

DIPLOMADOLGOZAT

Kovács Olga Lúcia Diplomadolgozat

Kovács Olga Lúcia

2024



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Budai Campus

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Élelmiszerbiztonsági- és minőségi mérnöki

mesterképzési szak

**DIÓ FITINSAV TARTALMÁNAK CSÖKKENTÉSE FITÁZ
ALKALMAZÁSÁVAL**

Belső konzulens: Dr. Bujna Erika
egyetemi docens
Sipiczki Gizella
egyetemi tanársegéd

Belső konzulensek tanszéke: Biomérnök és
Erjedéssipari Technológia Tanszék

Készítette: Kovács Olga Lúcia

Budapest

2024

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések.....	3
2. Szakirodalmi áttekintés	5
2.1. A dió általános bemutatása	5
2.2. A dió beltartalmi jellemzői	7
2.3. Fitinsav.....	9
2.4. Fitinsav mérése.....	12
2.4.1. Klasszikus analitikai módszerek.....	13
2.4.2. Spektroszkópiai módszerek.....	13
2.4.3. Kromatográfias megoldások.....	14
2.4.4. Dió fitinsav mérése	15
2.5. Fitinsav bontásának lehetőségei	16
3. Alkalmazott anyagok és módszerek	21
3.1. Felhasznált dió minták.....	21
3.2. Felhasznált enzimek	21
3.3. Az enzimes kezelések folyamata.....	21
3.3.1. Darált dió enzimes kezelése.....	21
3.3.2. Egész dió enzimes kezelése	21
3.4. Fitinsav méréséhez alkalmazott anyagok	21
3.4.1. Wade reagens.....	21
3.4.2. 2,4%-os sósavoldat	21
3.5. Felhasznált módszerek.....	22
3.5.1. Liofilezés.....	22
3.5.2. Fitinsav mérés.....	22
4. Eredmények és értékelésük	24
4.1. Különböző eredetű fitázok vizsgálata.....	24

4.2.	Fitáz enzim mennyiségének optimalálása	26
4.3.	Egész dió bontása fitáz enzimmel	28
4.4.	A hőmérséklet hatásának vizsgálata a fitinsav csökkentésre	31
5.	Következtetések és javaslatok	33
6.	Összefoglalás	35
7.	Irodalomjegyzék	37
	Táblázatok és ábrák jegyzéke	41
	Köszönetnyilvánítás	42

Kovács Olga Lúcia Diplomadolgozat

1. Bevezetés és célkitűzések

A fitinsav (mio-inozit hexafoszfát, IP₆), illetve sói (fitátok) természetes módon előfordulhatnak számos rostban gazdag növényben, mint például gabonafélékben, hüvelyesekben és diófélékben is, amelyekben foszfort raktározó vegyületként funkcionálnak. A növényekben a fitátok felhalmozódása a magok érésekor kezdődik, majd később a csírázás során ezek a fitátok hidrolizálódnak és ennek köszönhetően a növény számára hasznosítható foszfor szabadul fel (Oatway és munkatársai, 2001). Számos állat fogyasztja ezeket a rostban gazdag gabonákat, illetve természetesen az emberek táplálkozásának is része, azonban az emberek napi fitinsav bevitelét nagyban befolyásolja a kultúra és táplálkozási szokások (Wang és Guo, 2021).

A fitinsav kiemelt figyelmet érdemel, hiszen különleges kémiai felépítéssel rendelkezik és ennek köszönhetően az ásványi anyagokkal és fehérjékkel képes komplexeket képezni. Ezek a komplexek oldhatatlan tulajdonságuk révén gátolják a nyomelemek biológiai hozzáférhetőségét, így hiánybetegségek alakulhatnak ki olyan monogasztrikus állatok (köztük emberek) esetében, akiknek étrendjük nagymértékben támaszkodik fitinsavban gazdag növényi alapanyagokra, de nem termelnek fitáz enzimet (Schlemmer és munkatársai, 2009). Figyelembe véve a fémionok és biopolimerek meghatározó táplálkozási jelentőségét, a fitinsavat, a sóival együtt már az 1920-as évek óta antinutritív vegyületként tartják számon. A vegyület táplálkozási szempontból káros tulajdonságai miatt törekvések indultak a növényekben levő fitinsav bontására. Ennek leghatékonyabb módja az enzimatis bontás, vagyis a fitáz enzimek alkalmazása (Wang és Guo, 2021).

A dió egy rendkívül elterjedt, sokféleképp felhasznált alapanyag, mely emberek széles körének szolgál táplálékul. A fitinsav tartalma által lehetségesen kialakuló hiánybetegségek megelőzésének céljából dolgozatom arra kérdésekre kíván választ találni, hogy vajon csökkenthető-e a fitinsav a dió mintában fitáz enzimek alkalmazásával, és ha igen akkor mennyire, valamint milyen befolyásoló tényezőket szükséges figyelembe venni?

A fitinsav lehetséges negatív hatásai miatt a vegyület enzimatis csökkentési lehetőségének felderítése és optimalizálása került a céljaim központjába dió minta esetén. Ezen célkitűzés megvalósításához szükség volt a fitinsav mérési módszereinek megismerésére, illetve egy kiválasztott (kolorimetriás) eljárás alkalmazására.

A fitinsav bontásához a különböző eredetű fitáz enzimek használata is szerepelt a céljaim között, éppen ezért a kutatásom során egy búza eredetű és egy mikroorganizmus eredetű fitázzal is dolgoztam. Ezen felül még különböző tényezők (pl.: környezeti tényező (hőmérséklet), fermentációs idő hossza, minta aprítottságának befolyása) enzim működésre való hatása is érdekelt.

A munkám célja volt, hogy adott mérési módszer használatával a dió minták fitinsav tartalmát enzimes módon minél jobban csökkentsem és ezt mérési eredményekkel alá is tudjam támasztani.

Kovács Olga Lúcia Diplomadolgozat

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. A dió általános bemutatása

A diófafélék (*Juglandaceae*) rendkívül elterjedt növényfajnak mondhatók, hiszen megtalálhatók a Földközi-tenger térségében, Kelet-Ázsiában, Indiában, Észak- és Közép-Amerikában, illetve az Andokban is. A diófafélék családján belül a diófélék nemzetségébe 18 faj tartozik. A nemzetség neve (*Juglans*) a rómaiaktól ered, akik "Jovis Glans"-nak hívták, ami azt jelenti: "Jupiter király gyümölcse". A 18 faj közül a közönséges dió (*Juglans regia* L.) a leginkább termesztett és kereskedelmi szempontból fontos fajta: mérete, édessége, vékony kérge és könnyen törhető héja miatt (Binici és munkatársai 2021; Chatrabnous és munkatársai, 2018). Ez a fajta Közép-Ázsiában őshonos, majd innen terjedt tovább a Kaukázustól Törökorszáig és Iránig, majd Kínába és a keleti Himalája vonulataira is (Simsek és munkatársai, 2018). Mára már széles körben elterjedt fajról beszélünk, ami jól alkalmazkodott a világ számos mediterrán típusú ökoszisztémájával rendelkező régiójához (Martínez és munkatársai, 2010). A világ teljes diótermelése a FAO statisztikai adatai alapján 2021-ben 3 500 172 tonna volt. Ekkor Kína volt a vezető világtermelő több, mint 1 millió tonna termeléssel, de jelentős termelők még: USA, Irán, Törökország, Ukrajna, Románia, illetve az utóbbi időben gyors léptékben zárkózott fel Chile is (Internet 1). Magyarországon hegyvidéki erdőkben fordul elő, illetve a felső Tisza-vidéken is gyakori. Kedvelt kultúrnövény, udvarokban gyakran ültetik, ahol főleg táplálkozási célokra használják. Azonban gyógyászati feldolgozása is elterjedt: a leveléből készült tea enyhe gyulladásgátló, hasmenés és fertőzések ellen használatos (Margóczi és munkatársai, 2020). A dió termés zöld burokból (kopáncsból), csonthéjból, dióbélből áll, amelyek közül legutóbbit fogyasztjuk (1.ábra) (Liu és munkatársai, 2021). A dió termés ehető része fogyasztható frissen vagy pirítva, önmagában, de számtalan termékben feldolgozva is megtalálható (Martínez és munkatársai, 2010). Egy dióból készült termék feldolgozottsági fok szempontjából lehet alacsony (pl.: szárítmány), közepes (pl.: diótej), illetve magas hozzáadott értékű, fokozottan feldolgozott termék is (pl.: dióolaj). A dió feldolgozásának kezdeti hat lépése: zöld burok eltávolítása, dió szárítása, méret szerinti besorolása, csonthéj feltörése, héj-dióbél szétválasztása és a dióbélt bevonó vékony hártya eltávolítása (Liu és munkatársai, 2021).

1.ábra: *Juglans regia* L. levelének, termésének ábrázolása

(Forrás: Internet 3)



Ezt követően a további technológiai lépések sokfélék lehetnek. Mivel a dió belső része kellemes ízű, így ízesítésként használható joghurtban, süteményekben, kekszekben, desszertekben, illetve csupán díszítésre is gyakran használják. Kevésbé ismert tény, hogy kandírozott formában vagy csokoládéval bevonva is fogyasztják, illetve a dió pasztaként is használható, amely főleg a földimogyoró-allergiában szenvedők körében használt (Şen és Karadeniz, 2015). Az íz, illat és megjelenés javítása mellett a termékek ropogósságának növelése érdekében is alkalmazzák. Más kemény héjú gyümölccsel, cukorral kombinálva, méz és szirup is készíthető belőle. Továbbá, a diót különféle hagyományos termékekben is használják, mint pl.: diópépként, szárított diópépként (Pestil), zöld dió befőttként, diós cukorként, diósószként stb. Hideg sajtolással dióolaj is kinyerhető belőle, habár ezen gyártástechnológia miatt drágább is a legtöbb étolajnál. Bő olajban való sütésre nem igazán alkalmas, mert a magas hőmérséklet hatására enyhe keserű ízt adhat a megsütni kívánt termékeknek. Ennek köszönhetően legtöbbször inkább hidegen fogyasztják hozzávalóként, mint például salátaöntetként (Binici és munkatársai, 2021).

Világszerte kedvelt termékek, nemcsak azért készülnek a dióból, mert kedvező érzékszervi jellemzői vannak, hanem azért is, mert értékes beltartalmi tulajdonságokkal is bír, amelyek

által egészségünkre is pozitív hatást gyakorolhat fogyasztása (Martínez és munkatársai, 2010).

2.2. A dió beltartalmi jellemzői

A dió esetén egy tápanyagban gazdag élelmiszerről beszélhetünk, amely főként zsír-, fehérje-, vitamin- és ásványianyag forrásnak tekinthető (1. táblázat). Ezen felül forrása még sokféle flavonoidnak és polifenolos vegyületeknek, amelyek antioxidáns, gyulladáscsökkentő tulajdonságaik miatt kedvezőek számunkra (Martínez és munkatársai, 2010).

1. táblázat: A dió energia- és tápanyagtartalma (/100 g, ill. /20 g, kb. zárt maroknyi mennyiségre)

(Forrás: Internet 2; Şen és Karadeniz, 2015; Amaral és munkatársai, 2003)

	/100 g	/20 g, kb. zárt maroknyi mennyiség
energiatartalom (kcal)	654	131
fehérjetartalom (g)	15	3
zsírtartalom (g)	65	13
szénhidrátartalom (g)	14	3
élelmi rost (g)	6,7	1,3
kalcium (mg)	98	20
magnézium (mg)	158	32
cink (mg)	3	0,6
szelén (µg)	4,9	1
folát (µg)	98	20
egyszeresen telítetlen zsírsavak (MUFA) (g)	9	2
többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA) (g)	47	9
alfa-linolénsav (ALA) (ómega-3 zsírsav) (g)	9	2

A zsírsavösszetételét tekintve a linolsav a fő zsírsav, ezt követi az olajsav, linolén, palmitin- és sztearinsav. A magas többszörösen telítetlen zsírsav tartalma csökkenti a szívbetegség kockázatát, mivel csökkenti az össz- és LDL-koleszterin szintet és növeli a HDL-koleszterin szintet (Pereira és munkatársai, 2008). Előnye még, hogy megfelelő arányban (4:1) tartalmazza az n-6 és n-3 többszörösen telítetlen zsírsavakat, amely zsírsavak helyes arányú

fogyasztása esetén kimutatták a kardiovaszkuláris betegségek előfordulási kockázatának csökkenését (Martínez és munkatársai, 2010). Ezenkívül a diónak más összetevői is vannak, amelyek jótékony hatással lehetnek az egészségre, beleértve a növényi fehérjéket és szterolokat, illetve a vitaminokat is (Pereira és munkatársai, 2008). Utóbbit tekintve a dió jó forrása az E-vitaminnak, amely két formában van jelen az olajában: alfa-tokoferol és gamma-tokoferol. 100g dió 21 mg gamma-tokoferolt tartalmaz és ez a mennyiség a napi szükségletünk 140%-át biztosítja. Az E-vitamin szükséges a nyálkahártya védelméhez és a bőrsejtmembránok védelmében is részt vesz a szabad gyökök elleni antioxidáns hatásával. A dió egyéb fontos vitaminokat is tartalmaz, mint például: riboflavin, niacin, tiamin, pantoténsav, B6 vitamin és folsav. A dió gyulladásgátló hatású, így csökkenti a különböző gyulladások kockázatát, a magas vérnyomást, illetve az artériás betegségek megelőzésében is részt vesz (Şen és Karadeniz, 2015). A dió jó mangán- és rézforrás is, amely ásványi anyagok szükségesek antioxidáns hatással rendelkező enzimek működéséhez. Illetve érdemes még szót ejteni a dióban lévő jelentősebb rost mennyiségéről is, amely az emésztésünk során fontos szerepet játszik (Binici és munkatársai, 2021).

