel azonos volt. Némi furcsaságot mutat, hogy a tészta megfőzése után nem csökkent a cukortartalom. Ennél a módszernél a HPLC-vel történő értékelés nem lehetséges. A kapott eredmények a kimutatási határ alatt vannak, csúcstorzulás és alapvonal emelkedés jellemző, amit a nagyon híg mintaelőkészítés okozhatott.

A minták emészthető és rezisztens keményítő tartalmát Megazyme módszerrel vizsgáltam meg. A mintákat kétutas spektrofotométerrel és HPLC módszerrel is megmértem. A módszerleírásban szereplő képlet alapján határoztam meg az abszorbancia értékek alapján a különböző emészthető keményítő frakciókat. A folyadékkromatográfiás mérés során megközelítőleg ugyanazokat az eredményeket kaptuk, ami alapján kimondható, hogy ennél a módszernél alkalmazható a HPLC-RID módszer az emészthető és rezisztens keményítő meghatározására.

A főtt tészta és kenyér esetében egy *in vitro* emésztés szimulációt végeztem el, az Infogest Protokollt. A teljes emésztési folyamat lejátszódása után megmértem az emésztményekben a szénhidrát koncentráció HPLC módszerrel. A mintákban négyféle cukrot vizsgáltam: a glükózt, szacharózt, maltózt és maltotriózt. Az emésztményekben a szacharóz mennyisége volt a legkisebb, míg a maltotriózé a legnagyobb. Ez a keményítő bomlásából adódik. A mérés befejeztével az enzimek aktivitását 80 %-os etanollal, metanollal és 50 %-os metanollal állítottuk le. Az alkoholok hozzáadásával továbbá a mintában lévő emésztetlen keményítőt is kicsapódik, mivel a hosszabb szénláncú keményítők nem oldódnak sem etanolban, sem metanolban. A rutin vizsgálatoknál a 80 %-os etanolt használják. A mérések megfelelőségének ellenőrzése végett a mintákat előzetesen 50 és 80 %-ban hígítottam desztillált vízzel. Az alkoholos kicsapás vizsgálata során a cukrok mennyisége jelentősen

lecsökkent, ami arra utal, hogy a keményítő és nagyobb oligoszacharidok mellett a kisebb cukrokat is elviszi a módszer.

A mérés pontosságát visszanyerés vizsgálattal ellenőriztem a háromféle alkohol esetén 3 spike szinten. Az eredmények alapján a visszanyerés nem elfogadható. Ez utalhat analit veszteségre, ami az alkoholos kicsapás miatt történt.

## Irodalmi hivatkozás

- BeMiller, J. N. (2018). *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*. Elsevier.
- Björck, I., Granfeldt, Y., Liljeberg, H., Tovar, J., & Asp, N. (1994). Food properties affecting the digestion and absorption of carbohydrates. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 59(3), 699S-705S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/59.3.699S>
- Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Chapter 12—Digestion—Absorption. In A. Blanco & G. Blanco (Szerk.), *Medical Biochemistry* (o. 251–273). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00012-4>
- Calvin, O. (2016). Starch and modified starch in bread making: A review. *African Journal of Food Science*, 10, 344–351. <https://doi.org/10.5897/AJFS2016.1481>
- Camelo-Méndez, G. A., Ferruzzi, M. G., González-Aguilar, G. A., & Bello-Pérez, L. A. (2016). Carbohydrate and Phytochemical Digestibility in Pasta. *Food Engineering Reviews*, 8(1), 76–89. <https://doi.org/10.1007/s12393-015-9117-z>
- Englyst, K. N., & Englyst, H. N. (2005). Carbohydrate bioavailability. *British Journal of Nutrition*, 94(1), 1–11. <https://doi.org/10.1079/BJN20051457>
- Fuentes-Zaragoza, E., Sánchez-Zapata, E., Sendra, E., Sayas, E., Navarro, C., Fernández-López, J., & Pérez-Alvarez, J. A. (2011). Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch - Stärke*, 63(7), 406–415. <https://doi.org/10.1002/star.201000099>
- Haldar, D., Sen, D., & Gayen, K. (2017). Development of Spectrophotometric Method for the Analysis of Multi-component Carbohydrate Mixture of Different Moieties. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181(4), 1416–1434. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2293-3>
- Holm, J., Lundquist, I., Björck, I., Eliasson, A. C., & Asp, N. G. (1988). Degree of starch gelatinization, digestion rate of starch in vitro, and metabolic response in rats. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 47(6), 1010–1016. <https://doi.org/10.1093/ajcn/47.6.1010>
- Jie, L., Yuan, Z., Yu, Z., & Xue-song, F. (2021). Progress in the pretreatment and analysis of carbohydrates in food: An update since 2013. *Journal of Chromatography A*, 1655, 462496. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462496>
- Kuang, H., Xia, Y., Liang, J., Yang, B., Wang, Q., & Sun, Y. (2011). Fast classification and compositional analysis of polysaccharides from TCMs by ultra-performance liquid chromatography coupled with multivariate analysis. *Carbohydrate Polymers*, 84(4), 1258–1266. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.014>
- Lehmann, U., & Robin, F. (2007). Slowly digestible starch - its structure and health implications: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 346–355. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.02.009>