Az eddig felsorolt sok pozitív hatású tápanyagon túl Ekop és Eddy (2005) egy afrikai diófajtával kapcsolatban végeztek kutatást és összegyűjtöttek néhány kedvezőtlen hatású vegyületet is, amelyek jelen lehetnek a gyümölcsben. Egyrészt felhívják figyelmünket arra, hogy a nem megfelelő tárolás esetén bekövetkezhet, hogy penészek jelennek meg a gyümölcsön és az általuk szintetizált másodlagos anyagcseretermékek (pl.: aflatoxin) különösen veszélyesek lehetnek, hiszen toxikus hatással bírnak. De ezen felül felsorolnak olyan természetesen a termékben előforduló vegyületeket is, mint például, az oxalát, tanninok, cianid, fitinsav. Az oxalátot elfogyasztva, némi irritációt érezhetünk a szájban, majd a bélrendszerbe érve megakadályozza a kalcium, vas és egyéb ásványi anyagok adszorpcióját, csökkenti azok biológiai hozzáférhetőségét. A tanninok oldhatatlan komplexeket képeznek például fehérjékkel, így csökkenti annak emészthetőségét, emellett száraz, húzós érzetet keltenek a szájban. Egyes gyümölcsökben a cianid jelenlétéről is beszámoltak, amely gátolja a sejt oxidációját. Hasonlóan antinutritív vegyület még a fitinsav, amely csökkenti a Ca^{2+} és Mg^{2+} hasznosulását, mivel ezekkel az ionokkal oldhatatlan sókat (fitint) képez. Ekop és Eddy (2005) azért tartották szükségesnek ezen alkotók méréseit, mert habár a kedvezőtlen hatásuk igazolt, mégsem találtak sok információt az általában előforduló és toxikus szintre vonatkozóan, pedig a dióféléket sokszor fogyasztjuk nyers formában hőkezelés vagy bármilyen más feldolgozási lépés nélkül. Szerencsére az általuk kapott

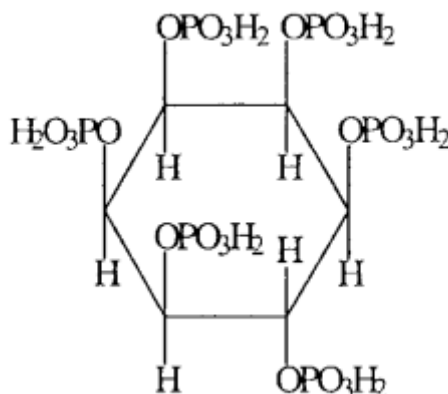
értékek nem voltak riasztóan magasak, de azt megfigyelték, hogy a fitinsav koncentrációja a többi gyümölcshöz képest magasabb a dióban. Az általuk mért afrikai diófajtában 1932.0 mg/100g volt kimutatható (Ekop és Eddy, 2005). Más forrás szerint is tartalmazhat a dió fitinsavat, habár elég változékony mennyiségben – körülbelül 0,2-6,7% (Molnár, 2023). Ekwe és Ihemeje (2013) pedig 3.105 ± 3.74 mg/100g fitátot mértek egy nyers afrikai diófajtából.

2.3. Fitinsav

A fitinsav (2.ábra) (kémiai név: mio-inozit hexafoszfát, IP₆) megtalálható gabonafélékben, diófélékben, hüvelyesekben, olajos magvakban, spórákban és pollenekben is, nagyon kis mennyiségben (körülbelül 1-5%). Felépítését tekintve a fitinsav hexafoszforilált mioinozit szék konformációban (Park és munkatársai, 2006). Ezt az egyedülálló szerkezetű természetes növényi vegyületet először 1855-ben azonosították. A fitinsav szabad savként, fitát vagy fitin formájában lehet jelen, ez a pH-tól és a jelenlévő fémionoktól függ (Oatway és munkatársai, 2001). A fitinsav pH<2 értéken oldódik a legjobban, ezért extrakciójához széles körben használják a savas oldatokat, a leggyakrabban használt sav: 0,5-2,4 mol/L koncentrációban (pl.: sósav). A fitinsav 12 értékű sav, amely tulajdonság egyedi szerkezetet biztosít a vegyületnek, hiszen emiatt képes többértékű fémionokkal, például kalciummal, cinkkel és vassal kelátokat képezni, így oldhatatlan sókat, úgynevezett fitátokat eredményez. A következő vegyületeket, mint például az inozit-tri- (IP₃), tetra- (IP₄) és penta-foszfátot (IP₅) is fitátoknak nevezzük (Bloot és munkatársai, 2021).

2. ábra: A fitinsav szerkezete

(Forrás: Oatway és munkatársai, 2001)



Általában vegyes kalcium-magnézium-kálium sóként fordul elő a magvak egyes részeiben, mint például a búza és a rizs aleuronrétegében (Park és munkatársai, 2006). A növényekben nagyon fontos ez a vegyület, hiszen ásványianyag-tároló funkcióval rendelkezik. Létfontosságú a mag kifejlődéséhez és a palánták sikeres további növekedéséhez, ugyanis támogatja a palánta növekedését a fejlődő szövetek bioszintetikus szükségleteinek kielégítésével. A növényi magélettanban olyan szerepe is van, hogy antioxidánsként az oxidatív stressz elleni védelemben vesz részt (Dragičević és munkatársai, 2011). Az egyik fontos ásványi anyag, amelyet tárol az a foszfor: a gabonafélékben és hüvelyesekben található összes foszfor 85%-áért felelős. Számos tényező befolyásolhatja a gabonaszemek fitinsav tartalmát és foszfor elérhetőségét. A fitátok mennyiségét befolyásolhatja a genetika, a környezeti viszonyok, a földrajzi elhelyezkedés, az öntözési feltételek, a talaj típusa, az évjárat és a műtrágya is. Amikor egy növény a szükségesnél nagyobb foszfor-dózist kap, akkor a felesleges foszfort fitinsav formájában elraktározza. A fitinsav a magok fejlődése során halmozódik fel a magvakban, és koncentrációja a magokérésével változik, és a magérésakor éri el a maximumot (Oatway és munkatársai, 2001).

Az élelmiszer-feldolgozás és emésztés során az inozit-hexafoszfátból részlegesen defoszforilezve bomlástermékek, például penta-, tetra- és trifoszfát keletkezhet, endogén fitázok hatására, amelyek a legtöbb fitinsav tartalmú magban, magasabb rendű növényekben jelen is vannak. A magok csíráztatása megnövekedett fitázaktivitást eredményez, a fitinsav hidrolízise pedig foszfátot és szabad mioinozidot szabadít fel a növények fejlődése során. A fitinsav hidrolízisét az emberi emésztés során három forrásból származó enzim végezheti: az elfogyasztott ételből származó növényi fitázok, a bélben lévő bakteriális flóra és a bélnyálkahártya fitázai. A nyálkahártya fitázai azonban nem játszanak jelentős szerepet a fitinsav emésztésében emberben, míg az étrendi fitázok inkább (Zhou és Erdman, 1995).

Utóbbi támasztják alá Wu és munkatársai is (2009), akik szintén azt gondolják, hogy a monogasztrikus állatok, köztük az emberek számára sem igazán elérhető az az ásványi anyag, amely fitát által kötött formában van jelen. Így a fitinsavat az ásványi anyagok biológiai hozzáférhetőségükre gyakorolt gátló hatása miatt antinutriensnek tekintik. A legszembetűnőbb kémiai hatása a többértékű kationokkal, való erős kelátképző képessége, amely eredményeképp kation-fitinsav komplexek képződnek. A komplexek általában savas pH-n oldódnak, azonban a semlegeshez közeli vékonybél pH-n korlátozott az oldhatóságuk. A komplexek oldhatatlanságát tekintik a fitinsav és ásványi anyag komplexek csökkent hozzáférhetőségének fő okának. E tekintetben leginkább aggodalomra okot adó ásványi

anyagok közé tartozik a cink, a vas, a kalcium, a réz és természetesen maga a foszfor. Különösen a fitinsav által kiváltott cinkhiányról számoltak be. Azonban ennek a kelátképző képességnek egyes kutatók szerint jótékony hatása is van, ugyanis ezáltal a szérum koleszterin és trigliceridszintjének csökkentésére képes, valamint a vas által közvetített oxidáció visszaszorítására és a vastagbélrák kockázatának csökkentésére. Természetes antioxidánsnak is tekinthető, mivel kelátképző tulajdonságával gátolja a vas-katalizált hidroxilgyök képződést és a lipidperoxidációt (Zhou és Erdman, 1995). Bloot és munkatársai (2021) szerint a fitinsav antinutritív hatása elsősorban olyan diétáknál érvényesül, amelyek egyszerre nyomelemben szegények és emellett magas a fitinsav bevitel. Hasonlóképpen látja Molnár (2023) is, aki úgy véli, hogy habár a tanulmányok szerint a fitinsav valóban rontja (akár meg is akadályozza) a cink, vas, kalcium és más ásványi anyagok felszívódását a szervezetben, ez azonban egyetlen étkezésre vonatkozik, nem pedig az említett tápanyagok teljes napi felszívódására. Tehát a fitinsav elsősorban az adott étkezésre vonatkozóan csökkenti az ásványi anyagok felszívódását, de nincs jelentős hatása a következő étkezések során zajló folyamatokra. Például, ha diófélét eszünk az étkezések között, csökkenthetjük az elérhető vas, cink és kalcium felszívható mennyiségét, de csak ezekből a diófélékből és a velük párhuzamosan vagy azt megelőzően fogyasztott ételekből. Emiatt nem érdemes a fitáttartalmú növényi komponenseket együtt fogyasztani olyan ételekkel, amelyekre, mint ásványi anyag forrás támaszkodik az étrendünk pl.: olyan étel, amivel a vasbevitelünk nagyrészt szeretnénk fedezni. Az mindenképp elmondható, hogy ha a legtöbb étkezés során magas fitinsav tartalmú ételeket fogyasztunk, idővel valóban ásványianyag-hiányok alakulhatnak ki. Így például egy nagymértékben növényeken alapuló táplálkozás esetén érdemes figyelni a fehérjeforrások változatosságára, ezzel elkerülhetjük a potenciális veszélyhelyzeteket. Az állítás, miszerint a fitinsav valóban ronthatja a szervezet vas-, cink- és kalciumfelszívó képességét, és ez idővel valóban hozzájárulhat az ásványi anyagok hiányához részben igaz, de ez ritkán okozhat gondot akkor, ha tápanyagban gazdag étrendet követünk (Molnár, 2023).

Érdekeség, hogy mivel sem a fitinsav, sem a metabolitjai nem mérgezőek vagy reakcióképesek, már régóta sokoldalú és egyedülálló élelmiszer-tartósítószerként használják. Gyakran hozzáadják számos élelmiszerhez a szavatossági idő növelése érdekében vagy olyan célból, hogy megakadályozzák vele a nem kívánt elszíneződéseket (Bloot és munkatársai, 2021). A nátrium-fitát általánosan biztonságosnak minősülő anyag (GRAS listán szerepel) és az Egyesült Államokban például pékárukhoz adták

tartósítószerként. Kémiai tartósítószerként az IP₆ képes megváltoztatni az élelmiszer eredetű kórokozók sejtjének morfológiáját. A sejtmembrán károsításával gátolja a baktériumok növekedését a termékben (Wang és Guo, 2021).

2.4. Fitinsav mérése

Számos analitikai módszert fejlesztettek már az élelmiszerekben található fitinsav meghatározására, de ezek alkalmazhatósága nagyon eltérő a minták típusától függően (Park és munkatársai, 2006). A fitinsav mérési módszerei sokat alakultak és bővültek: a savas oldatban oldhatatlan vas-fitát formájában történő kicsapás alapvető módszeréből kiindulva, a fitinsav meghatározására szolgáló technikák sokféle műszeres módszerrel egészültek ki, mint például nagy teljesítményű ionkromatográfia és nagy teljesítményű folyadékkromatográfia. A 2. táblázatban foglaltam össze a fitinsav meghatározás főbb lehetőségeit, majd a táblázatot követő alfejezetekben fejtem ki pontosabban azok előnyeit és hátrányait.

2. táblázat: Fitinsav meghatározási módszereinek összefoglalása

(Forrás: saját szerkesztés Marolt és Kolar, 2020 adatai alapján)

Meghatározási módszerek csoportosítása	Pontos módszer megnevezések
Klasszikus analitikai módszerek	Kicsapáson alapuló
Spektroszkópiai módszerek	Kolorimetriás (UV-VIS)
	Fluoreszcens
	Mágneses magrezonancia (NMR)
	Induktív csatolású plazma atomemissziós spektrometria (ICP-OES)
Kromatográfiai módszerek	Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC)
	Ion kromatográfia (IC)
	Gázkromatográfia (GC)
	Elektroforézis

2.4.1. Klasszikus analitikai módszerek

Ide tartoznak például a kicsapáson és a csapadék leválasztásán alapuló módszerek. Az egyik legelső fitinsav tartalom meghatározására használt analitikai módszereket, főként a gabonafélékre alkalmazták, amelyek finomra őrölt szemcsés részecskéit sósavval extrahálták és az extraktumot savval titrálták FeCl_3 oldat és ammónium-tiocianát jelenlétében. A fitát fehér csapadékot képez Fe^{3+} ionokkal (vas-fitát), míg a titrálás végpontja a vörös színű vas(III)-tociánát komplex. A csapadékot ezután szűrővel elválasztják és NaOH hozzáadásával és melegítéssel a vas(III) a kezdeti fitátkomplexből a $\text{Fe}(\text{OH})_3$ csapadékba került, míg a felszabaduló fitát hidrolizálódik. Létezik ugyanezen az elven indirekt módszer is, ahol elsőként a fitátot csapják ki az ismert vas(III) tartalmú savas oldatban melegítéssel, majd a vas feleslegét visszatitrálják és ehhez kolorimetriás meghatározást társítanak: 519 nm-en mérik a csökkent vas mennyiségét, amely arányos a fitinsav tartalommal. Habár a kromatográfiás módszerek jobb pontosságot mutatnak ezeknél a módszereknél, a rutin élelmiszeranalízishez kényelmesebb a klasszikus analitikát választani (Marolt és Kolar, 2020). Leginkább a feldolgozatlan termékek fitinsav tartalmának mérésére vagy nagyszámú minta fitinsav tartalmának becslésére alkalmazzák, ha nem állnak rendelkezésre fejlett műszerek. Sajnos a feldolgozott élelmiszerek fitinsav tartalmának meghatározására nem használhatóak jól, mert ez a vizsgálat nem tudja elkülöníteni az inozit-hexafoszfátot (fitinsavat) az alacsonyabban szubsztituált inozit-foszfátoktól, emiatt téves eredményt kaphatunk (Wu és munkatársai, 2009).

2.4.2. Spektroszkópiai módszerek

Az UV-VIS spektrofotometria alkalmazása az első kicsapáson alapuló módszerek mellett korán elkezdődött, amely esetben a fitáttartalmat kolorimetriásan határozták meg 830 nm-en, foszfor alapján a molibdénkék reakció által vagy közvetve a vas(III) meghatározásával a csapadékban vagy felülúszó mérésével a vas-fitát csapadékból való felszabadulása után (NaOH reakció vagy savas nedves emésztés segítségével). A fitinsav alacsony koncentrációja közvetlenül is kimutatható: 290 nm-es abszorpciós csúccsal rendelkezik, ami megfelel az oldható vas(III)-fitát komplexnek, ezt szokták alkalmazni kromatográfiás oszlop utáni detektáláshoz. A kompetitív komplexáció használatával közvetett megközelítés is lehetséges, amikor a fémion felszabadul a kezdeti vegyületből, és erősebb fitát ligandumokkal komplexet képez (Wu és munkatársai, 2009). Ezt az elvet alkalmazza a Wade és Morgan 1955-ös módszere, ami vas-klorid és szulfoszalicilsav reakcióján alapul savas közegben, amelyek komplexet képeznek, aminek sajátos rózsaszín színe lesz ($\lambda_{\text{max}} = 500$

nm). Fitinsav jelenlétében a vas(III) a foszfátsavhoz kötődik, ami a képződött eredeti komplex kiszorítása miatt az abszorbancia csökkenéséhez vezet (Agostinho és munkatársai, 2016). Különböző típusú élelmiszerminták elemzésére is használták már, mint például kukorica, szójabab, búza, napraforgó, zab és rozs (Wu és munkatársai, 2009). Ennek a továbbfejlesztett módszerét használta Darambazar (2018) is a vizsgálataihoz. Olyan módszertani változtatás is létezik (Marolt és Kolar, 2020), melyben a molibdát és az 1-amino-2-hidroxi-naftalin-4-szulfonsav reagens adja a színváltozást és a foszfát detektálása 640 nm-en történik. Hátránya azonban, hogy az alacsonyabban szubsztituált inozit-foszfátok is reakcióba lépnek, ezáltal az eljárással túlbecsült fitáttartalmat mérhetünk. Ebbe a kategóriába sorolható még a szinkron fluoreszcens spektroszkópia módszere. Ez a módszer nagy pontossággal jellemezhető, egyszerű, gyors és kiváló érzékenységet mutat, de a szelektivitásán még javítani szükséges élelmiszerminták esetén (Wu és munkatársai, 2009). Spektroszkópiai módszerek közül ismert még a mágneses magrezonancia (NMR), amit szintén alkalmaztak már fitinsav detektálásra. Az NMR-technika fő előnye, hogy nemcsak szerkezeti megkülönböztetést tesz lehetővé az InsP1–InsP6 izomerjei között, hanem ezek sztereoizomerjei között is anélkül, hogy bonyolult mintaelőkészítésre lenne szükség. Bár nagyon hasznos információk származhatnak a (sztereo)izomerek NMR-elemzéséből, viszonylag drága laboratóriumi berendezések és a mélyreható tudás szüksége miatt nem ajánlott rutinmódszernek használni. Az induktív csatolású plazma spektrometriai (ICP) módszer előnyei: gyorsabb analitikai eljárás és alacsonyabb kimutatási határokat képes biztosítani a többi komplex és időigényes kromatográfias módszerhez képest. A fitinsav mérésére is alkalmazható (pl.: zabminták esetében már történt kutatás) atom emissziós (ICP-AES/OES) spektrometriával, amelyhez először a fitinsav kicsapása szükséges vas-reakcióval, majd kvantitatívan foszforként lehetséges meghatározni (Marolt és Kolar, 2020).

2.4.3. Kromatográfias megoldások

Az 1980-as évek elején a különböző elválasztási technikák fejlődése magával hozta a nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC) technikáját is, amellyel a fitinsav is mérhetővé vált. A kezdetekben fordított fázisú oszlopokkal és törésmutató mérésen alapuló (RI) detektorral mérték a komponenst, de különböző nehézségek miatt tovább kellett javítani a technikán és ekkor vezették be az ionpár koncepciót. Ezáltal kiderült, hogy ezzel a beállítással, illetve magasabb pH-érték és mozgófázisban alkalmazott alacsonyabb metanol százalékos arány használatával nő a retenció idő a fordított fázisú oszlopokon, és sikeres lesz az elválasztás az inozit-foszfátok között is (InsP3–InsP6). Mindeközben igény született

a HPLC-s analízisek meglehetősen kielégítő eredményei ellenére a kevésbé bonyolult, kifinomult műszert nem igénylő módszerre, így elindult külön az ionkromatográfiás vizsgálati irány fejlesztése is, általában kolorimetriás detektálással. Bár ígéretes előrelépést mutattak nemcsak a különböző számú foszfátcsoportot tartalmazó inozit-foszfátok, hanem különböző izomer formák detektálása is (az enantiomerek kizárva), az elválasztással még mindig nem voltak teljesen elégedettek. Sok izomer kereskedelmi standardja nem volt elérhető és néhány kromatográfiás csúcs azonosítatlan maradt. Ezért 2003-ban kifejlesztettek egy nagy teljesítményű ionkromatográfiás (HPIC) módszert, amely UV detektálással 295 nm-en vas(III)-mal végzett komplexképzés elven működött. Mindeközben a tömegspektroszkópiás detektálás is fejlődött és ezáltal LC-MS/MS kapcsolt rendszerben egyre javuló kimutatási határokat értek el a kutatók (Kindt és munkatársai, 2004). Néhányan (de Koning, 1994; Haga és Nakajima, 1989) gázkromatográfiás (GC) megvalósítással is próbálkoztak, de az inozit-foszfátok magas forráspontja miatt származékképzés szükséges különböző reagensekkel, mint pl.: heptafluor-butiril-imidazol, trifluor-ecetsavanhidrid és trimetil-klórszilán. A fitinsav mérése esetén GC-hez lehetőség van MS vagy lángionizációs (FID) detektálást is alkalmazni. Utóbbival Park és munkatársai (2006) sikeresen mérték a vegyületet például bébiételből. Néhány adat a vékonyréteg-kromatográfia alkalmazásáról is található, azonban ez nem terjedt el annyira az inozit-foszfátok elemzésére (Marolt és Kolar, 2020). A HPLC és HPIC módszerek rendelkeznek azzal az érzékenységgel és reprodukálhatósággal, amely a különféle termékek alacsony koncentrációinak méréséhez szükséges, így alkalmasak a feldolgozott élelmiszerek fitinsav tartalmának mennyiségi meghatározására is. Egyidejűleg képesek elkülöníteni és detektálni az IP₆-ot és az alacsonyabb foszforilált alakjait is. De sajnos ezek a módszerek drágák, és a műszerek jelentős beruházást, valamint szakértelmet igényelnek (Wu és munkatársai, 2009). Érdekes még, hogy a gélelektroforézis is alkalmazható a fitinsav detektálására, sőt a viszonylag alacsony kimutatási határok miatt, a módszer további lehetőségeket rejthet még magában. Az elektroforézis fontos előnye a többi általánosan használt kromatográfiával szemben, hogy az elemzés gyorsabb és általában alacsonyabb működési költségei vannak.

2.4.4. Dió fitinsav mérése

Liu és munkatársai (2017) dió fitinsav tartalmának vizsgálatára terveztek módszert kifejleszteni, mivel az olajtartalmú minták esetére nem találtak jól bevált eljárást. Ezen problémára megoldásként egy különlegesebb extrakciós lépést, a mikrohullámmal segített extrakciót (MAE) használtak, a hagyományos extrakciós technikák, például Soxhlet

extrakció helyett, valamint az egyes paraméterek optimalizálását is elvégezték a hatékonyság fokozása céljából. A MAE előnyei a rövidebb extrakciós idő és az oldószer térfogatának csökkenése, további hatékonysága abban rejlik, hogy az oldószer és a minta extrakciója zárt térben, ellenőrzött hőmérsékleten és nyomáson zajlik. Végül egy gyors és egyszerű eljárást fejlesztettek a fitinsav és pirofoszfát tartalom meghatározása dió mintában. A mérést mintaelőkészítéssel kezdték, melynek fontos lépése a zsírok eltávolítása a mintából, hiszen a dióban jelen vannak a zsiradékok, amelyek nehezíthetik az analit detektálást. A diót megtisztították a héjtól és darálták, majd 40 °C-on szárították súlyállandóig és felhasználásig exsikkátorban tárolták. A diómintákból hexánnal extrahálták a lipideket (5 ml hexánt adtak 1 g dióhoz, és 16 órán át áztatták egy búra alatt). Majd szűrés után a diót vákuumszivattyús berendezéssel szárították. A kísérletek elvégzéséhez a zsírtalanított mintákat áthelyezték mikrohullámú extraháló edényekbe és sósavat, kénsavat vagy ezek keverékét (megválasztott koncentrációkban) adtak hozzá. A kapott krémes kivonatokat ezután centrifugálták 5000 ford./percnél 10 percig. A felülúszót összegyűjtötték és felhasználták fitinsav és pirofoszfát SPE-ICP-MS módszerrel történő meghatározására a szilárd oldószeres extrakció után. Az SPE-ICP-MS technikával a fitinsav és szervetlen pirofoszfát egyidejű meghatározására is van lehetőség. Az általuk fejlesztett módszerrel 11 mg/g körüli fitinsav tartalmat kaptak az általuk mért spanyol dió mintából (Liu és munkatársai, 2017).

Ekop és Eddy (2005) is végeztek afrikai dió mintából fitinsav mennyiségi meghatározást a következőképpen: 5 g mintát Erlenmeyer-lombikba mértek, majd 2 ml triklór-ecetsavat (TCA) adtak hozzá. Ezt 30 percig keverték, majd centrifugálták. A felülúszót Erlenmeyer-lombikba vitték, és 4 ml FeCl₂-t adtak hozzá. Ezt követte 1,5 M NaOH (3 ml) és forró HNO₃ (3%) hozzáadása. A fitinsav koncentrációját az oldatban lévő vas koncentrációjából számították ki.

Fuentes-Soriano és munkatársai (2019) Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópiai méréssel is próbálkoztak a 13 féle dió minta foszfor tartalmának meghatározására. Extrakcióval elválasztották a dióban lévő asszimilálható és nem asszimilálható foszfort és a frakciók közötti összefüggést vizsgálták, azonban nem találtak korrelációt.

2.5. Fitinsav bontásának lehetőségei

A fitinsav negatív jellemzői miatt az élelmiszerek feldolgozásakor érdemes lehet bizonyos technológiai lépésekkel ezt a vegyületet vagy egy részét eltávolítani a termékből. Már sokféle különböző technika létezik, melyeket az alábbiakban foglaltam össze.