- Leong, S. Y., Duque, S. M., Abduh, S. B. M., & Oey, I. (2019a). 6—Carbohydrates. In F. J. Barba, J. M. A. Saraiva, G. Cravotto, & J. M. Lorenzo (Szerk.), *Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds* (o. 171–206). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814174-8.00006-8>
- Leong, S. Y., Duque, S. M., Abduh, S. B. M., & Oey, I. (2019b). 6—Carbohydrates. In F. J. Barba, J. M. A. Saraiva, G. Cravotto, & J. M. Lorenzo (Szerk.), *Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds* (o. 171–206). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814174-8.00006-8>
- Livesey, G. (2014). Carbohydrate Digestion, Absorption, and Fiber. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00043-X>
- Lovegrove, A., Edwards, C. H., De Noni, I., Patel, H., El, S. N., Grassby, T., Zielke, C., Ulmius, M., Nilsson, L., Butterworth, P. J., Ellis, P. R., & Shewry, P. R. (2017a). Role of polysaccharides in food, digestion, and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(2), 237–253. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.939263>
- Lovegrove, A., Edwards, C. H., De Noni, I., Patel, H., El, S. N., Grassby, T., Zielke, C., Ulmius, M., Nilsson, L., Butterworth, P. J., Ellis, P. R., & Shewry, P. R. (2017b). Role of polysaccharides in food, digestion, and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(2), 237–253. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.939263>
- Lunn, J., & Buttriss, J. L. (2007). Carbohydrates and dietary fibre. *Nutrition Bulletin*, 32(1), 21–64. <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2007.00616.x>
- Nielsen, S. S. (2017). Total Carbohydrate by Phenol-Sulfuric Acid Method. In S. S. Nielsen (Szerk.), *Food Analysis Laboratory Manual* (o. 137–141). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-44127-6\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-44127-6_14)
- Osorio-Díaz, P., Islas-Hernández, J. J., Agama-Acevedo, E., Rodríguez-Ambríz, S. L., Sánchez-Pardo, M. E., & Bello-Pérez, L. A. (2014). Chemical, Starch Digestibility and Sensory Characteristics of Durum Wheat/Unripe Whole Banana Flour Blends for Spaghetti Formulation. *Food and Nutrition Sciences*, 5(3), Article 3. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.53033>
- Panesar, P. S., & Bali, V. (2016). Prebiotics. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Szerk.), *Encyclopedia of Food and Health* (o. 464–471). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00560-2>
- Raessler, M. (2011). Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(11), 1833–1843. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.06.013>

- Raigond, P., Ezekiel, R., & Raigond, B. (2015). Resistant starch in food: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(10), 1968–1978. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6966>
- Rashan, J., & Chen, R. (2007). Developing a versatile gradient elution LC/ELSD method for analyzing cellulose derivatives in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44(1), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.01.015>
- Rover, M. R., Johnston, P. A., Lamsal, B. P., & Brown, R. C. (2013). Total water-soluble sugars quantification in bio-oil using the phenol–sulfuric acid assay. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 104, 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2013.08.004>
- Soria, A. C., Brokł, M., Sanz, M. L., & Martínez-Castro, I. (2012). 4.11—Sample Preparation for the Determination of Carbohydrates in Food and Beverages. In J. Pawliszyn (Szerk.), *Comprehensive Sampling and Sample Preparation* (o. 213–243). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00135-6>
- Tien, N. N. T., Anh, T. N. Q., Phi, N. T. L., & Hung, P. V. (2018). In Vitro and In Vivo Starch Digestibility and Quality of Bread Substituted with Acid and Heat-Moisture Treated Sweet Potato Starch. *Starch - Stärke*, 70(9–10), 1800069. <https://doi.org/10.1002/star.201800069>
- Wang, Q., & Fang, Y. (2004). Analysis of sugars in traditional Chinese drugs. *Journal of Chromatography B*, 812(1), 309–324. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.09.027>
- Yan, J., Shi, S., Wang, H., Liu, R., Li, N., Chen, Y., & Wang, S. (2016). Neutral monosaccharide composition analysis of plant-derived oligo- and polysaccharides by high performance liquid chromatography. *Carbohydrate Polymers*, 136, 1273–1280. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.028>
- Yan, X. (2014). *HPLC for Carbohydrate Analysis* (o. 22).
- Zhou, W., Hui, Y. H., De Leyn, I., Pagani, M. A., Rosell, C. M., Selman, J. D., & Therdthai, N. (Szerk.). (2014). *Bakery Products Science and Technology* (1. kiad.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118792001>



## NYILATKOZAT

### diplomadolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve.	Mudri Csenge Kriszta
A Hallgató Neptun kódja:	ULNRO7
A dolgozat címe:	Módszerfejlesztés emészthető szénhidrátartalom folyadékkromatográfiás meghatározására
A megjelenés éve:	2023
A konzulens intézetének neve:	Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
A konzulens tanszékének a neve:	Élelmiszerkémiai és Analitikai Tanszék

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

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

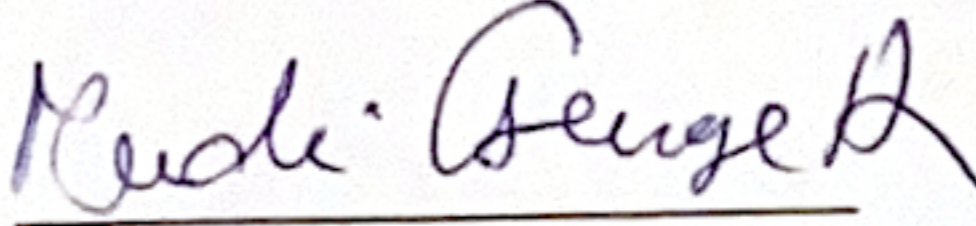
A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

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

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe. 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 könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: Budapest, 2023. november 6.

  
Mudri Csenge Kriszta



## NYILATKOZAT

Mudri Csenge Kriszta (hallgató Neptun azonosítója: ULNRO7) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot a záróvizsgán történő védésre **javaslom** / **nem javaslom**.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz:            igen    nem

Kelt: Budapest, 2023. november 6.



---

Benes Eszter Luca