Lehetőség van a fitát mechanikai eltávolítására, amely az alapanyag típusától és a bennük lévő fitát morfológiai eloszlásától is függ. Számos olajos mag és gabona esetében úgy tűnik, hogy a fitinsav fő része az aleuronrétegben található, de kisebb mértékben a csírában is. Olyan gabonafélék tisztítása (koptatása) esetén, amelyeknél a fitát a mag külső rétegében található, akár 90%-os fitátcsökkenést is elérhetünk (Schlemmer és munkatársai, 2009). Például a vadrizs 12,7-21,6 mg/g-ot, a hántolt rizs azonban csak 1,2-3,7 mg/g-ot tartalmaz (Petroski és Minich, 2020). A hüvelyesek esetén a hántolással csak kis mértékben tudnánk eltávolítani a fitátot, mert például a szójababban egyenletesebben oszlik el a vegyület. A kukoricában, ahol a fitát főként a csírában található, a szem ezen részének eltávolításával lehet a fitátot jelentősen csökkenteni. Azonban figyelembe kell vennünk azt is, hogy ha a magvak fitátot tartalmazó részeit leválasztjuk, azzal értékes tápanyagok és bioaktív vegyületek elvesztését is okozzuk (Schlemmer és munkatársai, 2009).

Magvak vízben való áztatása egy hagyományos előkészítési módszer, amely szintén alkalmas a fitát mennyiségének csökkentésére például kölesben, kukoricában, rizsben és szójababban, átlagosan 20%-kal. Azonban az áztatóvízbe nem volt kimutatható a korábbi kutatás alapján az IP₆, ami arra utal, hogy a fitátot endogén gabonafitázok hidrolizálták. (Bár az áztatás csökkentette a fitát tartalmat, ugyanakkor jelentős vas- és cinkvesztést is eredményezett, emiatt a fitát/vas arány nem igazán változott meg, tehát az erre épülő mérés technika lehet, hogy nem jelenítene meg elég pontosan a csökkenést.) A magvak esetén a csírázás tovább csökkentheti a fitátot, mivel az endogén fitázok aktiválódnak, azért, hogy foszfátot szabadítsanak fel a kötött fitát formából. A csicsereborsónak például több mint 60%-kal csökkentette a fitát koncentrációját a csírázási eljárás (Petroski és Minich, 2020).

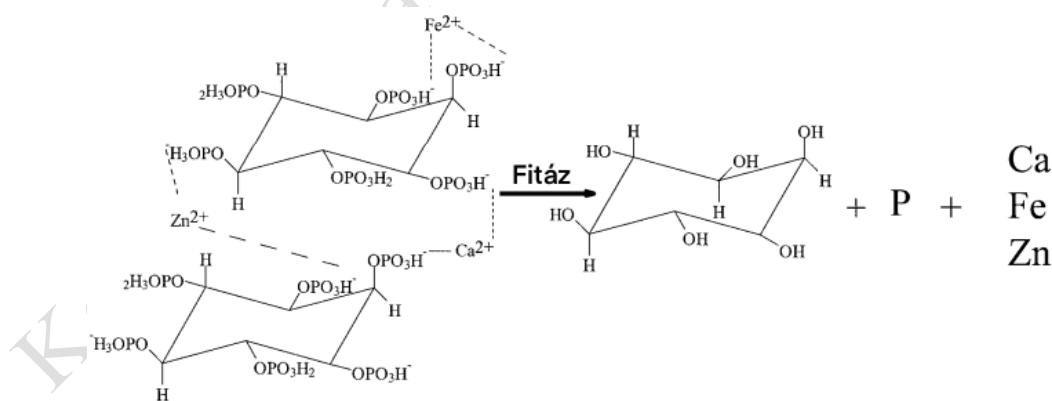
Ezeket túl a fermentálás, mint például a kenyér kelesztése szintén jelentősen csökkenti a fitátok mennyiségét, mely szervesen foszfátokra és inozit-foszfátokra bomlik (Wu és munkatársai, 2009). A kenyerek készítésekor a fermentáció idejének növelése és a pH-csökkentése (körülbelül pH 5,5-re) hatékonyan bizonyult a fehér és teljes kiőrlésű lisztből készült kenyerek fitáttartalmának csökkentésére (Wang és Guo, 2021). Petroski és Minich, (2020) arról számoltak be, hogy a tejsavbaktériumok fitáz aktivitásuk mellett a fermentáció során a tészta pH-ját körülbelül 4-5-re csökkentik, ezáltal aktiválják az endogén gabonafitázokat is. Enyhe savanyítás tejsavval hasonló eredményeket produkál. Castro-Alba és munkatársai (2019) fermentációs kutatásai pedig azt bizonyították, hogy quinoa és

amarant minta beoltása *Lactobacillus plantarum* 299v törzssel csökkentette a fitátkoncentrációt quinoa esetén 47-51%-kal, amarant esetén 12-14%-kal.

Mivel a fitát meglehetősen hőstabil körülbelül 100°C-ig, nem távolítható el könnyen hagyományos hőkezeléssel, mint pl. főzés. A fitát enzimes lebontása azonban mind az élelmiszerben természetesen előforduló fitázokkal, illetve ezen felüli fitázok hozzáadásával hatékonyan végrehajtható. A fitázok (mio-inozit-hexafoszfát-foszfohidrolázok) növényekben, mikroorganizmusokban és állati szövetekben (pl.: borjúmájban) is megtalálhatóak. Olyan enzimek, amelyek hidrolizálják a fitátot (3. ábra), valamint más szerves foszfátokat, mint például az alacsonyabb inozit-foszfátokat eltérő affinitással és hatékonysággal. A foszfátcsoportok fokozatos lehasítása egyre alacsonyabb foszforilációjú inozit-foszfátokhoz és szerves foszfátokhoz vezet míg végül el nem jutunk a mio-inozitig (Schlemmer és munkatársai, 2009). Csapó és munkatársai (2016) szerint a fitát részleges bontása kevésbé foszforilált inozitok (pl.: inozit tetra- és trifoszfát) képződését eredményezi, mely vegyületek táplálkozási szempontból kívánatosak, mert nem képeznek olyan stabil komplexet a kationokkal, mint a fitát, így az esszenciális kationok hozzáférhetősége, felszívódása javul, ugyanakkor ezek a köztettermékek rendelkeznek a fitát pozitív, jótékony élettani hatásaival.

3. ábra: A fitinsav hidrolízise fitinsav által inozit-foszfáttá és elemekre

(Forrás: Lei és Porres, 2003)



A különböző eredetű fitázok más-más hasítási mechanizmus szerint hidrolizálják a foszfátcsoportokat, így különböző inozit-pentát izomereket kaphatunk. A fitázokat nemzetközileg osztályozzák az első hidrolizált fitát-foszfoészter-kötés helyének megfelelően. Ez alapján a két leggyakrabban előforduló enzimes csoport a 3-fitáz és a 6-fitáz. A 3-fitázok elsősorban mikrobiális eredetűek, míg a 6-fitázok főleg növényi eredetűek.

Vannak azonban kivételek: az *Escherichia coli* fitázok 6-fitázok és szójabab fitázok 3-fitázok. A fitázokat számos növényben tanulmányozták, izolálták és jellemezték már. Magas fitáz aktivitás jellemzi a magvakból származókat. A gabonafitázok változó aktivitással vannak jelen, a legmagasabb aktivitással a rozsban, alacsonyabb aktivitással a búzában, zabban, tönkölyben és kukoricában, de a fitáz aktivitás változhat a betakarítási évtől és a fajtától is. Az élelmiszerfeldolgozás során (pl.: korábban említett áztatás), a növényi vagy mikrobiális eredetű fitázokat széles körben alkalmazzák az élelmiszerek fitáttartalmának csökkentésére, valamint az ásványi anyagok és nyomelemek biológiai hozzáférhetőségének javítása érdekében. Azonban nemcsak a már az élelmiszerben rejlő fitázokat lehet kihasználni, hanem hozzáadott fitáz készítményeket is alkalmazhatunk az élelmiszerek fitát tartalmának csökkentése érdekében. A kereskedelmi forgalomban kapható enzimek búzakorpa, élesztő vagy egyéb mikroba eredetűek. Úgy tűnik, hogy a fitázok széles specifikitásúak, és pl.: búzából izolált enzimmel lehetséges a zabban és más gabonafélékben is a fitátbontás. A gomba eredetű fitázokkal akár teljes fitátlebontást is el lehet érni, míg az endogén fitázokkal csak 73-80%-os csökkenést (Schlemmer és munkatársai, 2009).

A fitáz enzimek nagy molekulatömegű (40-500 kDa) fehérjék, amelyek, ahogy említettem számos növényfajban jelen vannak, azonban növényi fitázok termelésének költséghatékony előállítására még kifejlesztésre vár, egyelőre nagyon drága és időigényes folyamat. A mikrobiális eredetű fitázokat azonban ipari célokra már széles körben alkalmazzák. Baktériumokat, élesztőgombákat és penészgombákat is vizsgáltak, közülük az egyik legkiemelkedőbbek az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó fajok, amelyek közül több mint 200 gomba izolátum, fitáz termelését figyelték meg. Több mint 58 gombatorzs mutatott fitát hidrolizáló képességet, s a leghatékonyabb fitáz termelő az *Aspergillus ficuum* volt. Megemlítenék néhány példát a fitázt termelő baktériumokról is, mint a *Bacillus*, *Klebsiella*, *E. coli*, *Pseudomonas* spp-t. Az élesztők által termelt fitázokról (mint pl.: *Saccharomyces cerevisiae* és *Schwanniomyces castellii*) egyelőre még kevés tanulmány létezik. Az enzimek optimális környezeti tulajdonságainak felderítése fontos feladat a lehetséges ipari felhasználás szempontjából. A különböző forrásokból nyert fitázok különböző termostabilitással, pH és hőmérséklet optimummal rendelkeznek. Nagy általánosságban elmondható, hogy a hőmérséklet-optimumuk 25-80 °C között található, pH tartományt illetően aktivitást pedig 4,5–6,0 között mutatnak (Gupta, Gangoliya és Singh, 2015). A gabonafélékben a fitáz optimális hőmérséklete 45°C-55°C és pH-optimuma 5,0 – 5,6 között. A gombák által termelt mikrobiális fitázok gyakran két különböző pH-optimumot mutatnak:

2,5 és 5,0-ös pH 58°C-os hőmérsékleti optimum mellett (és 68°C felett már nem mutatnak aktivitást). Bakteriális fitázok például a *Bacillus subtilis* semlegestől lúgosig terjedő pH-optimumot mutat (pH 7,0-7,5), és legtöbbjük 50°C-on rendelkezik a legnagyobb aktivitással (Schlemmer és munkatársai, 2009). A szubsztrát specifitás is fontos jellemzője az enzimeknek. A fitázoknak különböző foszfát csoportot tartalmazó vegyületek szolgálnak szubsztrátumként. Átalakítandó alapanyag lehet például a fitinsav és egyes sói, a cukorfoszfátok, AMP, ADP, ATP, PEP, NADH₂, riboflavin-foszfát (Bujna, 2014).

Kovács Olga Lúcia Diplomadolgozat

3. Alkalmazott anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált dió minták

A kutatásaim során 2023 évi termésű, Magyarországról származó dió mintákat vizsgáltam, melyek tárolása a vizsgálat kezdéséig fagyasztott (-20°C) körülmények között történt.

3.2. Felhasznált enzimek

A fitinsav bontásához felhasznált enzimek készítmények kereskedelmi forgalomból beszerzett készítmények voltak. Kétféle eredetű fitázzal végeztem a kísérleteimet: egy *E. coli* eredetű (SEB fitáz), illetve egy növényi eredetű, búzából izolált fitázzal. Az enzimek tárolása a vizsgálatig fagyasztott (-20°C) módon történt.

3.3. Az enzimes kezelések folyamata

A dió mintákat enzimes szuszpenziókkal kezeltem a megfelelő hőmérsékleten tartott vízfürdőben, szabályozott időtartamig. Az enzimes hidrolízis megadott kezelési időtartama lejártaival a minták kivételre kerültek, majd mintaelőkészítési lépések következtek.

3.3.1. Darált dió enzimes kezelése

A darált dió mintából 2,5g került összemérésre 5 ml szuszpenzió (desztillált víz és enzim) a centrifugacsőbe. (Kivétel az egész és darált dió összehasonlításának vizsgálata, amikor 5 g darált minta bemérése történt 10 ml szuszpenzióval, de az arány ugyanúgy 1:2 maradt.) Az alkalmazott enzim mennyiség a kísérleti beállítás szerint változott, így a pontos mennyiséget az adott vizsgálatnál fogom feltüntetni.

3.3.2. Egész dió enzimes kezelése

Ez esetben az egész diót nagyobb mennyiségű szuszpenzióval sikerült megfelelően ellepni, emiatt 5 g egész dió bemérése történt, 20 ml szuszpenzióval, amely 1:4 arány.

3.4. Fitinsav méréséhez alkalmazott anyagok

3.4.1. Wade reagens

A reagens elkészítéséhez 300 mg szulfoszalicilsavat és 30 mg vas-klorid-hexahidrátot szükséges feloldani 100 ml desztillált vízben (2-4°C-on tárolható körülbelül 3 hónapig).

3.4.2. 2,4%-os sósavoldat

53,7 ml cc. sósav, illetve 900 ml desztillált víz keveréke.

3.5. Felhasznált módszerek

3.5.1. Liofilezés

Az enzimbontási lépés után a minták lefagyasztásra kerültek, majd liofilizálás következett, amely körülbelül 36 órát vett igénybe. Ehhez Christ-ALPHA típusú liofilizátort használtam. A művelet során alkalmazott körülmények a következők voltak: vákuum nyomása: 0,25 mbar, minta polc hőmérséklete: 24°C, fagyasztás hőmérséklete: -84°C.

3.5.2. Fitinsav mérés

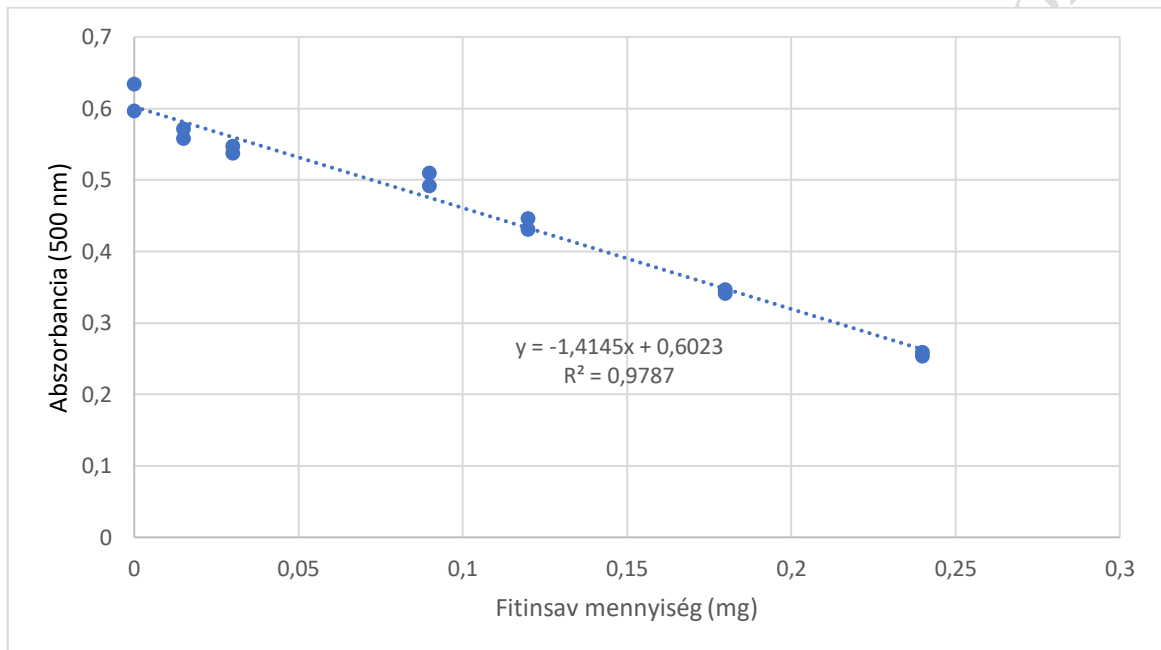
A fitinsav meghatározásához Darambazar 2018-as vizsgálati protokollját alkalmaztam, amely leírja, hogyan határozható meg a fitinsav élelmiszerekben, takarmányokban és növényi anyagokban. A protokollt Gao és munkatársai (2007) kolorimetriás módszere alapján fejlesztették tovább a kanadai saskatchewan Egyetemen. Az analízis alapja az, hogy a Wade reagenssel létrehozott vas-szulfoszalicilsav színes komplexbe a jelenlévő fitinsav beépül, mely kiszorítva a szulfoszalicilsavat a komplexből, elszíntelenedik. A színintenzitás arányos a fitinsav tartalommal, amely spektrofotométerrel mérhető 500 nm-en.

A protokoll leírása alapján a méréseket úgy végeztem, hogy a darált dió mintából 0,5g-ot mértem be 50 ml-es centrifuga csőbe. Mindemellett 1g NaCl-ot is szükséges bemérni egy másik centrifuga csőbe 0,05 g pontossággal, amelyeket ezt követően kupakkal lezárva tároltam. A bemért dió mintákhoz hozzámértem 10 ml 2,4%-os sósavoldatot, majd vortex segítségével 10 mp alatt homogenizáltam az elegyet. Ezután a centrifugacsöveket rázógépből szobahőmérsékleten 16 óráig, 200 rpm-en rázattam. Majd a minta centrifugálása következett 3000 rpm-en 10°C-on 20 percen át. Ezt követően a felülúszót 1 réteg szűrőpapíron átszűrve a korábban kimért NaCl-hoz adtam, majd alaposan homogenizáltam vortex segítségével, hogy feloldódjon a só. Ezután ismét rázógépből helyeztem a mintákat 200 rpm-en 20 percre, majd hagytam leülepedni a rendelkezésre álló időtől függően vagy 4°C-on 60 perc alatt, vagy -20°C-on 20 percen át. Ezután ismét centrifugáltam a mintát 3000 rpm-en 10°C-on 20 percen keresztül. A felülúszóból 1 ml-t 25 ml-es mérőlombikba pipettáztam, amelyet ezután desztillált vízzel jelre töltöttem. A hígított mintát főzőpohárba öntöttem át, majd 3 ml-t ebből a hígított mintából és 1 ml-t a Wade reagensből pipettáztam egy centrifugacsőbe. Ezt még egyszer 3000 rpm-en 10°C-on 10 percig centrifugáltam, majd (desztillált vízzel való nullázás után) 500 nm-en mértem *Unicam Helios Alfa* spektrofotométerrel a minta abszorbanciáját.

A fitinsav mennyiségének meghatározásához kalibrációs sort készítettem fitát standard törzsoldat segítségével. Ehhez 320 mg fitinsav-nátriumsót feloldottam 1 liter desztillált vízben, majd készítettem egy standard oldat sort, amely 5,0; 10,0; 30,0; 40,0; 60,0 és 80,0 mg/l fitátot tartalmazott. Az abszorbancia mérését párhuzamosan végeztem, majd a kapott eredményeket átlagoltam. Minél magasabb volt a fitinsav koncentrációja, annál alacsonyabb volt az oldat abszorbanciája (4. ábra).

4.ábra: Fitát standard kalibrációs egyenes

(Forrás: saját munka)



4. Eredmények és értékelésük

4.1. Különböző eredetű fitázok vizsgálata

Az első kísérlet során a különböző eredetű fitázok összehasonlítását végeztem el fitinsav csökkentés céljából. Az enzimekből kétféle volt lehetőségem kipróbálni külön-külön a dió minta fitinsav tartalmának csökkentésére. A búza eredetű és a bakteriális eredetű fitáz fitinsav bontásának összevetéséhez mind a kettőből azonos, 20-20 unit aktivitású enzimet adtam a folyadék fázishoz. Ezután a mintához adva 55°C-os vízfürdőben történt az enzimbontás. A mintákból mindkét enzim kezelés esetén 1, 2, 4 és 24 óra után vettem mintát és ezeket, illetve a kontroll (enzimkészítmény nélküli) mintákat is vizsgáltam 0, 4, 8 és 24 óra után (3. táblázat). A mintaelőkészítést követően pedig az előzőekben leírt módszer szerint megmértem a fitinsav tartalmát.

3.táblázat: Búza és bakteriális eredetű fitázok hatása a fitinsav mennyiségére

(Forrás: saját munka)

Minta megnevezése	Időtartam	Fitát koncentráció (g/100g)
Kontroll minta	kiindulás (0 óra)	3,95
	4 óra	3,67
	8 óra	3,46
	24 óra	3,32
Búza fitázzal kezelt minta	1 óra	2,95
	2 óra	3,10
	4 óra	3,06
	24 óra	2,84
SEB fitázzal kezelt minta	1 óra	3,28
	2 óra	3,31
	4 óra	3,29
	24 óra	3,42

A fitinsav mérés módszerének kiválasztásakor azt tartottam szem előtt, hogy jelen esetben olyan módszerre volt szükségem, amely gyors, egyszerűen kivitelezhető, illetve viszonylag olcsó is. Hátránya lehet, hogy nem a legpontosabb technika, de a kutatás során arra kerestem a választ, hogy elérhető-e a fitáz segítségével fitinsav csökkentés és ennek a kimutatására alkalmas a technika egyszerű mintamátrix esetén.

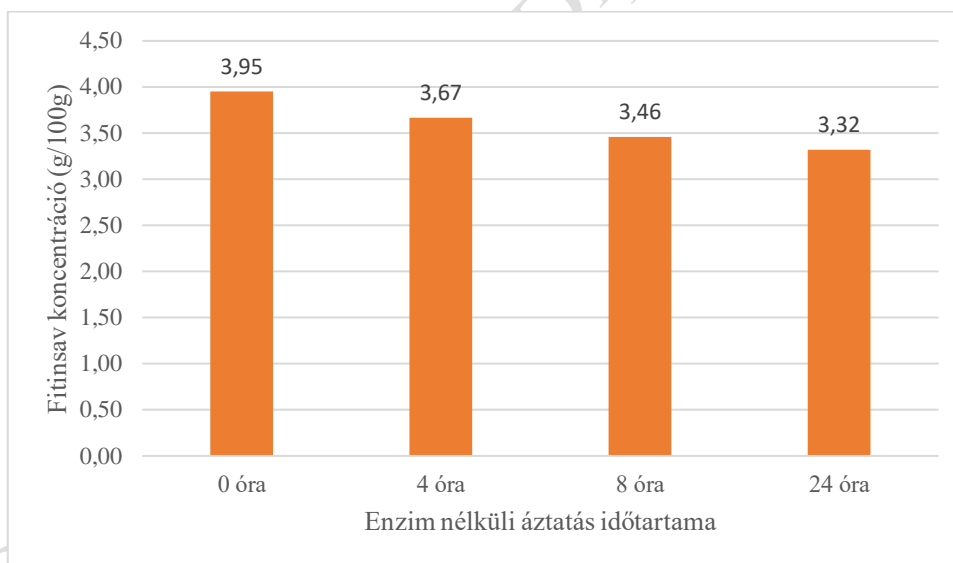
Az eredményeket tekintve, a módszert alkalmazva sikeres volt a fitinsav mennyiségi meghatározása és a 0. órás kontroll minta fitinsav tartalma 3,95 g/100g dió lett, melyet

szakirodalmi adatokkal összehasonlítva megállapítható, hogy megegyezést mutat szakirodalomban található értékekkel: Ekop és Eddy (2005) által egy afrikai diófajtában 1,932 g/100g fitinsav volt kimutatható; Molnár (2023) szerint 0,2-6,7% között változhat a különböző diófajták fitinsav tartalma; Liu és munkatársai (2017) pedig az általuk fejlesztett módszerrel 1,1 g/100g körüli fitinsav tartalmat kaptak az általuk mért spanyol dió mintából.

Érdemes megfigyelni, hogy az 55°C-os áztatás utáni kontroll minták esetében már (enzimes kezelést nem kapott minta) történt bizonyos mennyiségű fitát csökkenés, ennek köszönhetően az idő előrehaladtával egyre kevesebb fitinsav maradt a mintában, amely a 5. ábrán szemléltetve is megtekinthető. A kiindulási 3,95 g/100g-ból 24 órás vízfürdő után 3,32 g/100g maradék fitátot kaptam. Ez a szakirodalmi adatok alapján úgy gondolom, hogy a gyümölcsben levő fitázok meleg vízre történő aktiválása miatt tapasztalható. Petriski és Minich (2020) köles, kukorica, rizs és szója esetén említik ezt a hatást.

5.ábra: Az 55°C-os vízben való áztatás hatása a fitinsav csökkenésére dió mintában

(Forrás: saját munka)

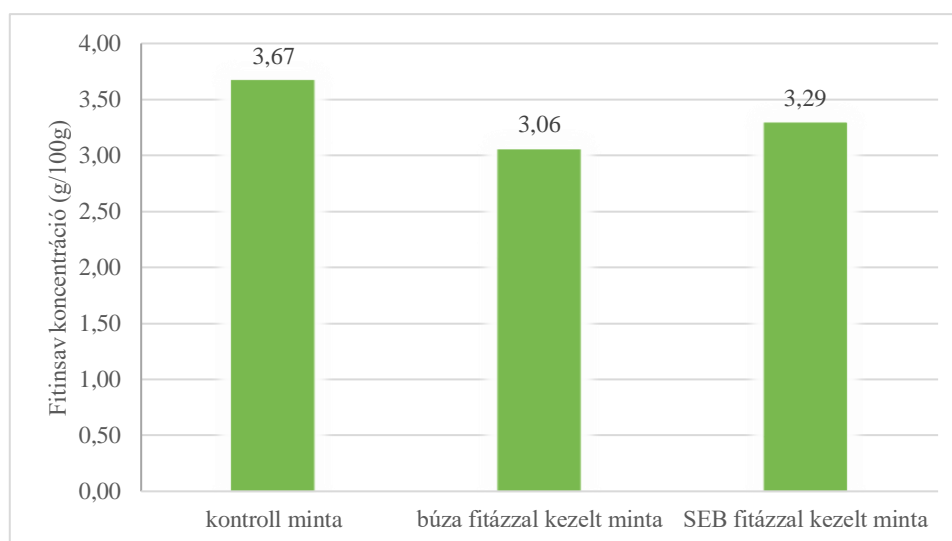


A búza fitáz esetén 2,84-3,10 g/100g közötti fitinsav koncentrációt mértem, amely azt mutatja, hogy sikerült a fitinsavat csökkentenie a hozzáadott enzimnek, azonban a csökkenés mértéke nem függ jelentősen a kezelés időtartamától, bár végül a 24 órás kezelés által kaptam a legkedvezőbb eredményt.

A SEB fitáz esetén sem volt mérvadó a kezelés időtartama, illetve ilyen beállításokkal jelentős mértékű fitinsav csökkentést nem tudunk elérni 24 óra alatt sem, tulajdonképpen már 1 óra alatt is lezajlottak a bontási folyamatok.

6.ábra: A 4 órás búza- és SEB fitázzal történő enzimes kezelés hatása a dió fitinsav koncentrációjára összehasonlítva a 4. órás kontroll mintával

(Forrás: saját munka)



A 6. ábrán látható, hogy összehasonlítva a 4 órás kontroll mintát a két különböző 4 órás fitáz enzimes kezelés utáni eredményekkel, az tapasztalható, hogy csökkent a fitinsav tartalom az enzimek hozzáadásának hatására, valamint megállapítható az is, hogy a búza eredetű fitáz használatával valamivel nagyobb csökkentést tudtam elérni, bár érdemes megjegyezni, hogy ehhez az eredményhez a búza eredetű fitázból az adott enzimaktivitás eléréséhez több enzimre is volt szükség, mint a SEB fitáz esetén.

4.2. Fitáz enzim mennyiségének optimalálása

A további kísérleteim során az *E. coli* eredetű SEB fitáz enzim mennyiség növelésének hatását kívántam vizsgálni a fitinsav bontás hatásfokára vonatkozóan. A SEB fitáz aktivitása magasabb volt, mint a búza fitázé, így a 20 unit aktivitáshoz kevesebb enzimre volt szükségem, valamint nagyobb mennyiségben állt rendelkezésemre, így ennél az enzimmél volt lehetőségem arra, hogy az adagolt enzimmennyiség hatását értékeljem. A 20U-on felül 100U és 200U aktivitással is megvizsgáltam az enzimbontás eredményességét. A bontás időtartamának a 4, 8 és 24 órát választottam, azért, mert szerettem volna a közepes és hosszabb időtartamú enzimes kezelés hatását is megvizsgálni, mert arra számítottam, hogy hosszabb reakcióidővel nagyobb mennyiségű bontás fog megvalósulni. A fitinsav hidrolízis folyamata során ugyanúgy 55°C-os hőmérsékleti beállítást alkalmaztam, illetve a bemért mintamennyiségen sem változtattam, így a 4. táblázatban látható eredményeket kaptam.

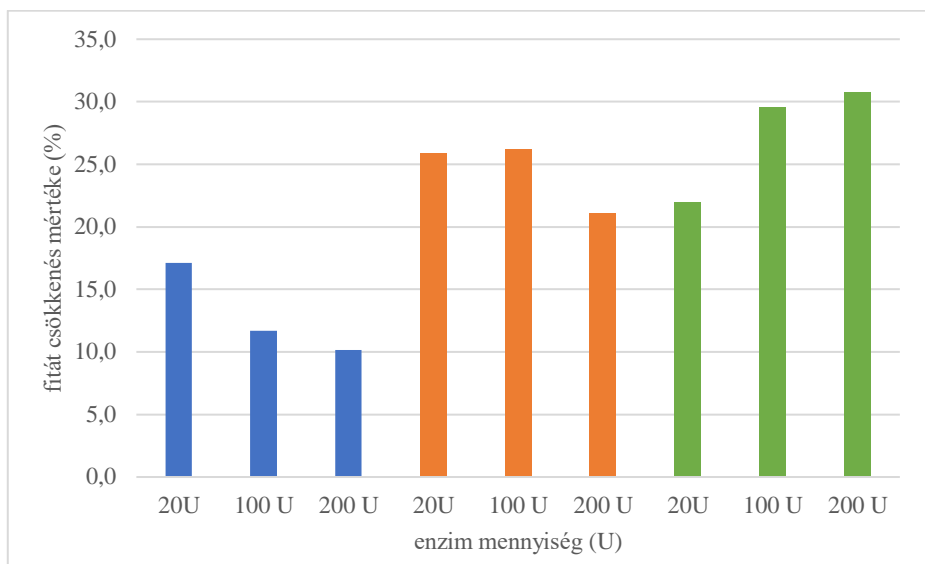
4.táblázat: A SEB fitáz mennyiségének hatása a fitát koncentráció csökkenésére*(Forrás: saját munka)*

Enzimbontás időtartama	Enzim mennyisége (U)	Fitát koncentráció (g/100g)
SEB fitáz 4 óra	20U	3,23
	100U	3,44
	200U	3,50
SEB fitáz 8 óra	20U	2,89
	100U	2,88
	200U	3,08
SEB fitáz 24 óra	20U	3,04
	100U	2,76
	200U	2,70

A 4 órás kezelés során azt tapasztaltam, hogy az enzim mennyiségének növelésével nem érhető el nagyobb mértékű bontás, sőt minél több enzimet alkalmaztam, annál magasabb maradék fitinsav értékeket kaptam. Ugyanakkor az eredmények közötti különbségek nem nagyok, így lehetséges, hogy a 4 óra hossza nem volt elég ahhoz, hogy kiugróan nagy változás történjen a fitinsav bontást illetően az enzim mennyiség növelésének hatására vagy esetleg elképzelhető, hogy ideiglenesen termék gátlás lépett fel a növelt enzim aktivitás következtében történő foszfor felszabadulás miatt. Azonban 8 óra elteltével már jobban látható a csökkenés mértéke, 24 óra után pedig még több fitinsavat sikerült elbontania az enzimnek. A mért értékek a legutóbbi esetben azt mutatják, hogy az enzimaktivitás ötszörösére való növelése esetén jelentősebb változás történik, azonban 100 és 200U között már nem tapasztalható akkora különbség. Viszont végül a 200U-tal kaptam a legkedvezőbb eredményt, így akár 24 óra alatt 200U-os enzimbeállítás mellett 2,70 g/100g-ra is csökkenthető a fitinsav mennyisége, ami a 24 órás kontroll mintánkhoz (3,32 g/100g) képest 14,8%-os csökkenést jelent. Ezzel úgy gondolom, hogy ez egy sikeres optimalizálási beállításnak bizonyult, illetve alátámasztja azt az elméletet, hogy érdemes az áztatáson felül enzimeket használni a fitinsav csökkentésére. Ha pedig a 3,95 g/100g-os kezeletlen dió mintához viszonyítom az eredményt 30%-os csökkenést sikerült elérni, amelyet a 7. ábrán szemléltettem.

7.ábra: A fitinsav csökkenésének mértéke (a kezeletlen dióhoz képest) enzimes bontás hatására a hozzáadott enzim mennyiség függvényében (késsel a 4 órás-, narancssárgával a 8 órás-, zölddel a 24 órás kezelés eredményei láthatóak)

(Forrás: saját munka)



4.3. Egész dió bontása fitáz enzimmal

A következő kísérlet során arra kerestem a választ, hogy a dióban lévő fitinsav hozzáférhetőségét az enzimes reakció során hogyan befolyásolja a dió daraboltsága. A vizsgálati beállítások 55°C, 200U enzimmennyiség voltak. A bontást ezúttal nem csak 24 óráig végeztem, hanem 48 órán át is, hogy megfigyeljem hosszabb kezelés alatt történik-e nagyobb mértékű fitinsav csökkenés az enzimes folyamat során. Az egész dió esetén párhuzamosokat is vizsgáltam, hiszen korábban még nem dolgoztam darálatlan mintából és nem egy vizsgálati eredményből szerettem volna levonni a következtetéseimet. A vizsgálat során kapott eredményeket a 5. táblázatban rögzítettem.

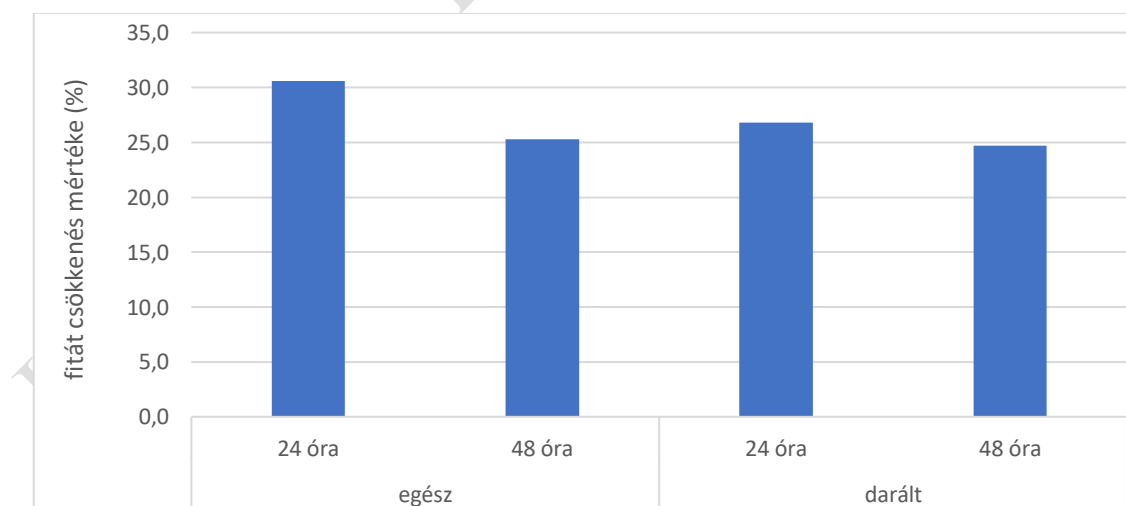
5.táblázat: Egész és darált dió fitáz enzimes kezelésének összehasonlítása

(Forrás: saját munka)

Dió formája	Enzimbontás időtartama	Fitát koncentráció (g/100g)
Egész	24 óra	2,71
	48 óra	2,91
Darált	24 óra	2,86
	48 óra	2,94

Ha az enzimbontás idejét figyelem meg, akkor sajnos az vonható le következtetésnek, hogy a 48 órás reakció után kedvezőtlenebbek az eredmények, hiszen magasabb fitinsav koncentráció maradt a hosszabb ideig kezelt mintákban mind a darált, mind pedig az egész dió esetében. Habár nem sokkal magasabb a maradék fitinsav tartalom 48 óra után, mégis váratlan ez az eredmény; ezt akár okozhatja az is, hogy külön mérési eredmény és más ütemben zajlottak az enzimes folyamatok (hisz nem a 24 órás mintából vettem ki a méréshez mintát és helyeztem vissza további enzimes kezelésre, hanem külön mintaként mértem) vagy esetleg elképzelhető, hogy ilyen hosszú idő után az alacsonyabban szubsztituált inozit-foszfátok felgyülemzése történt, amelyek szintén bekapcsolódtak a komplexképzési reakcióba, ezáltal a kolorimetriás módszerrel akár túlbecsült fitáttartalmat mérhettem. Összehasonlítva, a darált és az egész dió formában történt enzimes kezelés eredményeit az látható (8. ábra), hogy az egész diót tartalmazó mintában is sikeresen végbement a csökkentés, sőt valamivel kedvezőbb eredményt is kaptam, mint a darált minták esetén. Ipari felhasználás szempontjából ez kedvező, hiszen, ha a technológiai folyamat során kihagyható lenne az aprítás lépése, az gazdasági előnyt hordozna magában, ugyanis mind időben, mind anyagi szempontból is csökkentené az előállítási procedúrát.

8.ábra: A kezeltlen dióhoz viszonyítva a fitát csökkenés %-os mértékének összehasonlítása az egész- és darált dió enzimes kezelése esetén
(Forrás: saját munka)



Egész dió esetén is megvizsgáltam a SEB fitáz enzim mennyiség hatását a fitinsav bontására, annak érdekében, hogy összehasonlítsam a darált dió esetén kapott eredményekkel. A kapott eredményeket a 6. táblázatban gyűjtöttem össze.

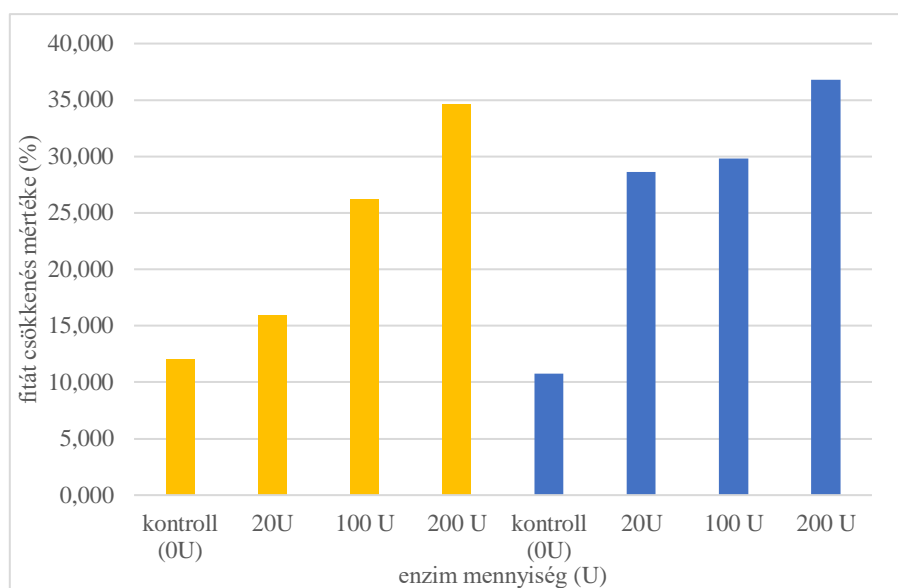
6.táblázat: Az egész dió fitinsav csökkentéséhez használt SEB fitáz enzim mennyiségének optimalása 8 és 24 órás kezelés esetén

(Forrás: saját munka)

Kezelés időtartama	Enzim mennyisége	Koncentráció g/100g dió
8 órás kezelés	kontroll (0U)	3,432
	20U	3,279
	100 U	2,879
	200 U	2,549
24 órás kezelés	kontroll (0U)	3,479
	20U	2,784
	100 U	2,737
	200 U	2,466

A kezelési idő megtervezésekor a kedvezőtlennek bizonyuló 48 órát elvettem és helyette egy rövidebb intervallumot: 8 órát választottam, valamint a korábban alkalmazott 24 órát. A kontroll mintáim egész dió esetén 8 és 24 óra után is 3,4 g/100g fitinsav értéket mutattak, így az egész dió esetén nem kaptam az áztatás idejének növelésére egyre kedvezőbb eredményt. Tapasztalatnak mind 8, mind 24 óra esetében azt vonhatjuk le, hogy az enzim mennyiségének növelése egyre nagyobb mértékű bontást eredményezett és a mintánkban ennek hatására egyre csökkent a fitinsav tartalom. Az is elmondható, hogy a 8 órás kezelésnél egy kicsivel kedvezőbb hatást értem el, ha 24 óráig folytattam a kezelést, így továbbra is ez az időtartam bizonyult a legkedvezőbbnek, amelyet kékkkel a 9. ábrán is láthatunk. Habár gazdasági szempontból megközelítve fontos megjegyezni, hogy a 8 és 24 órás eredmények között nincs akkora különbség, így ilyen szemszögből nézve a 24 órát már lehet nem éri meg alkalmazni.

9. ábra: A kezeletlen dióhoz mért %-os fitinsav csökkenés egész dió fitáz enzim kezelésének esetén az enzim mennyiség beállításának függvényében (sárga: 8 órás kezelés, kék: 24 órás kezelés)



4.4. A hőmérséklet hatásának vizsgálata a fitinsav csökkentésre

Az eddigi vizsgálatokat 55°C-os hőmérsékleten végeztem, mert az általam használt fitáz enzimek aktivitásának maximuma a forgalmazó által megadott adatok szerint 55-60°C-on található. Ezúttal arra a kérdésre kerestem a választ kísérletem során, hogy mekkora hatással bír a hőmérséklet változtatása az enzim működésére és ezáltal a fitinsav bontására. A reakció a már az optimalizált enzimmennyiséget használva (200U), 24 órás időtartamon keresztül zajlott. A 7. táblázatban látható hőmérsékletek kiválasztása a gazdasági szempontból kedvező szobahőmérséklet és az enzimaktivitás maximum értéke között történt.

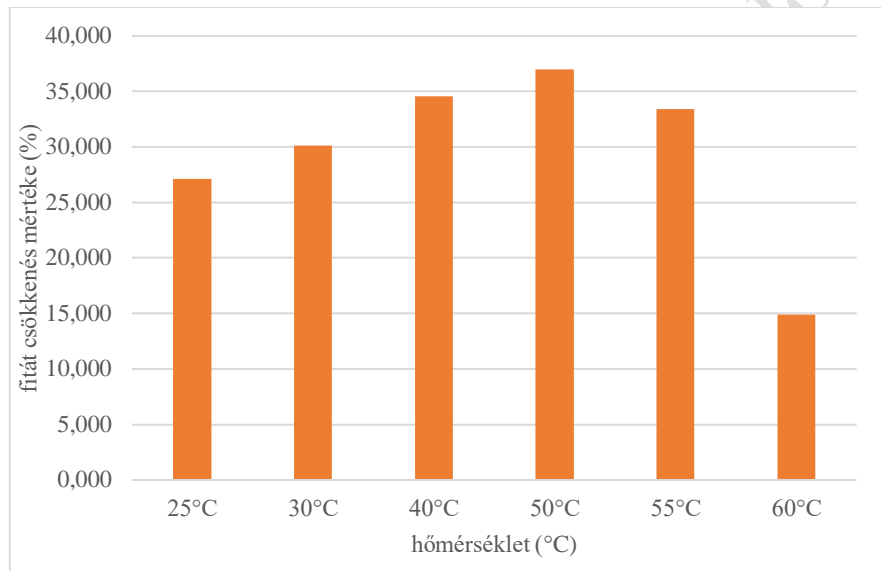
7.táblázat: A hőmérséklet hatása a fitáz enzim működésére

(Forrás: saját munka)

Alkalmazott hőmérséklet (°C)	Fitát koncentráció (g/100g)
25	2,88
30	2,76
40	2,58
50	2,49
55	2,63
60	3,36

A vizsgálat eredményeképpen kapott adatok alapján a legkedvezőbb mért értéket 50 °C-os beállítás esetén kaptam, ugyanakkor a 40 és 55°C közötti tartományban az eredmények igen hasonlóak, számottevő különbség nincs. A gazdasági szempontból kiválasztott 25°C sajnos nem volt elég kedvező az enzim számára, így nem érdemes melegítés nélkül végezni a SEB fitázzal a kezelést. Illetve az is meglepő, hogy a forgalmazó által optimálisnak megadott 60°C-os beállítás esetében nem tapasztaltam nagy mértékű aktivitást és fitinbontást, mivel az már túl magas hőmérsékletnek bizonyult (10. ábra).

10.ábra: A fitinsav csökkenésének mértéke (a kezeletlen dióhoz képest) enzimes bontás hatására a hőmérséklet függvényében
(Forrás: saját munka)



5. Következtetések és javaslatok

A diplomadolgozatom alapján az alábbi következtetések vonhatóak le:

- a vizsgált -Magyarországon, 2023-ban termett- dió minta fitinsav tartalma beleesett a szakirodalmakban olvasható tartományba, hiszen 3,9 g/100g-os eredményt kaptam
- az alkalmazott 55°C-os áztatás, mint fitinsav csökkentési módszer valóban alkalmazható dió esetén és 24 óra alatt körülbelül 14,8%-os csökkenés érhető el vele, ez is alátámasztja a szakirodalmi adatokat
- fitáz enzimek készítményekkel megvalósított kezeléssel az áztatásnál nagyobb bontást érhetünk el, a legjobb beállításokkal és optimálásokkal akár 36%-ot is. Az elért eredmények ígéretesek, de a szakirodalmak szerint, más élelmiszerek esetén és más eredetű (pl.: *Aspergillus*) enzimek alkalmazásával akár még a duplája is elérhető lehet
- mind a búza eredetű, mind a mikroba eredetű fitáz enzimmel elérhető a fitinsav csökkentése, optimálásra vonatkozó vizsgálataimat a mikroba eredetű enzimek esetén végeztem
- a fitáz hatékonyságát befolyásolta a mintához adott mennyiségük, a hőmérsékleti körülmények és az optimálási lépések után a kezelés időtartama is
- a dió daraboltságától nem függ nagy mértékben a bontás eredményessége, hiszen mind a darált, mind az egész diónak is azonos mértékben sikerült a fitinsav tartalmát csökkenteni
- A mikroba eredetű SEB fitázzal a legjobb beállítás 50-55°C-on 200U aktivitással és 24 órás kezeléssel történt, habár gazdasági szempontból nézve a 8 óra bizonyul kedvezőbbnek

A kutatásom alapján, a téma további felderítéséhez a javasolataim a következők:

- érdemes volna egyéb eredetű enzimek használatát is kipróbálni és összevetni az általam alkalmazottakkal
- javasolható különböző mérés-technikai módszerekkel is megerősíteni a fitinsav csökkenésének mértékét, hiszen a nagyműszeres technikák pontosabb eredményekkel szolgálhatnak
- mivel a pH is jelentősen befolyásolja az enzimek hatékonyságát, javasolható az optimális kémhatáson megvalósított enzimes kezelés vizsgálata is, mely segíthet még nagyobb fitinsav bontás elérésében

- továbbá a feldolgozott diótermékek esetén a feldolgozottsági fok fitinsavra való ráhatását is tanácsos lenne felderíteni

Kovács Olga Lúcia Diplomadolgozat

6. Összefoglalás

A dió az élelmiszerek között kiemelt gazdasági jelentőséggel bír, hiszen nyersen is rendszeresen fogyasztott, illetve számtalan termékben feldolgozva is megtalálható. Világszerte kedvelt, nemcsak az érzékszervi, hanem értékes beltartalmi jellemzői miatt is. Főként zsír-, fehérje-, vitamin- és ásványianyag forrásnak tekinthető. Ezen felül tartalmaz még sokféle flavonoid és polifenolos vegyületet, amelyek antioxidáns, gyulladáscsökkentő tulajdonságaik miatt kedvezőek számunkra. Azonban az eddig felsorolt tápanyagokon túl néhány kedvezőtlen hatású vegyület is jelen lehet a gyümölcsben, mint például a fitinsav. A fitinsav (mio-inozit hexafoszfát) kis mennyiségben (körülbelül 1-5%) megtalálható gabonafélékben, diófélékben, hüvelyesekben, valamint olajos magvakban. Antinutritív anyagnak számít az emberi táplálkozásban, mert kelátképző tulajdonsággal bír, így különféle fémeket és fehérjéket köt meg, csökkentve ezzel a táplálkozási szempontból fontos ásványi anyagok biológiai hozzáférhetőségét. Mivel a fitinsav meglehetősen hőstabil, nem bontható el hőkezeléssel, viszont a fitázok alkalmazása hatékony eszköznek bizonyul a vegyület csökkentésére a szakirodalmak szerint. A fitázok olyan enzimek, amelyek hidrolizálják a fitátot, valamint más szerves foszfátokat, mint például az alacsonyabb inozit-foszfátokat. Az élelmiszerfeldolgozás során a növényi vagy mikrobiális eredetű fitázokat széles körben alkalmazzák az élelmiszerek fitáttartalmának csökkentésére.

Vizsgálataim során célom volt, hogy meghatározzam a magyarországi dió fitinsav tartalmát. Bár a fitinsav meghatározására gyakran már nagyműszeres technikákat is alkalmaznak, ezeknek általában magas karbantartási költsége van, bonyolultabb mintaelőkészítést igényelnek és bizonyos esetekben hosszabb mérési idővel járnak. Ezért a legtöbb laboratóriumban elérhető egyszerű és olcsó technikákat alkalmazó analitikai módszerek fejlesztése, mint például a spektrofotometria, vonzó alternatívává válik a fitinsav meghatározására. Az általam alkalmazott módszer a vas-klorid és szulfoszalicilsav reakcióján alapul, amelyek együtt egy komplexet képeznek, melynek mennyisége spektrometriásan 500 nm-en mérhető. Fitinsav jelenlétében azonban a vas(III) a foszfáthoz kötődik, amely a képződött eredeti komplex kiszorítása miatt az abszorbancia csökkenéséhez vezet.

A dió fitinsav tartalmának meghatározásán túl célul tűztem ki a vegyület mennyiségének csökkentését is, amelyhez különböző eredetű fitázokat alkalmaztam. A búza eredetű és bakteriális fitáz fitinsav bontásának összevetéséhez azonos enzimmennyiséget, valamint

55°C hőmérsékletet alkalmaztam. Az enzimes hidrolízis optimális idejének meghatározásához 1, 2, 4 és 24 órás kezelést követően végeztem el a fitinsav tartalom meghatározását. Kontrollként enzimkészítmény nélküli mintákat is vizsgáltam. A kontrollminták alapján a meleg vizes áztatás hatására is bekövetkezik fitát bontás, feltehetően a mintánkban eredetileg levő fitáz enzimek aktiválódásának hatására. Ezen felül az enzimekkel történt kezelések utáni méréseim alapján a fitinsav bontás még inkább sikeresnek bizonyult mind a búza eredetű, mind a mikrobiális enzimmel. Mivel a bakteriális fitáz nagyobb enzimaktivitással rendelkezett, a további vizsgálataimhoz ezt az enzimet alkalmaztam. Kísérletet végeztem az adagolt enzimmennyiséggel kapcsolatosan is. Az első vizsgálatban 20 U-os enzim beállítással dolgoztam, majd 100 és 200 U aktivitású enzimmel is elvégeztem a vizsgálataimat. Az eredmények azt mutatták, hogy 8 és 24 órás kezelés során az enzim mennyiségének növelése fokozta a fitinsav csökkentését. Ipari felhasználás szempontjából fontosnak találtam megvizsgálni a fitáz enzim alkalmazhatóságát darált és darálatlan dió esetén is. Az enzimes bontás mindkét esetben hasonló hatásfokkal bekövetkezett, ami igen kedvező eredmény. Illetve egész dió esetén is végeztem enzim mennyiséggel kapcsolatos optimalást, ahol szintén azt tapasztaltam, hogy a fitáz növelése nagyobb mennyiségű fitinsav bontást eredményezett, ezzel alátámasztva a korábbi mérési adataimat. Végezetül vizsgáltam a hőmérséklet enzimaktivitásra gyakorolt hatását is 25-60°C közötti tartományban, s eredményeim alapján a 40°-55°C közötti tartományban volt a leghatékonyabb az enzim.

Összességében elmondható, hogy az optimalás segítségével a SEB fitázzal több mint 30%-os fitinsavbontást sikerült elérni a kezeletlen dióhoz képest, amely megvalósítható egész dió enzimes kezelése esetén is. Elért eredményeim ígéretesek, így remélhetőleg a dolgozatomból kiindulva további kutatások segítségével a jövőben a fitát csökkentés mértéke fokozható lesz dió és dióból készült termékek esetén.

7. Irodalomjegyzék

1. Agostinho, A. J., de Souza Oliveira, W., Anunciação, D. S., & Santos, J. C. C. (2016). Simple and sensitive spectrophotometric method for phytic acid determination in grains. *Food Analytical Methods*, 9, 2087-2096
2. Amaral, J. S., Casal, S., Pereira, J. A., Seabra, R. M., & Oliveira, B. P. (2003). Determination of sterol and fatty acid compositions, oxidative stability, and nutritional value of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Portugal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7698-7702.
3. Binici, H. İ., Şat, İ. G., & Aoudeh, E. (2021). Nutritional composition and health benefits of walnut and its products. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 52(2), 224-230.
4. Bloot A.P.M., Kalschne D.L., Amaral J. A. S., Baraldi I. S. & Canan C. (2021): A Review of Phytic Acid Sources, Obtention, and Applications, *Food Reviews International*, DOI: 10.1080/87559129.2021.1906697
5. Bujna E. (2014). Mikrobiális fitáz enzim előállítás és jellemzése. Doktori értekezés. 6-41.
6. Castro-Alba, V.; Lazarte, C.E.; Pérez-Rea, D.; Carlsson, N.; Almgren, A.; Bergenståhl, B.; Granfeldt, Y. (2019) Fermentation of pseudocereals quinoa, canihua, and amaranth to improve mineral accessibility through degradation of phytate. *J. Sci. Food Agric.* 2019, 99, 5239–5248.
7. Chatrabnous, N., Yazdani, N., Tavallali, V., & Vahdati, K. (2018). Preserving quality of fresh walnuts using plant extracts. *LWT*, 91, 1-7.
8. Csapó, J., Albert, C., & Kiss, Z. (2016). *Funkcionális élelmiszerek= Functional Foods*. Scientia Kiadó, 161.
9. Darambazar, E. (2018). Method of phytic acid determination in food, feed, and plant materials assay protocol. University of Saskatchewan.
10. de Koning, A. J. (1994). Determination of myo-inositol and phytic acid by gas chromatography using scyllitol as internal standard. *Analyst*, 119(6), 1319-1323.
11. Dragičević, V., Sredojević, S., Perić, V., Kovinčić, A., & Srebrić, M. (2011). Validation study of a rapid colorimetric method for the determination of phytic acid and inorganic phosphorus from seeds. *Acta periodica technologica*, (42), 11-21.

12. Ekop, A. S., & Eddy, N. O. (2005). Comparative Studies of The Level of Toxicant in the Seeds of *Terminalia catappa* (india almond) and *Coula edulis* (African walnut). *Chem Class Journal*, 2, 74-76.
13. Ekwe, C. C., & IHEMEJE, A. (2013). Evaluation of physiochemical properties and preservation of African walnut (*Tetracarpidium conophorum*). *Academic Research International*, 4(6), 501.
14. Fuentes-Soriano, P., Bellido-Milla, D., García-Guzmán, J. J., Hernández-Artiga, M. P., Gallardo-Bernal, J. J., Palacios-Santander, J. M., & Espada-Bellido, E. (2019). A simple phosphorus determination in walnuts and assessment of the assimilable fraction. *Talanta*. doi:10.1016/j.talanta.2019.05.097
15. Gao, Y., Shang, C., Maroof, M. S., Biyashev, R. M., Grabau, E. A., Kwanyuen, P., Burton J.W. & Buss, G. R. (2007). A modified colorimetric method for phytic acid analysis in soybean. *Crop Science*, 47(5), 1797-1803.
16. Gupta, R. K., Gangoliya, S. S., & Singh, N. K. (2015). Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 676-684.
17. Haga, H., & Nakajima, T. (1989). Determination of polyol profiles in human urine by capillary gas chromatography. *Biomedical Chromatography*, 3(2), 68-71.
18. Internet 1: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>
19. Internet 2: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170187/nutrients>
20. Internet 3: commons.wikimedia.org/wiki/File:K%C3%B6hler_Walnuss_1887.jpg
21. Kindt, E., Shum, Y., Badura, L., Snyder, P. J., Brant, A., Fountain, S., & Szekely-Klepser, G. (2004). Development and validation of an LC/MS/MS procedure for the quantification of endogenous myo-inositol concentrations in rat brain tissue homogenates. *Analytical chemistry*, 76(16), 4901-4908.
22. Lei, X. G., & Porres, J. M. (2003). Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnology letters*, 25, 1787-1794.
23. Liu, M., Li, C., Cao, C., Wang, L., Li, X., Che, J., Yang H., Zhang X., Zhao H., He G. & Liu, X. (2021). Walnut fruit processing equipment: academic insights and perspectives. *Food Engineering Reviews*, 1-36.

24. Liu, T., He, L., Valiente, M., & López-Mesas, M. (2017). Fast determination of bioactive phytic acid and pyrophosphate in walnuts using microwave accelerated extraction. *Food Chemistry*, 221, 771–775. doi:10.1016/j.foodchem.2016.11.10
25. Margóczy, K., Gellény, K., Cseh, V., Simon, A., Mód, L. B., Hohmann, J., Háznagyné R.E., Hajdú Zs., Gavarić N., Kladar N., Barak O., Čonić B.S, & Božin, B. (2020). *Gyógynövények helyi használata a Vajdaságban és a Dél-Alföldön*. 36. o.
26. Marolt, G., & Kolar, M. (2020). Analytical methods for determination of phytic acid and other inositol phosphates: A review. *Molecules*, 26(1), 174
27. Martínez, M. L., Labuckas, D. O., Lamarque, A. L., & Maestri, D. M. (2010). Walnut (*Juglans regia* L.): genetic resources, chemistry, by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(12), 1959-1967.
28. Molnár D. (2023) *Mentes Táplálkozás! Egészséges középút szélsőséges diétáktól és büntudattól mentesen*. Jaffa Kiadó, 45-54.o.
29. Oatway, L., Vasanthan, T., & Helm, J. H. (2001). Phytic acid. *Food Reviews International*, 17(4), 419-431.
30. Park, H. R., Ahn, H. J., Kim, S. H., Lee, C. H., Byun, M. W., & Lee, G. W. (2006). Determination of the phytic acid levels in infant foods using different analytical methods. *Food Control*, 17(9), 727-732.
31. Pereira J. A., I. Oliveira, A. Sousa, I. C.F.R. Ferreira, A. Bento, L. Estevinho (2008). Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 2103–2111
32. Petroski, W., & Minich, D. M. (2020). Is there such a thing as “anti-nutrients”? A narrative review of perceived problematic plant compounds. *Nutrients*, 12(10), 2929
33. Schlemmer, U., Frølich, W., Prieto, R. M., & Grases, F. (2009). Phytate in foods and significance for humans: food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(S2), S330-S375.
34. Şen, S. M., & Karadeniz, T. (2015). The nutritional value of walnut. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 11(18), 68-71.

35. Simsek, M., Gulsoy, E., Pehlivan, M., & Erdogmus, B. (2018). A research on determination some botanical, pomological and chemical properties of walnut genotypes (*Juglans regia* L.) grown in eastern Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(4), 2492-2498.
36. Wu, P., Tian, J. C., Walker, C. E., & Wang, F. C. (2009). Determination of phytic acid in cereals—a brief review. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(9), 1671-1676.
37. Wang, R., & Guo, S. (2021). Phytic acid and its interactions: Contributions to protein functionality, food processing, and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 2081-2105.
38. Zhou, J. R., & Erdman, J. W. (1995). Phytic acid in health and disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(6), 495–508. doi:10.1080/10408399509527712

Táblázatok és ábrák jegyzéke

1. táblázat: A dió energia- és tápanyagtartalma (/100 g, ill. /20 g, kb. zárt maroknyi mennyiségre).....	7
2. táblázat: Fitinsav meghatározási módszereinek összefoglalása.....	12
3. táblázat: búza és bakteriális eredetű fitázok hatása a fitinsav mennyiségére.....	24
4. táblázat: A SEB fitáz mennyiségének hatása a fitát koncentráció csökkenésére.....	27
5. táblázat: Egész és darált dió fitáz enzimes kezelésének összehasonlítása.....	28
6. táblázat: Az egész dió fitinsav csökkentéséhez használt SEB fitáz enzim mennyiségének optimalása 8 és 24 órás kezelés esetén.....	30
7. táblázat: A hőmérséklet hatása a fitáz enzim működésére.....	31
1. ábra: Juglans regia L. levelének, termésének ábrázolása.....	6
2. ábra: A fitinsav szerkezete.....	9
3. ábra: A fitinsav hidrolízise fitinsav által inozit-foszfáttá és elemekre.....	18
4. ábra: Fitát standard kalibrációs egyenes.....	23
5. ábra: Az 55°C-os vízben való áztatás hatása (enzim nélkül) a fitinsav csökkenésére dió mintában.....	25
6. ábra: A 4 órás búza- és SEB fitázzal történő enzimes kezelés hatása a dió fitinsav koncentrációjára összehasonlítva a 4. órás kontroll mintával	26
7. ábra: A fitinsav csökkenésének mértéke (a kezeletlen dióhoz képest) enzimes bontás hatására a hozzáadott enzim mennyiség függvényében.....	28
8. ábra: A kezeletlen dióhoz viszonyítva a fitát csökkenés %-os mértékének összehasonlítása az egész- és darált dió enzimes kezelése esetén.....	29
9. ábra: A kezeletlen dióhoz mért %-os fitinsavcsökkenés egész dió fitáz enzimes kezelésének esetén az enzim mennyiség beállításának függvényében (sárga: 8 órás kezelés, kék: 24 órás kezelés).....	31
10. ábra: A fitinsav csökkenésének mértéke (a kezeletlen dióhoz képest) enzimes bontás hatására a hőmérséklet függvényében.....	32

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Nguyen Duc Quang egyetemi tanárnak, hogy az irányítása alatt álló Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszéken készíthettem el a diplomadolgozatomat. Valamint szeretnék köszönetet mondani a témavezetőimnek, Dr. Bujna Erika egyetemi docensnek és Sipiczki Gizella egyetemi tanársegédnek, hogy szakértő tanácsaikkal, meglátásaikkal, ötleteikkel és lelkiismeretes munkájukkal támogattak a diplomadolgozatom elkészítésében, illetve nagyon köszönöm Nekik a laboratóriumi mérések során nyújtott segítségüket is és végtelen rugalmasságukat.

Illetve szeretnék köszönetet szeretnék mondani a *GINOP_PLUSZ-2.1.1-21-2022-00201* projektet szervező kollégáknak, hogy kutathattam az *Olajos magvak feldolgozására, növényi olajok kinyerésére és funkcionális termékek kifejlesztésére irányuló kutatás-fejlesztési projekt* segítségével az Agricolae Kft. megbízásából.

NYILATKOZAT

a diplomadolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Kovács Olga Lúcia
A Hallgató Neptun kódja: HNDOYB
A dolgozat címe: Dió fitinsav tartalmának csökkentése fitáz alkalmazásával
A megjelenés éve: 2024
A konzulens intézetének neve: Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Biomérnök és Erjedéssipari Technológiai 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 mindenkori szellemitulajdon-kezelési 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: 2024.04.21.


.....
a szerző aláírása

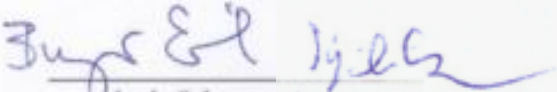
NYILATKOZAT

Kovács Olga Lúcia (HNDOYB) 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 védeésre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Kelt: 2024.04.21.


belső konzulens